



Universitat de Lleida

## Caracterización de la senescencia celular inducida por Sprouty: papel de p38

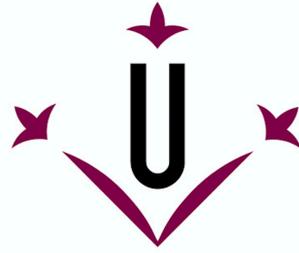
Carlos Anerillas Aljama

<http://hdl.handle.net/10803/666058>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat de Lleida**

## **TESIS DOCTORAL**

# **Caracterización de la senescencia celular inducida por Sprouty: papel de p38**

**Carlos Anerillas Aljama**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la  
Universitat de Lleida

Programa de Doctorat en Salut

Director/a  
Mario Encinas Martín

Tutor/a  
Mario Encinas Martín

Lleida, 2019



Universitat de Lleida

## Caracterización de la senescencia celular inducida por Sprouty: papel de p38

Carlos Anerillas Aljama

<http://hdl.handle.net/10803/666058>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



---

# Caracterización de la senescencia celular inducida por Sprouty: papel de p38

---

Carlos Anerillas Aljama



A mis padres,  
mi hermano  
y mi abuelo Diego.



«El problema se inicia cuando nos preguntamos si la vejez existe. Entendámonos: si la vejez existe con independencia del reuma, la arteriosclerosis y otros achaques más o menos aparentes, que contribuyen al progresivo deterioro de nuestro organismo. Porque si la vejez no fuera más que ese proceso de mineralización de nuestras células, no tendría para nosotros interés alguno; Séneca y Cicerón, y tantos otros que pretendieron decir algo interesante de ella, habrían perdido el tiempo [...]. La creencia, más o menos ingenua, en la dualidad de sustancias, tiende a contestar esta pregunta negativamente: “El espíritu no envejece, y nada sabría de la vejez sin la vil carroña que lo envuelve”.»

**Juan de Mairena (aka Antonio Machado)**



# Prefacio emocional



Ya sé que estas líneas están situadas al principio de este diminuto tochazo, creedme que bien lo sé. Pero, como no podía ser de otra manera, seguramente por la conveniencia de redactarlas una vez liquidados todos los demás capítulos de esta humilde odisea académica, he decidido dispensar toda esta serie de párrafos sin corsé a tiempo final, serie de la que todos los que forméis parte habéis de destilar mi eterna gratitud en la medida que a cada uno podéis imaginar que os corresponde. Pues bien, he convenido conmigo mismo en dejarlo para lo último, vamos, como gran parte de las cosas que he ido haciendo a lo largo de mi corto periplo por el mundo. Periplo del que no podría ser partícipe de no ser por mis amados padres. A modo de escueta introducción he de apostillar que, por lo que me han ido comentando, poco después del amanecer del siete de noviembre del año 1991 todo esto dio comienzo, lo de dar la matraca a diestro y siniestro quiero decir, y así lo certifica mi DNI. Según han deslizado a mis oídos en repetidas ocasiones, ello sucedió debido a que tenía ya sobre la Tierra un hermano que, además de inmejorable, era ya algo insistente y me quería allí con él cuanto antes, aun sin ser yo, todavía, un mero esbozo en su imaginación.

Dicen que fue en uno de esos Noviembre gélidos, de los de antes, que transitaban con paso firme por el otoño, a esas alturas casi ya disfrazado de invierno, de la ciudad de Huesca. Para entonces mi madre ya me había llevado dentro en un paseo de nueve meses, por mucho que yo no fuera consciente de ello, habiendo incluso tenido un percance con el coche del que salí más o menos indemne a la vista de la lista de taras que acarreo. No obstante, allí estaba mi madre, fracturándose un pie en aquel episodio, seguramente por intentar amortiguarme el golpe aunque ella no me lo haya querido confirmar todavía. Después de semejante traqueteo gestacional, al fin, salí al exterior para ver qué se cocía en todo aquello que a duras penas me llegaba mientras flotaba a mi bola en líquido amniótico. Lo primero que me encontré fue a mi extraordinaria familia: mis padres, mi hermano, mis abuelos, mis tíos... Luego ya tropecé con las diferentes banderas y coches que poblaban los principios de los noventa, dos de mis primeras obsesiones infantiles que recuerdo como si de ayer se tratase. Cómo olvidar las banderas de Italia, Egipto o Nepal. Cómo omitir en mi ávida mente, la de entonces, modelos de coche como el Opel Kadett, los Renault 19 y 21, el Citroen ZX o aquel Ford Mondeo que con tamaña ilusión fui a recoger al concesionario acompañando a mi abuelo Diego, coche del que evoco incluso el olor que tapizaba su interior por entonces.

Gracias a mi familia tuve una infancia inmejorable. Gracias a mi madre, por su amor infinito, casi tan infinito como lo bonito de su existencia. Gracias a mi padre, por su bondad inquebrantable y sus buenas caras a los malos tiempos, por su inagotable capacidad de esfuerzo a cambio del bienestar de los suyos. Gracias a mi hermano, por hacerme nacer y cuidarme desde que nací, por entenderme como a una extensión de sí mismo. Gracias a mi abuela María, por haber sido todo lo que una abuela debería ser. Gracias a mi abuelo Diego, por haber sido un referente, por servir al concepto de señor como ejemplo viviente y por demostrarme con su particular historia que la grandeza de un ser humano es independiente de su origen y de su formación. Esto último me quedará grabado en la conciencia de por vida, a fuego, a hierro, con martillo y cincel, láser e, incluso, en alguna recóndita zona de mi genoma reservada para dicho cometido. Gracias también a mi tío José, a mi tía Tere y a mis primos, llegados con posterioridad para colorear aquellos inolvidables veranos embebidos en una, por extraña que parezca, agradable mezcla de sal marina, comida de la abuela y arena de playa. En definitiva, gracias a las innumerables suertes que me han ido acompañando desde que nací pude ser un niño feliz, alegre y, aunque resulte difícil de creer, tan dicharachero como tímido. De hecho, en cierto modo, no he dejado de ser aquel mocoso del que hablo con un evidente deje de nostalgia, propiciada por la ausencia de los que se encuentran, hoy en día, en algún lugar cerca de no sé dónde, pero que innegablemente está más lejos de lo que necesito. Así son las leyes de la vida, dicen, y con eso nos quedaremos, unos al abrigo de lo que dicen según qué credos, otros en el erial marxista de Sartre y otros, entre los que quizá los días impares me incluya, en la ladera del Sísifo de Camus, he de decir que por mera cuestión de simpatía. En lo que a mí respecta, quizá a causa de esa innata tozudez aragonesa, soy muy de empujar piedras cuesta arriba pese a que sea consciente de la inutilidad del asunto, pero eso ya es harina de otro costal.

Aquellos tempranos años también fueron los que me permitieron conocer a la amplia mayoría de mis amigos, en la época en la que comencé a arrancar hojas del calendario a través de los diversos trimestres que me deparó el plan educativo del momento, cuyo célebre acrónimo, LOGSE, tanto pie dio a chascarrillos entre los asiduos al carajillo de la época. Loren, Jos, Jony, Ciri, Lucho, Nako, Zamo, Dani y Domy, más tarde completados, en lo que en el argot futbolístico equivaldría al mercado de fichajes de invierno, por Ome, Laca o Ana. Tal elenco estelar es también parte consustancial de mis días y, en alguna que otra ocasión, de mis noches. Junto a semejante turba he tenido el placer de

desarrollarme y, de momento, ello nos está deparando resultados harto positivos puesto que, por ahora, ninguno ha sido desposeído de su libertad, públicamente fustigado o abandonado a su suerte en el océano Índico, pese a lo bien que nos lo hemos podido pasar durante todos estos lustros en fechas tan especiales como nuestras amadas fiestas de San Lorenzo o nuestros amados días cualesquiera de cualquier año. Francamente, estoy seguro de que la justicia cósmica ha encontrado compensación a todas nuestras fechorías y todas nuestras torpezas en lo mucho que, de corazón, nos hemos apoyado así como en lo poco (o nada) que nos hemos fallado. Acompañándome hasta el día de hoy también se encuentra mi querida Teresi, de la que difícilmente espero que llegue a leer estas líneas algún día por su idiosincrasia tan única e irrepetible como insustituible. De las que sí espero lectura, al menos de este apartado, es de Raquel y Teresa, Teresa y Raquel, mis fans número 1 y 2, 2 y 1, 1 y 1, y 2 y 2, de las que yo, exclusivamente yo, soy fan número 1, para suerte mía, en nuestro poliamor millennial.

De la mano de tal cantidad de anécdotas previas que no viene al caso narrar, y acompañado de las que vinieron durante y después, llegó la etapa del instituto y la posterior universidad. No muy enterrado en mi memoria se encuentra el día en que mi profesora de biología del bachillerato, cuyo nombre a duras penas recuerdo, me sugirió que, ya que el lenguaje matemático del que se sirve la física nunca había sido santo de mi devoción, quizá debía decantarme por formarme en alguna ciencia relacionada con las bases elementales de la vida. Más allá de tratarse de un simple barrido hacia su terreno, cosa que creo que no fue el caso, ella, aparentemente desinteresada, decidió darme uno de los mejores consejos que quizá haya recibido en cuanto a mi profesión. Huelga decir que tal capacidad de adivinación no se derivó de bola de cristal alguna ni de capacidades sobrenaturales como las de Aramis Fuster, sino que se sustentó en las inquietudes intelectuales que había ido transmitiendo a lo largo de mis días, que principalmente se centraban en la comprensión de dos mecanismos sumamente intrincados presentes en nuestro universo: el tiempo y la vida. Casualidades de esta última, en mi actual campo de investigación, la senescencia celular, ambos conceptos convergen y caminan ineluctablemente cogidos de la mano. Cosas que pasan.

Sin ser capaz de ensoñar siquiera un día como el de hoy me dejé caer por Lleida allá por el 2009 para zambullirme en las listas de matriculados en el grado de Biomedicina, tan imberbe como yo por aquel entonces, dando comienzo a una nueva etapa apartado del

regazo de mamá. Por definirla de alguna forma, aquella fue la época en que mi querida Celia y yo probamos todos los medios de transporte conocidos para ir y venir de Huesca cada vez que la semana agonizaba de cara al fin de semana. Por tierra, mar y aire. Por ríos, sendas, puentes colgantes e, incluso, cañadas reales. Atravesando tupidas junglas tropicales, arenas movedizas traicioneras, tundras siberianas quebradizas desprovistas de permafrost, ruinas persas como las de Samarcanda, desiertos monegrinos o espesas neblinas que ni en la Terranova canadiense. A decir verdad sólo nos faltó, a modo de vírgenes María, montar a lomos de una burra bíblica. No siempre (por no decir casi nunca) fue en condiciones óptimas dado que, además de estudiar lo menos posible, siempre tratamos de dar “paseos nocturnos” el máximo de días que permitiera nuestra economía. Siempre bien acompañado de amigos perennes con los que me encontré en aquella diminuta facultad como Marc, José, Guillem, Antón, Dani o nuestro querido azteca Gabi, hacíamos acopio de todas las historias que, llegado un día, poder contar aunque, por su bien, probablemente no sea a nuestros futuros retoños.

A un lado del sendero que se trazaba a lo largo de mi periodo universitario, más cerca del final que del principio, descubrí el lugar que me iba a acoger durante seis intensos años para la realización, entre muchas otras tareas, del trabajo condensado en las páginas venideras. En mi primera aproximación medio sería al mundo de las micropipetas, los microscopios y las microvictorias, bajo la tutela de Xavi en unas prácticas de Julio enclavadas en Septiembre, descubrí en mi posterior segundo laboratorio (si así se me permite denominarlo), el de los patoncos, la magia presente detrás de colocar cinta adhesiva apropiadamente para hacer geles de agarosa, rellenar alguna caja de puntas o hacer genotipados de ratón. De ella fui partícipe, en mis inicios, gracias a la inestimable ayuda de Cris Mirantes y de Núria. Sin apenas tiempo para, como diría alguno, comerme el bocadillo, crucé el pasillo para comenzar a dar pasitos, progresivamente más y más firmes, dentro de las cinco paredes del laboratorio 2.8. Alicatados con neveras, cajas de material, éxitos, fracasos, risas, llantos y conversaciones de todo tipo, temática y tono, los tabiques de aquel hogar durante seis años me han visto de todas las maneras posibles y han desbastado, en la medida en que he permitido que así fuera, algunos de mis contornos más irregulares. Todavía no siento desvanecida la imagen que fotografié mentalmente el primero de los días que acudí al laboratorio de Mario. Después de ir a buscarle a su despacho, recuerdo cómo imité sus pasos a través del pasillo de la segunda planta, camino del laboratorio que, desde esa perspectiva, queda al fondo a la

izquierda, justo antes de unas escaleras que subían a no sé dónde y bajaban hacia algún lugar todavía por explorar. Recuerdo que pensé en toparme, inmerso en absurdos prejuicios, poco menos que con la filarmónica de Viena. Ya en el laboratorio, el aire movido por los siempre tan reconocibles pasos de Mario pareció dispersar tales suposiciones previas. Una mujer alzada por unos zapatos con tacón de pelo extremadamente acaracolado, Myriam; un evidente torbellino de sincera naturalidad, una hermana mayor en toda regla, mi adorada Anna; y, por último, una chica cuyo piercing en el labio inferior me impactó más que ver a un Cristo con una AK-47, más que una hermana mayor una suerte de compañera bivitelina, con lo bueno y lo malo de los hermanos de edades cercanas, mi querida Marta. Creo que, debido a la sinceridad contenida en todas y cada una de las líneas escritas en este apartado, sornas aparte, no sorprenderé a nadie si desarrollo algo más el papel de las dos mentadas en último lugar. Anna, de la cual he aprendido desde el modo en que se cultivan células hasta la manera en que se ha de actuar consecuentemente con lo que uno piensa, pasando por la forma en que se utiliza un sacaleches. Marta, de la que aprendí todo lo demás, con la que más risas y llantos he compartido entre esas cinco paredes y a la que estaré eternamente agradecido por las ganas de cuestionar todos y cada uno de mis planteamientos, casi tan fuertes como las de que tuviera éxito en cada uno de ellos. Por supuesto, aunque no forme parte de mi amarilleada foto primigenia del laboratorio, sería incapaz de omitir a Sara, que más allá de los vínculos fraternales arriba expuestos ha sido para mí una madre adoptiva, una cariátide esencial en tantos días difíciles. Qué decir de Joan, con su inimitable y genuina manera de aparecer de vez en cuando, que, por bien que se conserve, me ha hecho sentir algo así como un nieto de adopción debido a su predisposición a ayudarme en cada una de las ocasiones que haya podido requerirlo. En el atardecer de mi transcurso por el laboratorio, la cigüeña de París trajo a mi hermanita pequeña, Gisela, a la cual le guardo mis mejores deseos y le reservo todos los minutos que necesite de mis humildes consejos de abuelo cebolleta, de aquí en adelante, in saecula saeculorum. Incluso Marta Hereu, presente los lunes y martes tardíos, a la que agradezco toda la ayuda que buenamente me ha ofrecido siempre. Quiero destacar el papel imprescindible de la bondad interesada de todas las compañías de reactivos, bien sea a través de anticuerpos o de fármacos, que con su inefable generosidad, a coste cero, han permitido que, con una picaresca española digna del Lazarillo de Tormes, haya realizado una buena parte de los experimentos que pueblan la sección de resultados de esta tesis doctoral. Por último, Mario, al que siempre estaré agradecido por confiar en mis

posibilidades, por darme la oportunidad de descubrir la mayor de mis pasiones y por enseñarme a transitar sin ruedines sobre esta cada vez menos pesada bicicleta, aunque no fuera para soltarme acto seguido por terrenos cómodos y planos, precisamente. He de confesar que, no obstante, como ciclista, siempre he sido más bien de ascender en solitario puertos de cada vez mayor entidad, por lo que no vacilo en reconocer que, en el fondo, ha resultado tan entretenido como enriquecedor.

Hablando de puertos, y antes de salir al pasillo de la segunda planta, se me ha venido a la mente, taciturno, uno de esos momentos que aguardan agazapados entre mis recuerdos. Supongo que, llegados a este punto, y dadas las circunstancias, se me concede la licencia de disponer de un pequeño paréntesis escasamente hilado, al estilo del jubilado prototipo. Sucedió que un día, acurrucada bajo una tupida niebla y bañada por el sol en su cumbre, una de las subidas míticas del ciclismo, el Tourmalet, esperaba a ser escalada por un grupo de zopencos que formé con algunos de mis mejores amigos. Tras lidiar con alguna que otra calamidad, al culminar nuestra humilde epopeya, la sensación de épica obtenida fue tal que, como buenos oscenses, de vuelta a nuestro apartamento francés decidimos ponernos hasta el culo de longaniza de Graus para reponer todo lo vaciado en aquellas laderas. Siendo sincero, todavía no soy consciente de lo que habré desalojado en las laderas que he atravesado a lo largo de esta tesis doctoral, pero a Dios, Jehová, Yahvé, el Espíritu Santo y Vishnu pongo por testigos de que no tardaré en celebrarlo con un embutido grausino kilométrico acorde a la dimensión de lo sufrido, a poder ser a la brasa.

No hace falta abrir la puerta porque siempre se ha hallado abierta. Todo recto, saliendo del 2.8 se encuentra, primero, el acceso que conduce a los ultracongeladores y, a uno y otro lado de dicho rincón tenazmente custodiado por Jacinto, dos pasillos que desembocan en el laboratorio de los patoncos. Como antes he tratado de expresar, y más si cabe hacia mi etapa final, el laboratorio por el que han pasado mis queridas Cris Mirantes o Mari Alba, aquél en el que todavía, por fortuna, invierten sus horas personas a la que adoro como Cris Megino, Raúl, Isidre, Carla, Anna, Núria, Izaskun, Pol o Andree, ha servido de refugio para la mayoría de mis inquietudes. A nadie engaño si admito que jamás voy a encontrar amigos de laboratorio que me muestren un desprecio tan adorable e insustituible como el que con arte me dedican Cris y Raúl, que me abracen y me aconsejen en la forma en que lo hace Carla, que ejerzan conmigo de ojeadores

deportivos y sobre todo no deportivos tan cómplices como Isidre, o que me escuchen sin necesidad de cita previa como Anna y Núria. Fuera de esos muros me he topado también con los corazones de amigos tan maravillosos como Marta y Oscar. He compartido momentos que siempre guardaré con gente como Mireia, Gisel, Aida, Anna Visa o Lía. Las interminables sesiones de campana de Nati, los gritos de pizzero de Paolo o los saludos de surrealismo amable con aroma a curry de Soni también forman parte del zurrón en el que transporto todos los instantes vividos durante estos años. Cada tarde he dispuesto también de la maternal visita de Loli, principal culpable de que el último día de trabajo abandonara el edificio con los ojos arrasados en lágrimas. Con todos los nombrados, aparte de muchos otros como mi querida Mónica, Èlia, Mariona, Tania, Rebeca o Nat, han sido unas cuantas las experiencias que he tenido la suerte de escribir en mis, todavía por publicar, memorias autobiográficas, de las que este parco prefacio sirve como experimento preliminar.

En algún bendito momento se abrieron las nubes que cubren a la pérfida Albión para recibir el vuelo Barcelona-Newcastle. En algún bendito instante, después de esconderse el azul del cielo tras una densa cortina grisácea, aterricé en una ciudad del norte de Inglaterra en la que aguardaban gran cantidad de momentos por transcurrir. Allí estaba, tan sorprendentemente abrigado a esas alturas del año como inesperadamente sonriente mi, a partir de entonces, adorado David. Tras una agradable conversación en el metro, camino del centro, recuerdo cómo me acompañó a la inmobiliaria en la que había alquilado el que sería mi alojamiento durante los meses siguientes. Una vez obtenidas las llaves, atravesando unas cuantas calles sombrías, llegamos al edificio en cuestión, The Foundry, donde un afable conserje de ojos rasgados, Jerry, nos estaba esperando. Nos condujo al apartamento 424, número hacia el que David confesó tener especial predilección debido a sus años en Nueva York investigando sobre el micro RNA engalanado con dicha numeración. De pronto, al abrir la puerta de la habitación, emergió en furtiva huida un aroma nauseabundo que a ambos produjo cierta desazón, lo que para el cristiano medio se traduce en arcadas. Algún querido inquilino previo había olvidado pescado en el congelador de aquel apartamento, así como algún querido encargado de su limpieza, unas semanas antes de que Jerry abriera la puerta de la 424, no se percató de semejante obsequio, que aunque marino o fluvial en algún momento, en aquel instante pertenecía ya al mundo de lo muy asqueroso. Durante los días que necesitó aquel hedor para disiparse fui conociendo al resto de personas que me acompañaron en

aquella etapa, en principio incierta, en definitiva imborrable. Junto a David, mi querida Ruth me acogió y me ayudó como jamás hubiera esperado en aquel casi desnudo laboratorio que empezamos a vestir entre los tres. Ellos terminaron de aclarar la turbidez causada por las pocas dudas acerca de mi vocación científica que pudiera tener en aquel momento, fueron un rayo de luz deslizándose por entre lo nublado de mis temores, un soplo de viento fresco que refrigeró alguno de mis resquemores y, ante todo, un ejemplo inspirador de lo que algún día querría llegar a ser. Todo ello aderezado de su cariño impagable día tras día e historieta tras historieta de las que yo confesaba que me iban sucediendo en mis disparatados fines de semana al estilo Geordie. Mejor rodeado que Julio Iglesias por culpa de Carme, Nuria, Vicky o Marga, además de colegas como Rubén, confeccionamos una magnífica serie de desmadres que acortaron sensiblemente la duración perceptible de aquellos meses en el territorio de Geordie Shore.

De vuelta, como el turrón, me fui a casa por Navidad. Y de aquellas ganas infinitas de paladear tortilla, jamón, croquetas, patatas bravas, vino decente y abrazos de los míos hasta hoy. Disfrutando de cada mañana, cada tarde y cada noche, despierto o no. Sin saber qué me depararán los movimientos venideros de las agujas del reloj pero al amparo del amor de mis imprescindibles que, aunque pocos, son inigualables. Sin embargo, y como bien reza uno de los “pecios” de mi admirado Sanchez Ferlosio:

«Rebato de la muerte anticipada,  
corroborante vida desvivida,  
sibila del futuro acontecido.  
La serie de los días futuridos  
degrada en una sucesión minuenda,  
precipitar de restas hacia el cero.  
Y el ojo del presente van cegando  
con su flecha lanzada hacia el futuro.»

Por lo que, como expresa un célebre latinajo que algún amigo mío ha llegado a exhibir como estado de WhatsApp, centrémonos en el capítulo del hoy, y ya vendrá lo que tenga que venir. Take it easy.

No me olvido de decir que, durante alguno de los últimos episodios que he ido relatando sucedió que, repentinamente, me encontré con una mirada que no esperaba encontrar. Me topé con los ojos que de manera más dulce y especialmente atenta hayan seguido los pasos que he ido dibujando a lo largo de todos los párrafos anteriores. Cometí el maravilloso descuido de dejar que Andrea me acompañara a pinchar unos ratones un día tonto de Enero y tuvo la acertada idea de ponerse a sonreír como sólo ella sabe hacer, detrás de una mascarilla en aquella ocasión. Lo demás ya vino solo.



# Índice



Resúmenes.....	29
Introducción.....	35
LA FAMILIA DE GENES SPROUTY .....	37
ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA SPROUTY .....	37
Estructura y regulación de las proteínas Sprouty .....	37
Mecanismos de acción de las proteínas Sprouty.....	45
FUNCIONES DE SPRY.....	48
Sprouty en el desarrollo embrionario.....	48
Papel de Sprouty en cáncer .....	52
Sprouty y senescencia celular.....	56
LA SENESCENCIA CELULAR.....	63
INDUCTORES DE SENESCENCIA CELULAR .....	64
Senescencia replicativa (Replicative senescence, RS).....	65
Senescencia inducida por daño al DNA (DNA damage-induced senescence, DDIS).....	66
Senescencia inducida por estrés oxidativo (Stress-induced premature senescence, SIPS).....	66
Senescencia inducida por oncogenes (Oncogene-induced senescence, OIS).....	67
CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS SENESCENTES.....	68
Inhibición del ciclo celular (Senescence-associated growth arrest, SAGA).....	68
Fenotipo secretor (Senescence-associated secretory phenotype, SASP) .....	70
Modificaciones estructurales de la cromatina (Senescence-associated heterochromatic foci, SAHF) .....	73
Actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia (Senescence-associated beta-galactosidase, SAbetaGal).....	74
Alteraciones metabólicas de las células senescentes.....	75
Fenotipo dinámico de las células senescentes .....	77
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE MODULAN LA SENESCENCIA .....	82
DNA damage response (DDR).....	82

p53.....	83
p38 MAPK.....	84
AKT - mTOR.....	89
NFkB .....	91
Resistencia a apoptosis.....	92
SENESCENCIA CELULAR IN VIVO .....	98
Regeneración tisular.....	98
Supresión tumoral .....	100
Desarrollo embrionario .....	102
Soporte a la iniciación y progresión tumoral.....	104
Envejecimiento .....	107
<b>Objetivos.....</b>	<b>113</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>117</b>
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	119
Consideraciones previas .....	119
Ratones knockout para Spry1 .....	119
Ratones Flpe .....	120
Generación de los ratones knockin Spry1 Y53A .....	120
Genotipado de ratones.....	120
Producción de heridas cutáneas.....	121
Inducción de senescencia con doxorubicina .....	122
Ensayo luciferasa ratón p16-3MR.....	122
Extracción de suero .....	122
CULTIVOS CELULARES .....	123
Cultivo de la línea celular HEK 293T .....	123
Cultivo de las células IMR90 .....	123
Cultivo primario de fibroblastos dérmicos de ratón .....	123
PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS .....	124

Construcciones plasmídicas: generación de vectores lentivirales de sobreexpresión de proteínas.....	124
Transformación bacteriana .....	126
Transducción lentiviral .....	127
Transfección y producción de lentivirus en la línea celular HEK293T .....	127
ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN .....	128
Recuento celular mediante el sistema 3T3 .....	128
Ensayo de incorporación de Bromodeoxyuridina .....	128
Cristal violeta .....	129
PCR EN TIEMPO REAL: RT-qPCR .....	129
Extracción de RNA .....	129
Síntesis de cDNA .....	129
RT-qPCR .....	130
INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS .....	132
Western Blot.....	132
Histología y técnicas de inmunodetección .....	134
Actividad Beta-galactosidasa asociada a la senescencia .....	136
ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO .....	137
Obtención de las muestras .....	137
Análisis de los datos mediante Gene Set Enrichment Analysis (GSEA).....	137
Heatmaps de expresión de genes seleccionados .....	137
<b>Resultados .....</b>	<b>139</b>
La mutación Y53A desvela la relevancia de Spry1 en la senescencia celular relacionada con el envejecimiento .....	141
El efecto beneficioso de la senescencia en un contexto de reparación de heridas cutáneas también requiere de la integridad de Spry1.....	146
Los fibroblastos dérmicos obtenidos de ratones Spry1 Y53A/Y53A evitan el establecimiento de senescencia celular prematura causada por estrés .....	148

Las proteínas Spry son inducidas a consecuencia de todos los estímulos clásicos desencadenantes de senescencia celular. ....	150
La expresión ectópica de Spry en IMR90 es suficiente para inducir senescencia celular. ....	153
La expresión ectópica de Spry1 induce un tipo senescencia celular que carece de SASP inflamatorio .....	155
La senescencia inducida por Spry1 no es debida a la inhibición de la vía ERK y activa p38.....	157
La mutación de la tirosina 53 de Spry1 entorpece la activación de p38 en distintas fases de la senescencia celular .....	161
La tirosina 53 de Spry1 sólo es requerida para la activación de p38 en un contexto de senescencia y no para su inducción aguda.....	164
La vía p38 es esencial para la inducción de senescencia por parte de Spry1 y Spry2 en IMR90 .....	165
La activación de la vía p38 por parte de Sprouty es esencial para la inducción de senescencia en los distintos contextos analizados previamente .....	166
El tratamiento con inhibidor de p38 no disminuye los niveles de Spry1, sino que además revela la contención que realiza la vía p38 sobre su inducción .....	169
La vía p38 reprime los niveles de Spry1 en la fase inicial de la senescencia pero no en la final .....	170
La proteína Spry1 se acumula por estrés oxidativo y sus niveles son contenidos por la vía p38.....	173
El análisis transcriptómico de fibroblastos dérmicos de ratón confirma que la activación de p38 por parte de Spry1 es necesaria para la correcta inducción de elementos de la fase inicial de la senescencia.....	178
La fase inicial de la respuesta senescente dependiente de la activación de Spry1-p38 guarda grandes similitudes con la senescencia programada en el desarrollo.....	182
La mutación Y53A presente en la etapa inicial de la senescencia en fibroblastos dérmicos es capaz de alterar otros aspectos asociados a las células senescentes.	184
La activación del eje Spry1-p38 en respuesta a estímulos estresores favorece la inducción de senescencia frente a la de apoptosis.....	185

Discusión.....	191
Conclusiones.....	213
Bibliografía.....	217



# Resúmenes



Los miembros de la familia de proteínas Sprouty (Spry1-4) han sido clásicamente descritos como elementos inhibidores de la señalización iniciada por los receptores tirosina quinasa. En un amplio abanico de tipos celulares, los distintos miembros de Sprouty son capaces de reprimir procesos como la proliferación y, por ello, han sido reiteradamente propuestos como supresores tumorales. Por otro lado, la senescencia celular es una respuesta dinámica en la que las células deciden abandonar su capacidad proliferativa al verse sometidas a cierto nivel de estrés. Las células senescentes, además, producen un amplio abanico de factores que secretan para influir sobre el entorno próximo, comúnmente conocido como SASP. Trabajos previos realizados en nuestro grupo demuestran que Spry1 promueve la inducción de senescencia celular en tiroides sin influir sobre la vía ERK. Además, la generación de un modelo knockin de ratón que alberga una mutación de la tirosina 53 de Spry1, la Y53A, revela la implicación de Sprouty en la correcta inducción de la senescencia programada presente en el desarrollo adecuado del sistema genitourinario. Para ampliar el conocimiento acerca de la implicación de Spry en los distintos procesos in vivo asociados a la senescencia, hemos decidido explorar en el ratón Y53A paradigmas celulares como el envejecimiento o la regeneración de tejidos. En primer lugar, desvelamos cómo los distintos marcadores de senescencia celular se hallan presentes en menor medida en ratones Spry1 Y53A envejecidos cuando los comparamos con ratones wildtype. También, en un contexto de cicatrización de heridas cutáneas, el papel de Spry1 es clave para la inducción de senescencia requerida para la adecuada ejecución del proceso regenerativo. Por otro lado, la senescencia derivada del tratamiento con quimioterapia, perjudicial para las células sanas, se halla disminuida en presencia de la mutación Y53A. En definitiva, Spry1 es parte esencial de la senescencia celular en los diferentes ámbitos en que la hemos estudiado. Por otro lado, hemos desvelado que Spry1 y Spry2 se inducen en la respuesta senescente ante todos los estresores típicos que la desencadenan. Concretamente, la inducción de Spry1, de manera sorprendente, depende directamente del estrés oxidativo, mientras que la de Spry2 está regulada por la vía ERK. A nivel molecular, las proteínas Sprouty potencian la activación de p38 requerida por las células senescentes para la adecuada expresión de la mayoría de sus efectores como los inhibidores de ciclo o los distintos elementos del SASP. En concordancia, algunos de los contextos de senescencia en los que Spry1 es necesario requieren también del correcto funcionamiento de p38. Por tanto, los resultados descritos confirman a las proteínas Spry como mediadores generales de la senescencia celular.

Els membres de la família de proteïnes Sprouty (Spry1-4) han estat clàssicament descrits com a elements inhibidors de la senyalització iniciada pels receptors tirosina quinasa. A més, la implicació d'aquesta família de gens ha estat revelada en contextos fisiològics i embrionaris dispars. En un ampli ventall de tipus cel·lulars, els Sprys són capaços de reprimir processos com la proliferació i, per això, han estat reiteradament proposats com a supressors tumorals. D'altra banda, la senescència cel·lular és una resposta dinàmica en la qual les cèl·lules decideixen abandonar la seva capacitat proliferativa en veure sotmeses a cert nivell d'estrès. De manera essencial, les cèl·lules senescent, a més, produeixen un ampli ventall de factors que secreten per influir sobre l'entorn proper conegut com SASP. Treballs previs realitzats en el nostre grup demostren que Spry1 promou la inducció de senescència cel·lular en tiroide sense influir sobre la via ERK. A més, la generació d'un model Knockin de ratolí que alberga una mutació de la tirosina 53 de Spry1, la Y53A, ha revelat la implicació de Spry en la correcta inducció de la senescència programada present en el desenvolupament adequat del sistema genitourinari. Per ampliar el coneixement sobre la implicació de Spry en els diferents processos on la senescència cel·lular apareix in vivo, vam decidir explorar en el ratolí Y53A contextos relacionats amb la senescència com l'envelliment o la regeneració de teixits. En primer lloc, desvetllem com els diferents marcadors de senescència cel·lular es troben presents en menor mesura en ratolins Spry1 Y53A envellits quan els comparem amb ratolins wildtype. També, en un context de cicatriçació de ferides cutànies, el paper de Spry1 és clau per a la inducció de senescència requerida per a l'adequada execució d'aquest procés regeneratiu. En definitiva, Spry1 és part essencial de la senescència en els diferents processos en què aquesta es troba present. D'altra banda, hem revelat que Spry1 i Spry2 s'indueixen en la resposta senescente davant tots els estressors típics que la indueixen. Concretament, la inducció de Spry1 depèn de l'estrès oxidatiu mentre que la de Spry2 està regulada per la via ERK. A nivell molecular, les proteïnes Spry potencien l'activació de p38 requerida per les cèl·lules senescent per a l'adequada expressió de la majoria dels seus efectors com, per exemple, els inhibidors de cicle o els diferents elements del SASP al llarg de totes les fases de la senescència cel·lular. En concordança, alguns dels contextos de senescència en què Spry1 cal requereixen també del correcte funcionament de p38. Per tant, els resultats descrits confirmen als Sprys com a mediadors generals de la senescència cel·lular i els desvetllen de manera definitiva com a actors clau d'aquest procés cel·lular.

Members of Sprouty family of genes (Spry1-4) have been classically assumed to be inhibitors of signaling initiated by receptor tyrosine kinases. Spry genes have been involved in various physiological and developmental processes in a cell-specific and context-dependent manner. As such, they restrain proliferation of many cell types and have been proposed as tumor suppressor genes in certain types of cancer. On the other hand, cellular senescence is a dynamic response in which cells decide to cease their proliferation in front of different cellular stresses. Moreover, senescent cells implement the production of a myriad of factors that are secreted to influence their proximal environment, known as senescence-associated secretory phenotype (SASP). Previous data from our group demonstrate that Spry1 promotes cellular senescence in the thyroid gland, but in an ERK-independent manner. Furthermore, analysis of a knockin mouse expressing a Spry1 Y53A allele generated by our group revealed genitourinary abnormalities consistent with defective induction of programmed cellular senescence. To expand the knowledge about the implications of Spry genes in different cellular senescence scenarios, we decided to monitor some other senescence-related contexts in Spry1 Y53A mice such as age-related and regeneration-related senescence. First, we found that cellular senescence is less induced in aged Spry1 Y53A mice when compared with wildtype littermates. Also, cellular senescence induction is defective in skin wound healing from Spry1 Y53A mice. Finally, mutation of Spry1 prevents the appearance of some of the traits of chemotherapy-induced cellular senescence. Thus, Spry1 controls cellular senescence in some of the most relevant in vivo paradigms of cellular senescence. Moreover, we found that Spry1 and Spry2 are upregulated in cells facing several canonical senescence triggers. Surprisingly, Spry1 induction in the senescent response is controlled by oxidative stress, while Spry2, as expected, is regulated by ERK. Mechanistically, Spry proteins enhance p38 MAPK activation required for the proper induction of most of the traits of cellular senescence such as the expression of cell cycle inhibitors and SASP elements. Also, both chemotherapy- and wound-induced cellular senescence require p38 function to be fully accomplished. Hence, these results confirm Spry genes as novel, general mediators of cellular senescence.



# Introducción



# LA FAMILIA DE GENES SPROUTY

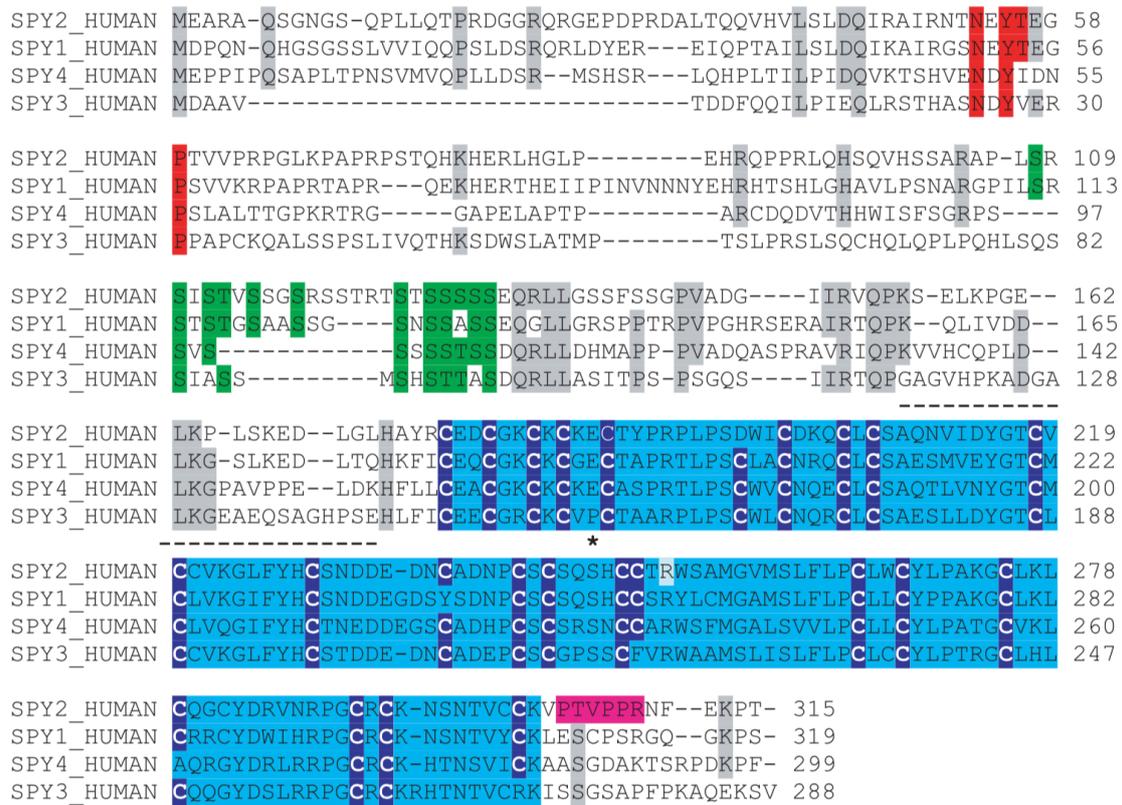
## ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA SPROUTY

### Estructura y regulación de las proteínas Sprouty

El miembro primigenio de la familia de proteínas Sprouty (Spry), el llamado dSpry por su descubrimiento en el organismo *Drosophila melanogaster*, fue identificado en un screening de genes implicados en el desarrollo embrionario de la tráquea (Hacohen, Kramer et al. 1998). La acción de dicho gen fue desvelada como crucial para la inhibición de una de las primeras vías de transducción de señal descritas en biología celular, aquella que encierra a los receptores tirosina quinasa (RTKs), Ras y ERK (Pearson, Robinson et al. 2001). Estudios posteriores identificaron cuatro genes ortólogos en mamíferos: Spry1, Spry2, Spry3 y Spry4, siendo Spry2 el miembro de la familia que manifiesta mayor semejanza con la función descrita en *Drosophila* en cuanto a la ramificación del pulmón (de Maximy, Nakatake et al. 1999).

Los cuatro genes identificados comparten entre sí y con el dSpry primigenio, estructuralmente, dos regiones en su secuencia. Por un lado, la parte N-terminal se caracteriza por una amplia divergencia entre los distintos miembros de la familia a excepción de un residuo de tirosina, la 53 en Spry1 o 55 en Spry2, que ha sido reiteradamente descrita como crucial para la regulación y la función de Sprouty, además de un dominio rico en serinas que se encuentra hacia la parte medial de las proteínas de esta familia (Guy, Jackson et al. 2009). Por otro lado, situado en la parte más C-terminal, los miembros de Sprouty muestran la presencia de un dominio rico en cisteínas descrito por primera vez en esta familia de genes y encontrado más tarde en multitud de proteínas como las SPRED (Wakioka, Sasaki et al. 2001), entre muchas otras (D'Cruz, Babon et al. 2013). En este dominio se albergan, además de las propiedades de translocación a membrana de estas proteínas a través de la interacción con la Caveolina (Cabrita, Jaggi et al. 2006), capacidades del todo desapercibidas como la de coordinar, formando complejos multiméricos, estructuras moleculares como los centros hierro-azufre (Wu, Alexander et al. 2005), adquiriendo por tanto la facultad de ejercer como sensores del

estado redox celular, función ampliamente descrita para este tipo de coordinaciones atómicas (Mettert and Kiley 2015).



**Figura 1. Comparación de las estructuras de los distintos miembros de Sprouty.** Los miembros de Sprouty, además de una tirosina fosforilable N-terminal, comparten ciertas regiones relevantes para su función como la zona rica en serinas y el llamado dominio Spry C-terminal, compuesto de un gran conglomerado de cisteínas. Obtenido de (Guy, Jackson et al. 2009).

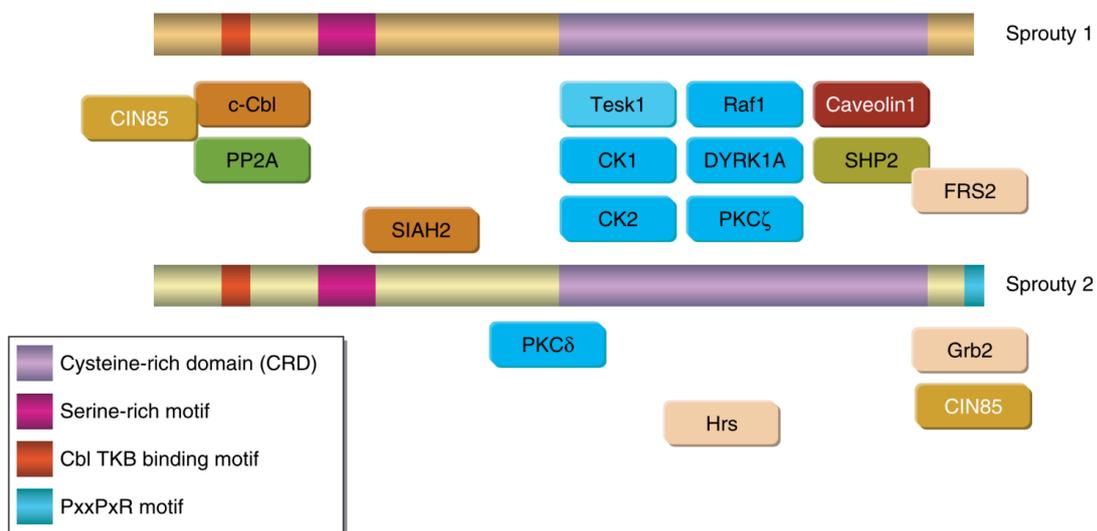
Entrando en un mayor nivel de detalle cabe mencionar que la primera de las partes de la estructura de Sprouty citada, la tirosina enclavada en la zona N-terminal, fue descrita como fosforilable por diversos estímulos activadores de RTKs en Spry2 en primer lugar (Hanafusa, Torii et al. 2002). Este primigenio estudio señala la fosforilación de la tirosina 55 de Spry2 como esencial para su unión inhibitoria con Grb2, elemento activador de las vías RTK, y sugiere que, al tener una secuencia aminoacídica circundante similar, la tirosina 53 de Spry1 es capaz también de realizar esta función. Sin embargo, dicha unión a Grb2 nunca ha sido descrita de manera directa en relación con la estructura proteica cercana a la tirosina 55. Además, otros estudios no han podido observar la interacción

entre Spry1 y Grb2 (Gross, Bassit et al. 2001), por lo que la estructura compartida entre Spry1 y Spry2 no parece ser responsable de dicha función. Más bien, como se describió con posterioridad, ese papel inhibidor de RTKs corresponde a la interacción de Spry2 en un dominio situado en el extremo C-terminal que, de manera relevante, sólo se halla presente en este miembro de la familia (Lao, Chandramouli et al. 2006), hecho que encaja con su mayor relevancia molecular como inhibidor de vías dependientes de RTKs. De hecho, el papel principal de la fosforilación de la tirosina 53 o 55 de los distintos componentes de esta familia es el de la interacción de éstos con la ubiquitin ligasa c-Cbl (Mason, Morrison et al. 2004), cuya principal función es la de poli o monoubiquitinar diversas proteínas (Levkowitz, Waterman et al. 1998), entre las que se encuentran los propios miembros de Sprouty (Wong, Lim et al. 2001).

Sin embargo, no todos los contextos en los que aparecen las proteínas Cbl implican la degradación proteasomal de la proteína con que interaccionan, pudiendo ejercer también de elementos de estabilización proteica (Schmidt and Dikic 2005). La interacción entre Cbl y los distintos Spry se da de manera muy potente tanto en el caso de Spry1 como de Spry2, mientras que Spry4, al carecer de una treonina fosforilable adyacente a la tirosina 55, muestra una interacción con Cbl sumamente débil en comparación con los otros miembros de Spry citados (Ng, Jackson et al. 2008). Por otro lado, el secuestro de Cbl por parte de Spry es capaz de impedir la ubiquitinización del receptor de EGF, favoreciendo así su activación (Rubin, Litvak et al. 2003). No obstante, cabe la posibilidad de que la función que se deriva de la interacción entre Spry1 y Spry2 con Cbl produzca distintos escenarios moleculares: puede que Cbl simplemente ubiquitine a Spry para controlar su acción en la célula, puede que los diferentes Spry dirijan la función de Cbl sobre la ubiquitinización de otras proteínas o, también, puede que los miembros de Sprouty se sirvan de Cbl a modo de estructura auxiliar que les permita la interacción con otras proteínas en caso de verse fosforilada su célebre tirosina N-terminal (Guy, Jackson et al. 2009). En el primero de los contextos, Cbl controlaría la función de Sprouty sobre los receptores tirosina quinasa, restringiendo así su acción inhibitoria una vez la señal extracelular haya desaparecido. En el segundo caso, Spry dirigiría la acción de Cbl sobre otras proteínas. Ello tiene precedentes en casos como la interacción entre c-Cbl y Grb2, en la que esta última media la unión de Cbl con FRS2/FGFR (Wong, Lamothe et al. 2002). El tercero de los escenarios implica la interacción, tras la fosforilación de la tirosina N-terminal, de los distintos miembros de Spry con otras proteínas a través de la ayuda estructural de Cbl. Existe un vasto catálogo de proteínas con las que Cbl interactúa sin

hacer uso de su actividad E3 ligasa de ubiquitina (Schmidt and Dikic 2005), siendo un claro ejemplo de ello el papel de Cbl en la señalización de insulina, en la que, al unirse a APS y al receptor de insulina, Cbl favorece la translocación de GLUT4 a la membrana celular (Hu and Hubbard 2005).

Además, y guardando una estrecha relación con Cbl, la proteína CIN85 (Cbl-interacting protein of 85Kda) es capaz de interactuar con Spry1 y Spry2 en una región unos pocos aminoácidos más allá de la tirosina N-terminal para facilitar la endocitosis de EGFR (Haglund, Schmidt et al. 2005). Cabe mencionar que, recientemente, se ha revelado cómo en un contexto celular que no conlleva la sobreexpresión de ambas proteínas mentadas, Cbl y CIN85, su papel como elementos reguladores de la señalización por EGFR es ciertamente prescindible para la célula, lo que llama, por lo menos, a cuestionar la función real de estas proteínas en un entorno celular fisiológico (Ahmad, Mohapatra et al. 2014). De hecho, más allá de la reiteradamente descrita función del complejo Cbl-CIN85 en la inhibición de EGFR (Soubeyran, Kowanetz et al. 2002), la interacción de estas dos proteínas ha sido hallada siendo partícipe de otras funciones como la potenciación de las vías TGFbeta (Yakymovych, Yakymovych et al. 2015) o p38 (Aissouni, Zapart et al. 2005), la organización del citoesqueleto (Sato, Taoka et al. 2007) o la inhibición de c-Met (Petrelli, Gilestro et al. 2002).



**Figura 2. Interactores descritos de Sprouty agrupados por dominio de interacción.** En la imagen aparecen varios de los interactores descritos de los Sprys enclavados en la zona de Spry que se relaciona con su interacción. Obtenido de (Guy, Jackson et al. 2009).

Otro de los interactores relacionados con la zona donde se halla la tirosina 53 es la fosfatasa PP2A (Lao, Yusoff et al. 2007). Esta proteína, conocida por su papel regulador en un amplio abanico de vías de señalización como Wnt, mTOR o las MAPK (Wlodarchak and Xing 2016), compite con c-Cbl por la interacción con la tirosina 53 de Spry1 o la 55 de Spry2. El acoplamiento descrito de PP2A en la estructura de Spry2, favorece la defosforilación de la zona rica en serinas situada unos residuos más hacia la zona medial de la proteína, influyendo así sobre el estado de activación de Spry2 en según que contextos celulares.

Como elemento de control negativo de la fosforilación de la tirosina N-terminal nos encontramos con la presencia de la fosfatasa SHP2. Esta proteína, en referencia a la vía de los RTKs, es necesaria para el correcto ensamblaje de la señal del receptor con la activación de la vía Ras/ERK (Araki, Nawa et al. 2003). Aparte de facilitar la transducción de la señal de los RTKs, SHP2 parece unirse a Sprouty para catalizar la defosforilación de su tirosina N-terminal (Hanafusa, Torii et al. 2004), contribuyendo así de manera adicional a la activación de este tipo de señalización mediante su entrometimiento en la función inhibitoria de Spry (Jarvis, Toering et al. 2006). Sin embargo, partiendo de que las aproximaciones experimentales que determinan la relación de SHP2 y Spry se han realizado en un contexto de sobreexpresión difícilmente extrapolable a lo fisiológico, otro estudio señala la necesidad de cuestionar la veracidad de este tipo de interacción en un entorno celular normal (Chan, Kalaitzidis et al. 2008). De hecho, ninguno de los ratones con mutaciones inactivadoras de los distintos miembros de Spry muestran un fenotipo similar al síndrome de Noonan, enfermedad en que la mitad de los pacientes que la sufren albergan en su genoma una mutación del gen PTPN11 que codifica para SHP2 (Tartaglia, Mehler et al. 2001). Resulta además reseñable cómo la mutación de algunos miembros de la familia SPRED, que comparten el dominio descrito de interacción con SHP2, la región C-terminal rica en cisteínas, con los Sprouty, muestran algunas de las características del síndrome de Noonan, manifestando así una mejor candidatura en cuanto a ser los verdaderos interactores de SHP2 en un contexto celular fisiológico (Chan, Kalaitzidis et al. 2008).

Encaminándonos hacia la parte medial de las proteínas Spry, todavía en la zona N-terminal, nos topamos con el dominio rico en serinas fosforilables, acompañadas de alguna que otra treonina (Guy, Jackson et al. 2009). Estas serinas, concretamente la 112 y la 121 de Spry2, son fosforiladas por la quinasa Mnk1 (DaSilva, Xu et al. 2006),

promoviendo la estabilización de Spry e impidiendo de alguna manera su degradación proteasomal. Uno de los mecanismos planteados para este cometido es a través de la disminución de la afinidad por Cbl cuando las serinas están fosforiladas, interrumpiendo así la poliubiquitinización de Spry por la fosforilación de la tirosina N-terminal. No obstante, existe otro estudio que señala un papel contrario de las serinas fosforiladas, esta vez por Mnk2, en cuanto a la estabilización de Spry2, favoreciéndose la degradación vía proteasomal a través de la ubiquitinización por Nedd4 (Edwin, Anderson et al. 2010). Nedd4 es, además, un conocido interactor de Cbl así como un regulador negativo de la vía Notch (Sakata, Sakaguchi et al. 2004). Los trabajos relacionados con los dominios ricos en serinas de Spry ponen de manifiesto que el papel de la fosforilación en estas regiones de los Spry es ampliamente controvertido y dependiente del modelo utilizado, por lo que la extrapolación más sensata es la de que afectan a su estabilidad, puesto que al parecer dependen de otros factores a tener en cuenta en cada contexto celular (Joshi and Plataniias 2014). Como ya se ha citado con anterioridad, la fosfatasa identificada como responsable de la defosforilación de estas serinas es la PP2A (Lao, Yusoff et al. 2007).

En la zona N-terminal de Spry también se da cita otra ubiquitin ligasa, Siah2 (Nadeau, Toher et al. 2007), cuya actividad sobre Sprouty no requiere la fosforilación de la tirosina conservada como sí sucede en el caso de Cbl. En un experimento de sobreexpresión, el aumento de los niveles de Siah2 es capaz de conducir a la degradación proteasomal de Spry1, Spry2 y, en menor medida, de Spry4. Otro estudio que habla de la inducción de Siah2 por parte de la vía p38 en un contexto de inhibición por contacto resalta cómo los niveles de Spry2 se ven disminuidos por la acción de esta ubiquitin ligasa, posibilitando la parada reversible del crecimiento en células confluentes (Swat, Dolado et al. 2009). Aparentemente en el mismo sentido, ha sido descrito cómo la inducción de TGFbeta es capaz de disminuir los niveles de Spry2 también en un contexto de quiescencia (Ding, Shi et al. 2007), lo que en un principio llevaría a especular a que dicha disminución dependiera de uno de los mecanismos descritos para TGFbeta, como es la activación de p38 mediante TAK1 (Yu, Hebert et al. 2002). Sin embargo, en este caso parece que la modulación de los niveles de Spry2 por parte de TGFbeta es adicional a los efectos de p38 sobre Spry2, puesto que la inhibición de p38 con SB203580 no rescata el efecto de TGFbeta sobre Spry2 a tanto a nivel transcripcional como postraduccionial. De hecho, un estudio del mismo grupo señala cómo también la vía p38 tiene un efecto sobre los niveles de traducción de Spry2 (Ding and Warburton 2008).

Existen otros interactores adicionales que son capaces de regular elementos de la estructura N-terminal de Spry como, por ejemplo, la treonina 75 por parte de Dyrk1a. Esta proteína posee actividad quinasa capaz de entorpecer la función inhibitoria de Spry2 sobre los RTKs a través de la deposición de una fosforilación en dicha treonina (Aranda, Alvarez et al. 2008). Otro de los interactores desvelados es Tesk1 (Leeksma, Van Achterberg et al. 2002). En este caso, la unión descrita de esta proteína con Spry4 y, más tarde, con Spry2 parece despertar ciertas dudas puesto que no se ha terminado de detallar la relación mecánica exacta existente entre los Sprys y Tesk1, pudiendo ser la zona rica en serinas una de las dianas de Tesk1 en la estructura de Spry, pese a la ausencia de pruebas concluyentes al respecto (Chandramouli, Yu et al. 2008).

La otra región principal de la estructura de Spry, la C-terminal, está casi en su totalidad copada por el dominio rico en cisteínas presente en todos los miembros de Spry, los Spreds e incluso otras proteínas de familias totalmente ajenas. En el caso de Spry, parece evidente que este dominio es clave en fenómenos como la formación de homo y hetero-multímeros entre los distintos miembros de la familia (Ozaki, Miyazaki et al. 2005), la translocación a la membrana celular a través de la unión a Caveolin1 (Cabrita, Jaggi et al. 2006), la coordinación de moléculas que detectan el estado redox celular (Wu, Alexander et al. 2005) o la interacción con otras proteínas que actúan sobre la función de Spry, como SHP2 (Hanafusa, Torii et al. 2004).

En relación al primero de los rasgos mentados, las cisteínas presentes en la región C-terminal son capaces de permitir la formación de estructuras multiméricas entre los distintos miembros de Spry, posibilitando la potenciación y la regulación mutua de sus efectos sobre la dinámica de la señalización en las células. De hecho, más allá de la coordinación a nivel genético que los distintos elementos de esta familia llevan a cabo en diferentes aproximaciones experimentales en que dos de los miembros resultan mutados (Cabrita and Christofori 2008), la interacción molecular directa entre, por citar un ejemplo, Spry1 y Spry4 es capaz de incrementar el efecto inhibitorio sobre la señalización de ERK (Ozaki, Miyazaki et al. 2005).

Resulta evidente que muchas de las funciones de Spry requieren de la translocación de estas proteínas a la membrana de la célula, allá donde se ubican los receptores para los cuales han sido postulados como moduladores tanto de signo positivo como negativo en función del contexto (Christofori 2003). Con este fin, las proteínas Spry son palmitoiladas (Impagnatiello, Weitzer et al. 2001) y, una vez en la membrana, son capaces de

interaccionar con Caveolin1, cuyo papel preponderante en las regiones caveolares de la membrana celular está alejado de toda duda (Cabrita, Jaggi et al. 2006). Con la mutación de la arginina 242 en Spry2, la 250 en el caso de Spry1, dicha interacción se ve entorpecida y la acción de Spry sobre la señalización de los RTKs queda interrumpida.

Otra de las funciones de la zona rica en cisteínas de Spry, en absoluto explorada más allá de su descubrimiento primigenio, es la de coordinar estructuras moleculares que combinan átomos de hierro y azufre en distintas conformaciones dependientes del estado redox celular (Wu, Alexander et al. 2005). Concretamente, en dicho estudio, el análisis químico de extracto purificado de Spry2 revela cómo esta proteína es capaz de albergar dentro de su estructura multimérica centros hierro azufre (Fe-S clusters) de tipo 2Fe-2S. Esta coordinación atómica se encuentra en un gran número de proteínas, entre las que se encuentran SoxR (Fujikawa, Kobayashi et al. 2012) o Grx2 (Lillig, Berndt et al. 2005), ambas relacionadas con la detección y la mitigación del estrés oxidativo en la célula. La oxidación de estos clusters produce cambios conformacionales en las proteínas que los coordinan, desenmascarando así funciones que mantienen ocultas en un entorno reductor (Mettert and Kiley 2015). No obstante, en el estudio citado acerca de la presencia de centros hierro azufre en Spry2 optan por centrarse en la acción del óxido nítrico sobre su estructura. De hecho, muestran como la unión irreversible del óxido nítrico al centro Fe-S de Spry2 impide la acción inhibitoria de este sobre la señalización por FGF, hecho que encaja con el desarrollo anormal de la tráquea en moscas de la fruta en las que se modula la producción de óxido nítrico durante la embriogénesis (Wingrove and O'Farrell 1999). Sin embargo, y pese a demostrar la similitud del centro 2Fe-2S de Spry2 con otros existentes en sensores redox celulares, la implicación funcional de la capacidad de reducción u oxidación de dichos clusters en las proteínas Spry está todavía por determinar.

A través de la interacción con el dominio rico en cisteínas, se han descrito interacciones entre los Sprys y Raf1, Dyrk1a, Tesk1, Caveolin1 o SHP2, pese a que gran parte de ellas requieren de confirmación en sistemas que no impliquen sobreexpresiones capaces de enmascarar las afinidades diversas de dichas proteínas por los diferentes miembros de Spry e, incluso, de SPRED (Guy, Jackson et al. 2009). Este tipo de aproximaciones experimentales utilizadas para la caracterización de los miembros de Spry, así como el predominio de estudios sobre Spry2 en detrimento de los otros componentes de la familia, llevan a la asunción de un papel común de todos ellos que parece hacer caso

omiso de la divergencia molecular que manifiestan. Sirvan de ejemplo las interacciones con Grb2 o con Cbl, atribuidas en principio a todos los miembros de Spry, pero completamente efectivas sólo con Spry2, en cuanto a Grb2, o con Spry1 y Spry2, en referencia a Cbl.

Por otro lado, la regulación a nivel transcripcional de los diferentes Sprys ha sido siempre visualizada desde el enfoque que los sitúa como elementos de respuesta a la señalización por RTKs (Hacohen, Kramer et al. 1998) y, de hecho, suelen posicionarse en el genoma en regiones contiguas a diversos genes de FGF, lo que señala un más que probable mecanismo de regulación conjunta para Sprys y FGFs. Sin embargo, y como sucede en otros aspectos relacionados con Spry, su regulación transcripcional puede variar en función del contexto celular. De hecho, se han identificado y demostrado un gran número de motivos de unión de factores de transcripción en sus regiones promotoras como AP2, CREB, Sp1 o Ets-1 para Spry2 (Ding, Bellusci et al. 2003), EGR1, GATA2, GATA4, Sp1, PBX1 o HNF4 para Spry1 (Darimipourain, Wang et al. 2011) y HNF1, Sp1, AP2, Elk-1 o WT1 para Spry4 (Ding, Bellusci et al. 2004). Además, a través de la deposición de metilaciones en el promotor, la disminución de los niveles de varios miembros de Spry en distintos tipos de cáncer ha sido reiteradamente descrita (Masoumi-Moghaddam, Amini et al. 2014).

## Mecanismos de acción de las proteínas Sprouty

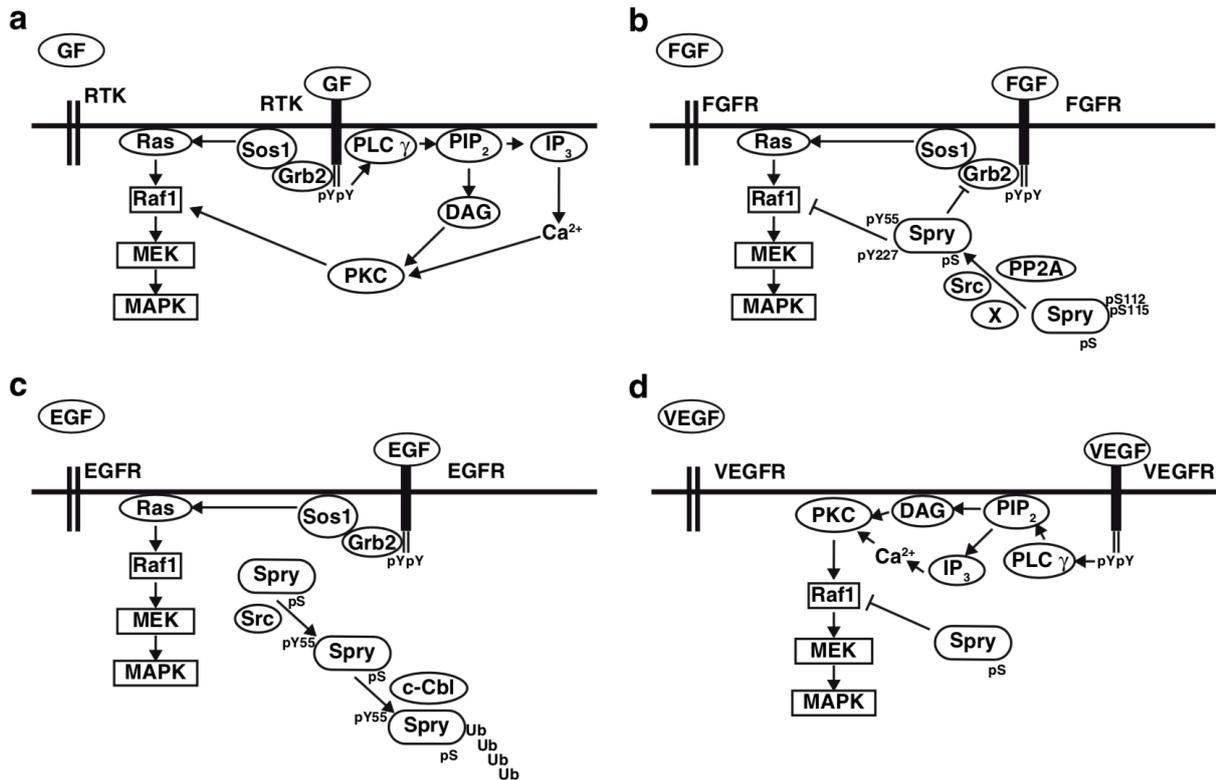
Es ciertamente lógico que el hecho de que el originario descubrimiento del Sprouty de *Drosophila* como antagonista de la señalización de FGFR durante el desarrollo de la tráquea (Hacohen, Kramer et al. 1998) haya marcado el enfoque de la investigación realizada con posterioridad acerca de los mecanismos subyacentes a la acción de los diversos miembros de esta familia. El trabajo de un no desdeñable número de grupos ha caracterizado a las proteínas de esta familia como elementos de regulación negativa de la señalización MAPK ERK derivada de la activación de RTKs por ligandos como EGF, FGF, VEGF, PDGF, GDNF o SCF (Christofori 2003). No obstante, el único consenso actualmente existente acerca del papel de los miembros de Sprouty al respecto recae sobre la dependencia del contexto celular y del estímulo inductor para la acción de los miembros de esta familia, habiéndose desvelado además su posible actuación tanto

inhibitoria como, también, activadora sobre las vías desencadenadas por los RTKs (Cabrita and Christofori 2008).

Los cuatro miembros de Spry poseen la ya mentada tirosina N-terminal, fosforilada por EGF y FGF en el caso de Spry1 y Spry2 (Sasaki, Taketomi et al. 2001) o por FGF e IGF en el caso de Spry4 (Schmelzle, Kane et al. 2006). De hecho, la mutación de esta tirosina desencadena un efecto dominante negativo sobre las proteínas Spry en sus diversas funciones descritas (Sasaki, Taketomi et al. 2001, Hanafusa, Torii et al. 2002, Mason, Morrison et al. 2004). Según se halla descrito, la familia de quinasas Src es la responsable de la fosforilación de esta tirosina de Spry (Li, Brunton et al. 2004).

La amplia mayoría de los estudios existentes acerca de los mecanismos ejecutados por Spry para modular la señalización de los RTKs tienen a Spry2 como protagonista, debido a su gran similitud con el originario Spry de *Drosophila*. Los RTKs, tras la unión de alguno de sus ligandos específicos, sufren un proceso de autofosforilación en su dominio tirosina-quinasa. Tras este suceso, gran cantidad de moléculas adaptadoras, como Grb2, se unen mediante sus dominios SH2 o PTB a dichas tirosinas para efectuar la transmisión de la señal. Una de las moléculas que se unen a Grb2 es Sos, teniendo como cometido canalizar el intercambio de GDP por GTP en Ras. En ese instante, Ras produce la activación de la MAPK quinasa quinasa Raf, que a su vez activa la MAPK quinasa MEK. Esta última produce la fosforilación activadora de ERK1/2. La asunción clásica del papel de los miembros de Spry los sitúa como elementos de respuesta a este tipo de señalización, actuando como represores moleculares que ajustan la duración del estímulo de los RTKs (Guy, Jackson et al. 2009). Sin embargo, existe un amplio número de niveles de la transmisión de dicha señal celular en los que los Sprys parecen actuar según el tipo celular y el ligando activador de dicha señalización (Christofori 2003).

Un buen número de publicaciones señalan la interrupción de la señalización de los RTKs por parte de Spry a la altura de la conexión entre la fosforilación de la tirosina fosforilada del RTK y la activación de Ras mediante el secuestro de Grb2 (Hanafusa, Torii et al. 2002). No obstante, como ya ha sido comentado, el concepto inicial que describía la interacción de Spry1 y Spry2 con Grb2 para la interrupción en la transmisión de la señal de los RTKs a la vía ERK ha quedado posteriormente, cuanto menos, entredicho. De hecho, el dominio que se presumía responsable de la interacción con Grb2, situado en torno a la tirosina N-terminal, fue más tarde descartado (Lao, Chandramouli et al. 2006).



**Figura 3.** Las proteínas de Spry, en cuanto a la vía ERK, son capaces de actuar de manera distinta en función del contexto y del tipo celular. En la imagen se detallan tanto el papel inhibitor de los Sprys sobre la vía ERK así como el caso en el ejercen de reguladores positivos de la vía mediante el secuestro de c-Cbl. Obtenido de (Cabrita and Christofori 2008).

Cabe señalar que este dominio se encuentra sólo en Spry2 y se localiza en la parte C-terminal, indicando por tanto que la interacción entre Grb2 y Spry1 sugerida puede ser fruto de la asunción errónea en cuanto a la función de las regiones homólogas circundantes a la tirosina N-terminal de Spry1 y Spry2 (Cabrita and Christofori 2008). Además, respecto al papel de la interacción entre Grb2 y Spry2 para la actuación de este último como inhibidor de la señalización por FGF, se ha demostrado cómo dicha unión entre estas dos proteínas es sólo necesaria para la inhibición de la señalización de larga duración debida a sobreexpresión (Lao, Chandramouli et al. 2006), mientras que en el caso de estímulos agudos más próximos a lo fisiológico resulta prescindible (Martinez, Garcia-Dominguez et al. 2007).

Existen también trabajos que describen la acción de los distintos Spry sobre la vía MAPK ERK en otros puntos de la misma. Uno de ellos describe cómo Spry4 bloquea la señalización por VEGFR por debajo de Ras, mediante la unión con Raf (Sasaki, Taketomi

et al. 2003). Dicha interacción se produce a través del Raf-binding domain descrito en la zona C-terminal de Spry4 y Spry2 (RBD). Sprouty, en este contexto celular, interrumpiría la transmisión de la señal desde el receptor por vía PLCgamma, a través del secuestro de Raf, diana de PKCdelta en este tipo de señalización RTK.

Por último, otro de los niveles en los que Spry actúa para mediar sobre la activación de los RTKs es a través de la unión con Cbl. Cuando la tirosina es fosforilada, Spry es capaz de secuestrar a esta ubiquitin ligasa y, de esta manera, evitar la ubiquitinización del receptor en cuestión, potenciando por tanto la vía MAPK ERK como sucede en el caso de EGFR (Rubin, Litvak et al. 2003).

Por tanto, la controvertida interrelación que muestran los distintos miembros de Spry con los componentes de la vía de los RTKs, tanto en un sentido activador como inhibidor de la transmisión de su señalización, así como la amplia variabilidad de roles mostrados por los Sprys en función del tipo celular y del estímulo inductor de la vía MAPK ERK, evidencia la gran complejidad en la obtención de mecanismos generales ejecutados por esta familia de proteínas extrapolables a todo tipo de contextos fisiológicos. Existe un gran acopio de datos relacionados con la mecánica de Spry2 que se asocian de manera más o menos directa a la llevada a cabo tanto Spry1 como Spry4, lo que resulta impreciso dada la gran variedad fenotípica que se deriva de la interferencia en la función de cada uno de los miembros, patente en experimentos tanto in vivo como in vitro (Guy, Jackson et al. 2009).

## FUNCIONES DE SPRY

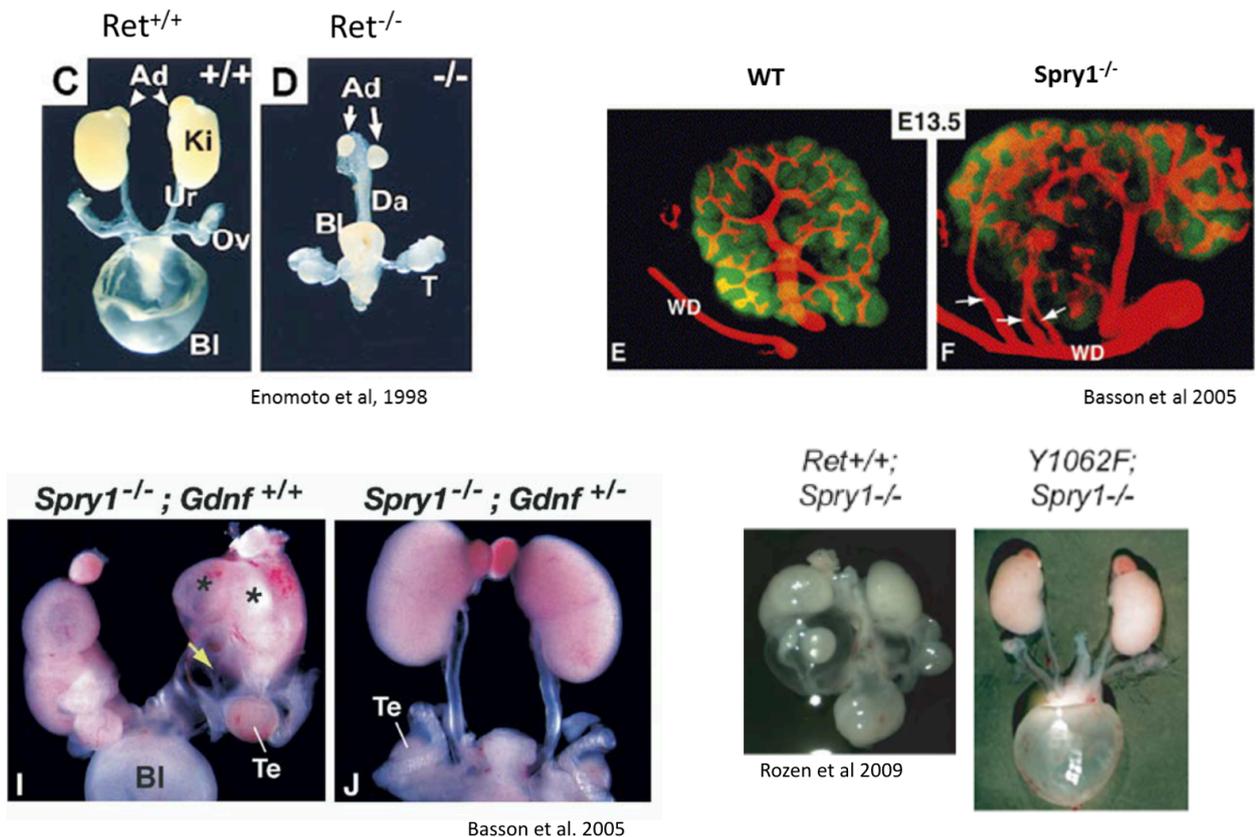
### Sprouty en el desarrollo embrionario

La aparición de Sprouty en la literatura científica surge a partir de la identificación en *Drosophila* de un gen (dSpry) cuyo cometido es el control de la señalización FGF en el adecuado desarrollo de la tráquea (Hacohen, Kramer et al. 1998). Dicho trabajo pionero trajo consigo la realización de otros cuyo resultado conjunto fue la identificación de Spry como mediador clave de la señalización RTK en el desarrollo embrionario de diversos tejidos, tanto en *Drosophila* como en mamíferos (Edwin, Anderson et al. 2009). Uno de ellos, por ejemplo, muy próximo en el tiempo al originario recientemente mentado, describe cómo la pérdida de la función de Spry en *Drosophila* es capaz, además, de

causar defectos en la formación de órganos como el ojo o las alas debido al descontrol de las vías activadas por RTKs (Minowada, Jarvis et al. 1999).

Su relación con este tipo de señalización tan sumamente relevante para el desarrollo queda todavía más patente cuando su patrón de expresión embrionario se sitúa frecuentemente cercano al de centros FGF (de Maximy, Nakatake et al. 1999). A partir de entonces, el número de ligandos de RTKs asociados a la inducción de Spry para el control de la señalización que desencadenan ha ido aumentando de manera constante (Masoumi-Moghaddam, Amini et al. 2014), así como el número de procesos de organogénesis dependientes de dicha función.

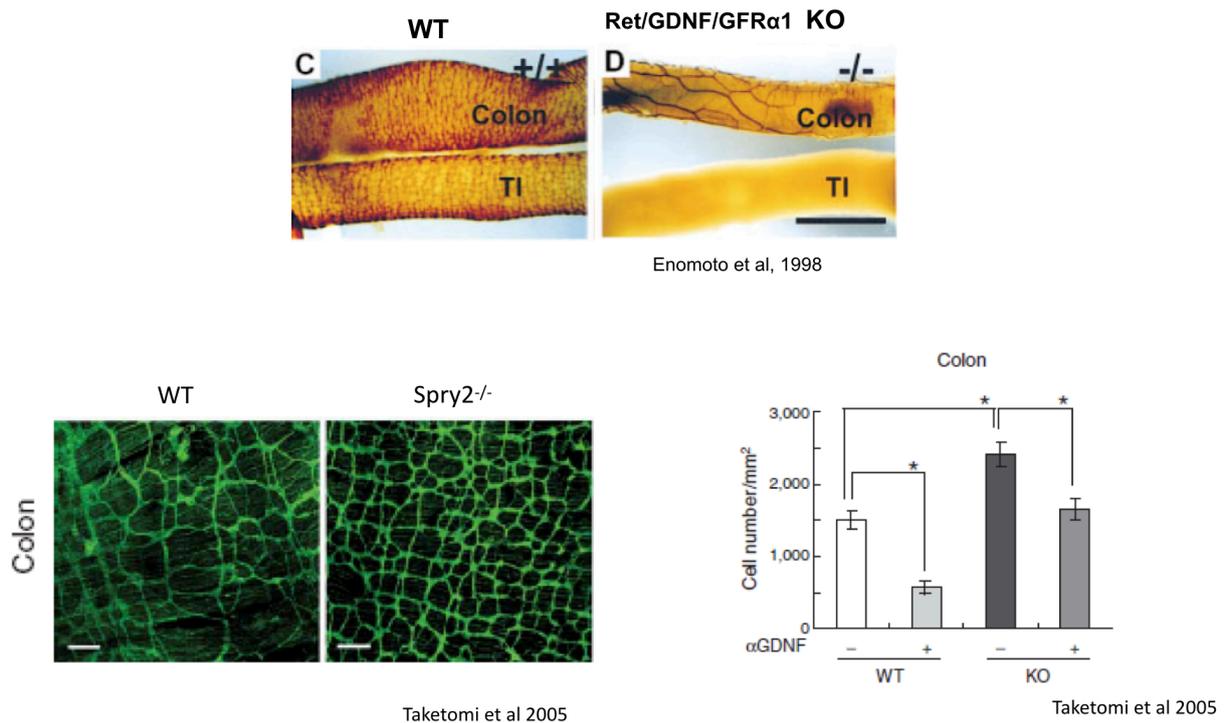
El modelo murino knockout de Spry1 produce fenotípicamente una organogénesis renal deficiente que resulta en la formación de riñones supernumerarios (Basson, Akbulut et al. 2005). Tales defectos se derivan de la señalización descontrolada a través del eje GDNF-Ret que se produce a causa de la ausencia de Spry1 en la gema uretérica (Ureteric Bud, UB), estructura embrionaria encargada generar el sistema colector del riñón. Concretamente, la secreción de GDNF por parte del mesénquima metanéfrico produce la ramificación del sistema tubular colector del riñón derivado de la gema uréterica. Dicha estructura embrionaria, la gema uretérica, proviene de otra denominada conducto de Wolff (Wolffian Duct, WD), túbulo responsable del sistema renal primigenio que posteriormente se diferencia en parte del sistema genital masculino (Barsoum and Yao 2006). La unión de GDNF con el RTK Ret en dicha estructura da lugar a la evaginación de ésta hacia el mesénquima metanéfrico ya que, a través del estudio de ratones knockout para Ret, la agénesis renal resultante muestra la relevancia del eje GDNF-Ret en este proceso embrionario (Shakya, Watanabe et al. 2005). De hecho, varios experimentos coetáneos señalan cómo la combinación de diversas anomalías genéticas en modelos de ratón dan lugar al rescate del fenotipo de desarrollo renal anómalo (CAKUT en inglés). Específicamente, la formación defectuosa del riñón causada por la ausencia de Spry1 es compensada genéticamente por la ausencia de un alelo de GDNF (Basson, Watson-Johnson et al. 2006) o la mutación hipomórfica (Rozen, Schmidt et al. 2009) e incluso nula de Ret (Michos, Cebrian et al. 2010), estableciendo así de manera consistente la relevancia del eje GDNF-Ret-Spry1 en la correcta generación renal.



**Figura 4. El ratón *Spry1* KO muestra defectos en la generación de los riñones.** Arriba a la derecha de la figura se muestra una inmunofluorescencia de Pax2 (rojo) y citoqueratina (verde) de explantes de riñones a E13.5 donde se observa la presencia de gemas ectópicas y riñones duplicados y, en el resto de imágenes macroscópicas, se destacan los defectos en la generación del sistema genitourinario y las vías responsables de dichos defectos.

En cuanto a *Spry2*, existen ciertas discrepancias en torno a los fenotipos reportados por los modelos murinos knock-out para este gen producidos en dos laboratorios independientes. En el primero de los casos, los ratones knock-out para *Spry2* son viables embrionariamente, nacen en la proporción que corresponde pero, al llegar el destete, gran parte de la población que contiene los dos alelos mutados muere, según especulan en el estudio que lo describe, debido a defectos en la función del sistema digestivo (Shim, Minowada et al. 2005). En este trabajo, el defecto producido por la falta de *Spry2* en que se centran es en el desarrollo anormal del órgano de Corti, encargado de transformar el sonido mecánico en señal eléctrica perceptible por el sistema nervioso. Por tanto, la ausencia funcional de *Spry2* produce una pérdida auditiva en este modelo de ratón que es dependiente de la señalización por FGF, concretamente FGF8. El otro de los laboratorios que han generado un ratón knock-out para *Spry2* describe cómo, además de

la pérdida auditiva ya descrita, la falta de este miembro de Spry causa una hiperplasia de las neuronas del sistema nervioso entérico derivada de la hiperactivación del eje GDNF-Ret (Taketomi, Yoshiga et al. 2005). En este contexto celular, dicha vía de RTK influye decisivamente sobre la migración y la supervivencia de las neuronas del sistema nervioso entérico, por lo que su control deficiente por parte de Spry2 conduce al desarrollo de acalasia esofágica y pseudo-obstrucción intestinal, rasgos que se dan en patologías humanas como la enfermedad de Hirschprung.



**Figura 5. El ratón Spry2 KO manifiesta defectos en el desarrollo del sistema nervioso entérico.** En las imágenes se observa una hiperproliferación de neuronas del sistema nervioso entérico causadas por la señalización descontrolada de Ret-GDNF, así como los diversos experimentos de rescate de dicho fenotipo.

Spry4, en la misma línea que los otros miembros de su familia mentados, se ha descrito como modulador de la señalización por RTKs en procesos embrionarios mediante el estudio de ratones knock-out para este gen. Spry4, de manera coordinada con Spry2, actúa para favorecer el correcto desarrollo dental (Klein, Minowada et al. 2006). De

nuevo, la señalización incontrolada derivada de FGF es responsable de la aparición de este defecto en ausencia de Spry.

Cabe resaltar tanto la redundancia como la cooperación existentes entre los distintos miembros de Sprouty, que más allá de haber sido descritas *in vitro* en modelos de sobreexpresión (Guy, Jackson et al. 2009), han quedado al descubierto en estudios de procesos embrionarios en los que la falta de más de un miembro de Spry revela fenotipos encubiertos por la citada acción compensatoria de los Sprys entre sí. Sirven como ejemplo de ello casos como el de la formación del cerebelo (Yu, Yaguchi et al. 2011), el párpado (Kuracha, Siefker et al. 2013) o los genitales externos (Ching, Cunha et al. 2014).

## Papel de Sprouty en cáncer

Numerosos son los estudios que enclavan a las proteínas de la familia Sprouty en un lugar sustancial en la aparición y el desarrollo de la patología cancerosa. Debido a su clásico papel como moduladores de las vías dependientes de RTKs, los Sprys fueron en principio propuestos como candidatos a sufrir alteraciones en procesos de malignidad celular (Masoumi-Moghaddam, Amini et al. 2014). A este respecto, las proteínas de esta familia han sido descritas a modo de biomarcadores tumorales (Lo, Yusoff et al. 2004), de supresores tumorales (Schutzman and Martin 2012) o, incluso, de oncogenes (Schaaf, Hamdi et al. 2010), hecho que no sorprende debido a la ya mencionada dependencia contextual para la función de los distintos miembros de Spry.

Siendo más concretos, en lo que se refiere al cáncer de mama, tanto Spry1 como Spry2 han sido desvelados como genes que disminuyen su expresión en el tejido canceroso mamario (Lo, Yusoff et al. 2004). Además, mediante la introducción de un mutante de la tirosina N-terminal de Spry2 en línea tumoral de mama MCF-7, se desencadena un fenotipo de mayor agresividad al evaluar rasgos como la proliferación o el crecimiento en suspensión. Por otro lado, Spry1, Spry2 y Spry4 se encuentran expresados de manera diversa entre los diferentes subgrupos histopatológicos de cáncer de mama (Faratian, Sims et al. 2011), siendo, además, la expresión de Spry2 un marcador inversamente correlacionado con la de HER2. La expresión reducida de Spry2 se asocia, por tanto, con un pronóstico de peor signo en este tipo de cáncer, lo que concuerda con el hecho de

que la patología cancerosa de la mama haya sido tratada de manera efectiva con inductores de senescencia celular como mediante la inhibición de SHP2 (Chen, LaMarche et al. 2016), en el caso en que la expresión de Spry2 en este tejido sea relevante para la correcta inducción de senescencia. Además, mediante la interacción con uPAR, componente del SASP, Spry1 es capaz de entorpecer la actividad promotora de migración e invasión del eje uPA-uPAR en células de cancer de mama (Mekawy and Morris 2013).

Otro de los tejidos en los que destaca el papel de Spry en un contexto de tumorigénesis es la próstata. De manera inicial, el análisis inmunohistoquímico de unos 400 tissue-microarrays de cáncer de próstata desveló la disminución de la expresión de Spry1 en un 40 por ciento de los tejidos cancerosos respecto a los normales (Kwabi-Addo, Wang et al. 2004). Posteriormente, Spry2 ha sido identificado como marcador cuya expresión se halla disminuida tanto en células tumorales de próstata, así como en biopsias de cánceres de alto grado en comparación con hiperplasias benignas o tumores altamente diferenciados (McKie, Douglas et al. 2005). Cabe señalar que tanto la vía ERK como la PI3K-AKT han sido identificadas como responsables, tras su desregulación, de la aparición de cáncer de próstata (Taylor, Schultz et al. 2010). La implicación de los Sprys en la modulación de ambas vías condujo a la descripción del papel coordinado de Spry1, Spry2 y PTEN en la progresión del cáncer de próstata (Schutzman and Martin 2012), así como a la especificación del rol que manifiesta la fosfatasa común entre ellos tres, PP2A, en este entramado molecular (Patel, Gao et al. 2013).

Si nos referimos a la relación de los miembros de Spry con el cáncer de hígado, la primera mención que se obtuvo en la literatura científica acerca de dicho nexo fue en un estudio de expresión de genes en los que el Spry2 aparece como uno de los 600 expresados de manera más diferencial entre tejido tumoral y tejido normal hepático (Chen, Cheung et al. 2002). Dicho estudio se vio confirmado en un análisis posterior más estricto que revela la consistencia de la disminución de Spry2 para la aparición del cáncer de hígado (Fong, Chua et al. 2006). Uno de los mecanismos esgrimidos determina cómo la sobreexpresión de Spry2 en células de este tipo tumoral es capaz de disminuir la señal proliferativa que HGF proporciona activando la vía ERK. Profundizando en el entendimiento de los mecanismos ventajosos para las células cancerosas de hígado como consecuencia de la pérdida de Spry2, un estudio in vivo identificó que la forma dominante negativa de éste, Y55F, coopera con la vía Wnt para la resultante activación

aberrante de ERK que favorece el desarrollo tumoral (Lee, Ho et al. 2008). Posteriormente, se halló una correlación entre la activación de c-Met y la disminución de Spry2, siendo esta última debida a diversos procesos como la metilación de su promotor, pérdida de heterocigosidad y la degradación vía proteasoma por la acción de NEDD4 (Lee, Ladu et al. 2010). De manera pareja a lo que sucede en la gran mayoría de contextos en cuanto al número de estudios centrados en Spry2 en comparación con el resto de miembros, la relación de Spry1 y Spry4 con el cáncer de hígado está documentada en mucha menor medida, ya que existe una sola mención al respecto (Sirivatanauksorn, Sirivatanauksorn et al. 2012). No obstante, en este caso, mientras que Spry2 y Spry4 se hallan disminuidos este tipo de tejidos cancerosos, Spry1 aparece aumentado.

En el caso del cáncer de pulmón, tejido en el que la expresión de Spry es sobradamente reconocida en tejido adulto, existen trabajos que señalan cómo en carcinomas pulmonares no microcíticos se da una disminución en los niveles de Spry2 tanto a nivel de proteína como de mRNA (Sutterluty, Mayer et al. 2007). Cabe resaltar la identificación que realizan acerca de los mecanismos de carcinogénesis que conlleva tal reducción de Spry2, siendo dependientes de la vía ERK sólo de manera parcial. No obstante, la ausencia de Spry2 en un contexto de mutación G12V de KRAS aumenta la agresividad y la frecuencia de tumores en el pulmón murino (Shaw, Meissner et al. 2007), consolidando así la función de Spry2 en la respuesta a las mutaciones en la vía MAPK de las ERKs, aunque sin entrar en mayor detalle. Por otro lado, se ha descrito el papel de Spry4 en la carcinogénesis pulmonar a través del aumento de su expresión como respuesta a la activación de la vía Wnt (Tennis, Van Scoyk et al. 2010), que ejerce de ruta molecular que mitiga la aparición de este tipo de tumores (Winn, Marek et al. 2005).

En el colon, la literatura existente señala un papel nocivo de los Sprys, mostrando una faceta atípica de esta familia de genes dado que en este tejido actúan como oncogenes. Un array de cDNA identificó un patrón diferencial de expresión de Spry2 en tejido tumoral de pacientes con cáncer de colon en el que se muestra una correlación entre los niveles de Spry2 y la desdiferenciación de la neoplasia emergente (Lo, Yusoff et al. 2004). Uno de los roles propuestos para el papel de Spry2, conjuntamente con Spry1, consiste en la potenciación del fenotipo de transición epitelio-mesénquima (Barbachano, Ordonez-Moran et al. 2010). Otro de los mecanismos desentrañados habla del control de Spry2 sobre la expresión del receptor c-Met (Holgren, Dougherty et al. 2010). Por último, en

esta misma región del tracto digestivo, la asociación entre la vía Wnt y Spry4 y su relevancia en la carcinogénesis ha quedado de nuevo patente (Katoh and Katoh 2006).

En cuanto al melanoma, Spry2 actúa como un inhibidor que controla la señalización oncogénica de la vía ERK en caso de que los melanocitos mantengan la forma no mutada de Raf y no alberguen la típicamente mutada en este tipo de tumores, la V600E (Tsavachidou, Coleman et al. 2004). Además, la pérdida coordinada de los genes Spry1 y Spry2, acompañada de la de otros más axiales en la aparición de este tipo de cáncer, promueve un fenotipo más agresivo de la patología (Mathieu, Pirker et al. 2012).

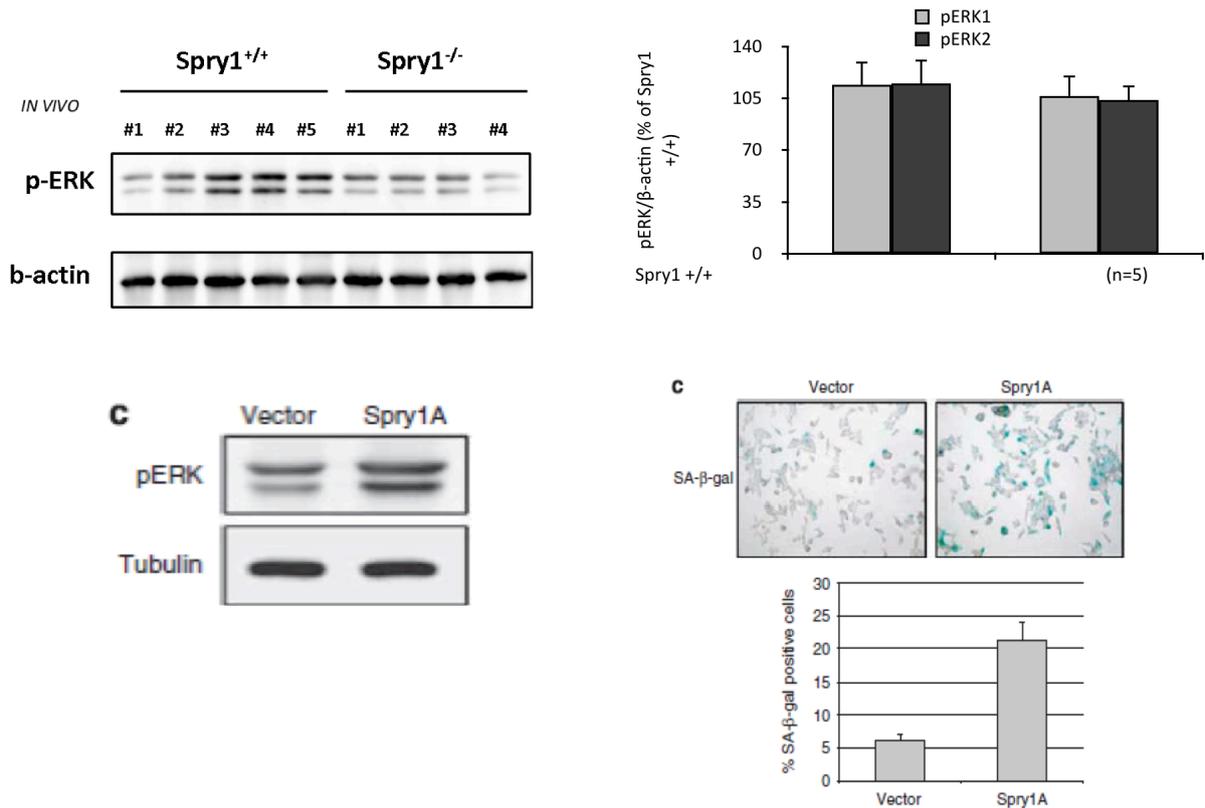
La lista de patologías tumorales en los distintos territorios tisulares del organismo que están en cierta medida influidas por el estado de los miembros de Spry sigue ampliándose con el tiempo, y ya ha sido hallado mutado, además de en los tejidos ya citados, en diversos tipos de sarcoma (Baird, Davis et al. 2005), linfoma de células B (Sanchez, Setien et al. 2008), cáncer de endometrio (Velasco, Pallares et al. 2011), cáncer de tiroides (Macia, Vaquero et al. 2014) o de ovario (Polytarchou, Iliopoulos et al. 2011). No obstante, los mecanismos descritos en cuanto a la acción molecular de Spry en todos los tejidos mencionados distan mucho de estar relacionados de manera inequívoca con la modulación de la vía ERK.

En definitiva, la ya mentada diversidad de funciones de los miembros de Spry en los distintos contextos en que estas proteínas participan explica en cierta medida el amplio abanico de papeles que despliegan en relación con la patología cancerosa. Sintonizando con lo que sucede en diversos estudios centrados en su ámbito de acción mecanística, es evidente que en algunos tipos de cáncer los Sprys actúan más allá de sus típicas dianas moleculares de la vía ERK, como ha sido demostrado, por ejemplo, por nuestro grupo (Macia, Gallel et al. 2012) entre otros (Masoumi-Moghaddam, Amini et al. 2014). Por tanto, también en el caso de circunstancias celulares alteradas por las mutaciones carcinogénicas, se ha de individualizar el prisma con el que se observa cada uno de los miembros en cada uno de los tejidos estudiados. Ello inherentemente incrementa la dificultad en el entendimiento de los mecanismos llevados a cabo por los Sprys para alterar la señalización celular pero posibilita la identificación de un cierto número de vías afectadas por los miembros de esta familia desconocidas hasta la fecha.

## Sprouty y senescencia celular

Pese a que en primer término la senescencia fuera identificada, además de como sustento conceptual del envejecimiento de las las células, como una barrera frente a la formación de tumores (Serrano, Lin et al. 1997), hoy en día sabemos que esta respuesta celular es también parte sustancial de procesos embrionarios (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013). Teniendo todo ello en cuenta, resulta plausible la deducción que sitúa a las proteínas Spry como elementos capaces de coordinar la senescencia celular en según qué contextos por su implicación tanto en cáncer como en desarrollo embrionario. De hecho, en nuestro grupo hemos caracterizado cómo Spry1 es capaz de realizar funciones relativas a los anteriores dos apartados (desarrollo y cáncer) mediante la inducción de senescencia celular.

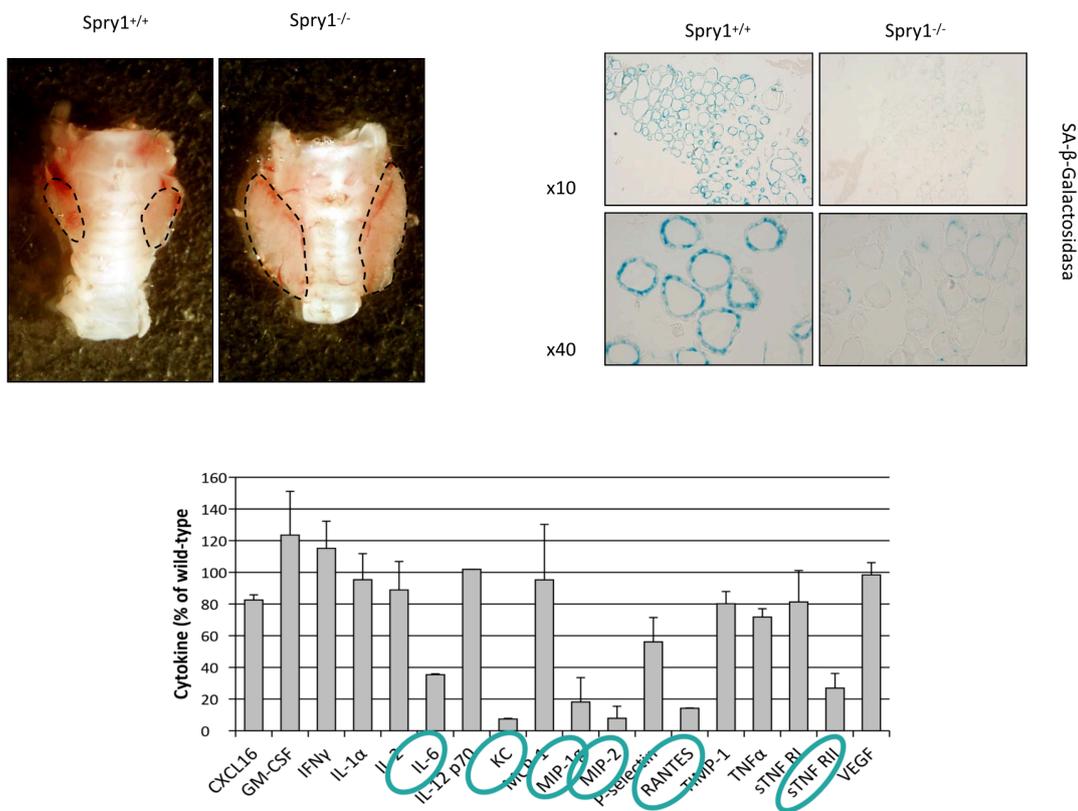
La primera caracterización que señala el papel de los Sprys en senescencia fue realizada por nuestro grupo en células de carcinoma medular de tiroides (Macia, Gallel et al. 2012). En dicho estudio, la reintroducción lentiviral de Spry1 en células TT derivadas de carcinoma medular de tiroides, situando el grado de expresión de este gen al nivel del que se da en la tiroides normal, produce una disminución en la proliferación. De hecho, la inyección subcutánea de estas células en modelos inmunocomprometidos de ratón muestra cómo la expresión aumentada de Spry1 reduce la capacidad que las células TT albergan para la producción de tumores. Sin embargo, la supresión tumoral derivada del aumento Spry1 nada tiene que ver con la inhibición de uno de los genes más frecuentemente mutados en este tipo de carcinoma, el receptor Ret, también relacionado de manera íntima con Spry1 en el desarrollo renal (Basson, Akbulut et al. 2005). En este caso, Spry1 no parece servirse de su papel como inhibidor de la vía ERK a través de la interferencia con la activación de los RTKs, sino que directamente es capaz de inducir la transcripción de los genes del locus CDKN2A, además de aumentar la tinción beta-galactosidasa asociada a la senescencia.



**Figura 6. La sobreexpresión de Spry1 en células TT de carcinoma de tiroides produce la inducción de senescencia celular sin afectar a la vía ERK.** En la figura se muestra cómo la senescencia producida por Spry1 en células de tiroides no es capaz de influir sobre los niveles de activación de ERK pese a que, sin embargo, produce una reducción en la proliferación causada por la inducción de senescencia celular.

Un posterior estudio realizado en nuestro grupo, mediante el uso de ratones knock-out de Spry1, demuestra cómo la falta de este gen causa la aparición de tiroides de un tamaño sustancialmente mayor al normal. Dichas glándulas endocrinas procedentes del ratón knock-out para Spry1, al ser sometidas a la tinción beta galactosidasa asociada a la senescencia, muestran un déficit en la expresión de este marcador así como un mayor índice de proliferación celular que, de nuevo, no se corresponden con un efecto sobre los niveles de activación de ERK. De todas las vías de señalización interrogadas en las tiroides knock-out de Spry1, la única afectada es la Stat3, cuyo principal ligando es la IL6, elemento crucial del SASP inflamatorio (Freund, Orjalo et al. 2010). Sin embargo, las células de las tiroides obtenidas de los ratones knock-out para Spry1 son perfectamente sensibles a la estimulación por IL6 en cuanto a la activación de Stat3, por lo que el defecto encontrado en dicha señalización no se deriva de un problema de respuesta al

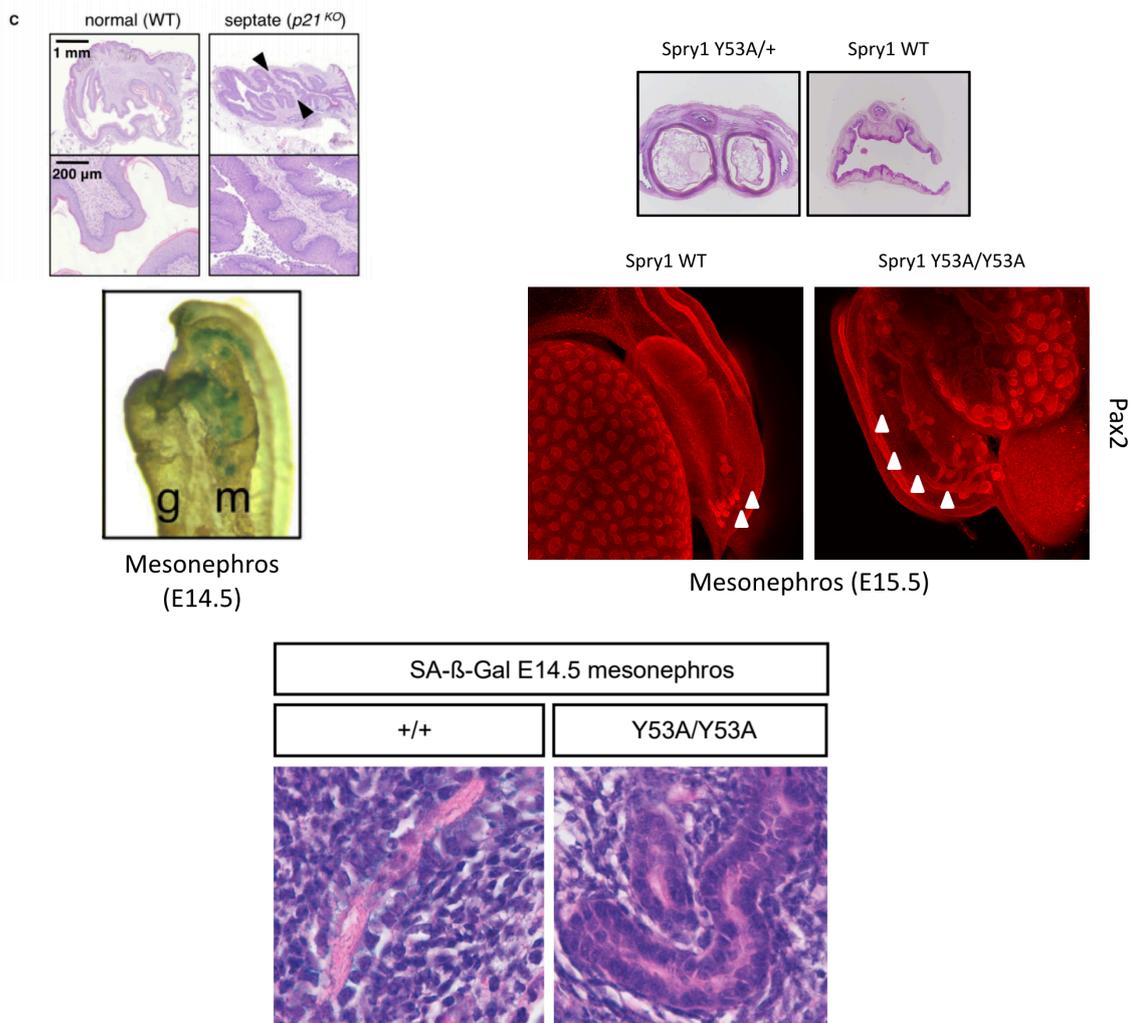
ligando. De hecho, lo que sucede es que las tiroides carentes de Spry1, debido a la falta de senescencia celular, tienen un déficit en la activación de NFkB que conlleva una disminución de la producción de ciertos elementos del SASP, entre los que se encuentran IL6 o KC. Como es bien sabido, la activación de NFkB en senescencia depende fundamentalmente de la señalización causada por daño al DNA (Rodier, Coppe et al. 2009), aunque es también potenciada por vías como p38 (Freund, Patil et al. 2011), mTOR (Laberge, Sun et al. 2015) o GATA4 (Kang, Xu et al. 2015).



**Figura 7. Las tiroides de animales Spry1 KO carecen de la expresión de marcadores de senescencia celular.** En el caso del animal que carece de Spry1, un trabajo previo de nuestro grupo identificó la ausencia de expresión de marcadores de senescencia como la tinción Beta-galactosidasa o la producción de SASP inflamatorio debido a defectos en la inducción de la vía NFkB

Más allá del contexto en el que la senescencia se ofrece como barrera frente a la transformación tumoral, recientemente hemos desvelado la relevancia de los Sprys en la correcta ejecución de la senescencia relacionada con el desarrollo de estructuras embrionarias, concretamente del sistema genitourinario. Tanto el ratón doble heterocigoto

de Spry1 y Spry2 como un modelo knock-in que alberga la sustitución del alelo normal de Spry1 por uno mutante de la tirosina 53, generado en nuestro laboratorio, muestran una alta incidencia de defectos en la apertura de la vagina, así como en la adecuada generación de las vesículas seminales. Dichos defectos, sobre todo el hallado en hembras, han sido descritos en modelos de ratón que poseen tanto la señalización Wnt/ Beta-catenina alterada (Murata, Ishitsuka et al. 2014) como la falta del inhibidor de ciclo p21 (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013), ambos relacionados con la senescencia celular.



**Figura 8. Defectos en estructuras embrionarias mostrados por los ratones Spry1 mutantes de la tirosina 53 que son consistentes con la ineficacia de la senescencia celular programada.** La figura señala cómo, la senescencia programada presente en el desarrollo, necesaria para la apertura correcta de la vagina, aparece también afectada en los animales con la mutación Y53A, ya que se muestra un defecto en la regresión del mesonefros.

Sin embargo, los mecanismos precisos de acción de los miembros de Sprouty sobre la senescencia celular no dejan de ser, a día de hoy, una conjetura inconclusa. Es por ello crucial desentrañarlos con el fin de certificar el papel que desempeñan en este proceso celular reiteradamente señalado como necesario para preservar la homeostasis general del organismo (Munoz-Espin and Serrano 2014). Por ello, existe un amplio abanico de posibles engranajes moleculares de los que los miembros de Spry pueden estar sirviéndose para contribuir al establecimiento del fenotipo senescente en la célula.

Comprensiblemente, la sospecha más inmediata que sobreviene respecto a la relación de los Sprys con la senescencia celular está vinculada a la función clásica de los Sprys sobre la vía ERK, también relacionada con la senescencia celular aunque de manera algo tácita. Muy brevemente, la vía ERK resulta por supuesto activada en OIS y contribuye, por su función mitogénica, en parte del establecimiento de senescencia celular a través de la inducción de daño al DNA (Di Micco, Fumagalli et al. 2006), la producción aumentada de ROS (Colavitti and Finkel 2005) e incluso promoviendo la expresión de p16INK4a a través de Ets1/2 (Ohtani, Zebedee et al. 2001), además de otros marcadores típicos de esta respuesta celular (Deschenes-Simard, Gaumont-Leclerc et al. 2013). La señalización aumentada de ERK ha sido también observada en contextos de senescencia que nada tienen que ver con la inducida por oncogenes como, por ejemplo, la que se da en el desarrollo embrionario (Storer, Mas et al. 2013), así como en procesos directamente relacionados con la senescencia celular como son la respuesta a estrés oxidativo (Son, Kim et al. 2013) o el daño al DNA (Khalil, Morgan et al. 2011). Pese a todo ello, los trabajos realizados en nuestro grupo ya comentados indican cómo la relación de los Sprys con la senescencia, al menos en el caso de Spry1, nada tiene que ver con un efecto sobre el estado de activación de ERK (Macia, Gallel et al. 2012, Macia, Vaquero et al. 2014).

De los interactores que se le han descrito a las proteínas Spry es Caveolin-1 el socio molecular que muestra una relación más documentada con el proceso de senescencia celular (Zou, Stoppani et al. 2011, Kim, Noh et al. 2017). Estudios iniciales señalaron la comparecencia de Caveolin-1 en zonas de inhibición por contacto entre células (Galbiati, Volonte et al. 1998). Además, posteriormente se observó, mediante la sobreexpresión de esta proteína en MEFs, la relevancia de Caveolin-1 en la modulación del eje p53-p21 en la senescencia causada por varios de los inductores clásicos (Bartholomew, Volonte et al. 2009). En este mismo sentido, Caveolin-1 es capaz de reforzar el fenotipo senescente

mediante el secuestro de PP2A necesario para el mantenimiento de la fosforilación de ATM desencadenante de la señalización DDR (Volonte and Galbiati 2009). Otro de los indicios que posicionan a Caveolin-1 en un lugar notable en cuanto a la senescencia es aquel que relata cómo la vía p38 es capaz de influir sobre los niveles de esta proteína tanto transcripcionalmente a través de la activación de Sp1 (Dasari, Bartholomew et al. 2006) como postraduccionalmente mediante la fosforilación de una tirosina N-terminal (Chretien, Piront et al. 2008). No obstante, un estudio reciente resalta cómo la disminución de los niveles de Caveolin-1 es capaz de producir senescencia celular mediante la inducción de disfunción mitocondrial (Yu, Jung et al. 2017), previamente descrita como factor desencadenante de senescencia (Wiley, Velarde et al. 2016), hecho que advierte acerca del papel controvertido de esta proteína en la respuesta senescente.

Por otro lado, hace ya algunos años se demostró que la fosfatasa PP2A (Kim, Song et al. 2003), como sucede con otras fosfatasas, pierde gran parte de su actividad debido a la oxidación de algunos de sus residuos de cisteína a causa del estrés oxidativo (Denu and Tanner 1998). Años más tarde se vio cómo esta pérdida de actividad por parte de PP2A también es responsable de la activación de ERK derivada de la inducción de senescencia por estrés oxidativo (Kim, Song et al. 2003), mostrando así un rol adicional de PP2A en senescencia celular aparte del ya citado en la potenciación de la señalización por daño al DNA (Volonte and Galbiati 2009). Caso algo aparentemente inconexo con los mentados es el que relaciona PP2A con el control de los niveles de c-Myc en senescencia de melanocitos normales y cancerosos (Mannava, Omilian et al. 2012) aunque, a la postre, añada algo más de trascendencia al papel de esta proteína en las células senescentes.

La asociación directa entre Cbl, ubiquitin ligasa reiteradamente asociada con Spry1 y 2, y la senescencia celular ha irrumpido de manera reciente en la literatura científica. Un único estudio señala cómo Cbl interfiere con la respuesta senescente mediante la ubiquitinización de la enzima generadora de ROS Nox4 (Desai, Zhou et al. 2014). Si bien, también hay documentadas ciertas implicaciones de Cbl en la regulación de vías claramente vinculadas con la senescencia, como sucede en el caso de NFkB (Qiao, Li et al. 2008). Asimismo, la acción combinada de Cbl con uno de sus socios moleculares más reconocidos, CIN85, es capaz tanto de decantar la activación que hace MEKK4 de las vías p38 y JNK en favor de la primera (Aissouni, Zapart et al. 2005), como de potenciar la activación de la vía TGFbeta (Yakymovych, Yakymovych et al. 2015). Por su parte, p38 es capaz de influir sobre la actividad de Cbl en cuanto a su capacidad de ubiquitinar

EGFR, siendo necesaria la fosforilación de p38 alpha para la degradación del receptor de EGF por parte del complejo Cbl-CIN85 en células de colon (Frey, Dise et al. 2006).

La fosfatasa SHP2, vinculada a la defosforilación de la tirosina 53 de Spry1 (Hanafusa, Torii et al. 2004) así como a la inactivación de gran parte las vías MAPK como ERK o p38 (Hu, Fang et al. 2014), ha sido recientemente identificada como un importante elemento de evasión de la respuesta senescente en la transformación tumoral (Lan, Holland et al. 2015). Sin embargo, los mecanismos esgrimidos en el citado trabajo para la inhibición de la senescencia por parte de SHP2, lejos de mostrar relación con los Sprys o con las vías MAPK, señalan la contribución de esta fosfatasa en la disminución de los niveles de p27 y p53 causado por el incremento de AURKA, DLL1 y SKP2 del que SHP2 es responsable en células de cáncer de mama.

En cuanto a la quinasa Mnk, diana molecular de las vías ERK y p38 además de responsable de la fosforilación del dominio rico en serinas de los Sprys, existe un único estudio que la vincula con la senescencia celular (Ziaei, Shimada et al. 2012). Dicho trabajo expone simplemente un incremento de los niveles de fosforilación activadora de esta quinasa en senescencia celular, sin desarrollar las consecuencias de dicha modificación postraducciona.

Por último, Dyrk1a, identificada como quinasa responsable de la fosforilación de la treonina 75 de Spry2, participa en la formación del llamado complejo DREAM, responsable de la inhibición del ciclo celular a través del ensamblaje inactivador de proteínas como Rb, E2F, DP1 o p130, tanto en procesos de quiescencia como en senescencia celular inducida por oncogenes (Litovchick, Florens et al. 2011).

Por tanto, existen indicios suficientes que permiten hipotetizar acerca de la acción precisa de Sprouty en el establecimiento de la senescencia celular. Desentrañar por consiguiente las implicaciones moleculares de esta familia de proteínas en este proceso de creciente relevancia se advierte tan necesario como interesante.

# LA SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular fue conceptualmente descrita por primera vez en el año 1961 en un trabajo publicado por Leonard Hayflick y Paul Moorhead (Hayflick and Moorhead 1961). Dicha publicación relata cómo, al cabo de cierto número de divisiones, las células agotan su capacidad proliferativa, induciendo una parada de ciclo celular permanente. Esta característica descrita por Hayflick y Moorhead trajo consigo el alumbramiento de una de las primeras conjeturas acerca del envejecimiento en su entendimiento más simplista. El hecho de que una célula disponga de un número finito de divisiones permitió especular sobre la extrapolación de este mismo rasgo a un nivel más generalista en el que los distintos tejidos celulares que componen los organismos complejos sufrirían de este agotamiento proliferativo, contribuyendo así al deterioro tisular característico del envejecimiento. Hoy en día sabemos que la senescencia celular es una de las características o “hallmarks” del envejecimiento (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013), tratándose, de hecho, de un proceso clave en su repentina aparición típica (Baker, Childs et al. 2016).

Tras la descripción primitiva efectuada por Hayflick, otro de los hitos en el campo de la senescencia celular fue el descubrimiento de la senescencia inducida por oncogenes (Oncogene-Induced Senescence, OIS) en el año 1997 (Serrano, Lin et al. 1997). Este hecho, desvelado en el laboratorio de Scott Lowe, presenta a la senescencia a modo de barrera que las células contraponen a la transformación tumoral, situándola en un lugar de gran relevancia como mecanismo frente a la aparición del cáncer (Hanahan and Weinberg 2011). Por tanto, con el paso de los años, el entendimiento inicial de la senescencia celular como meramente replicativa fue desdibujándose y en su lugar emergió conceptualmente como una respuesta determinada que las células inducen frente a distintos tipos de daños y estresores (Munoz-Espin and Serrano 2014). Entre estos inductores de senescencia se encuentran, además de la erosión de los telómeros (Replicative Senescence, RS) y la activación de ciertos oncogenes (Oncogene-Induced Senescence, OIS), el daño al DNA (DNA Damage-Induced Senescence, DDIS) y el estrés oxidativo (Stress-Induced Premature Senescence, SIPS). No obstante, cabe señalar que todos ellos se encuentran relacionados de manera tan íntima que en la mayoría de ocasiones resultan difícilmente dissociables.

Las células senescentes manifiestan ciertas características que nos permiten identificarlas y que no están en absoluto presentes en todos los tipos celulares ni aparecen en todas las circunstancias inductoras. Pese a ello, existe un cierto nivel de consenso en torno a los rasgos típicos que son indicativos de la entrada en senescencia por parte de una célula. Marcadores fenotípicos como la tinción positiva para actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia (Senescence-associated beta-galactosidase, SAβGal) o una morfología celular agrandada han sido identificados de manera común como representativos de este tipo de células (Dimri, Lee et al. 1995). A nivel molecular, la inducción de parada proliferativa mediante el incremento de los niveles de inhibidores de ciclo celular (Salama, Sadaie et al. 2014) y la producción de una serie de factores que las células senescentes secretan para influir de manera tanto autocrina como paracrina en el medio intersticial definen la esencia común de las células senescentes (Freund, Orjalo et al. 2010).

Dicho fenotipo secretor implementado por las células senescentes, además de contribuir de manera paracrina a la supresión tumoral (Acosta, Banito et al. 2013), es capaz de otorgarles un papel primordial incluso en procesos fisiológicos como la regeneración de tejidos (Demaria, Ohtani et al. 2014) o el desarrollo embrionario (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013). Sin embargo, cuando la eliminación de las células senescentes se torna deficiente en edades avanzadas, la senescencia contribuye al envejecimiento (Childs, Durik et al. 2015) y a la aparición de patologías relacionadas con el mismo, constituyendo así un ejemplo de un proceso beneficioso en organismos jóvenes que resulta más tarde perjudicial cuando el funcionamiento tisular entra en declive (McHugh and Gil 2017).

Por todo lo reseñado en los párrafos anteriores, el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la senescencia en los distintos contextos en los que se presenta se advierte crucial hoy en día, por lo que en esta introducción se pretende desarrollar de manera más profunda el entendimiento de los intrincados procesos moleculares ejecutados por las células senescentes.

## INDUCTORES DE SENESCENCIA CELULAR

El abanico de estímulos inductores de senescencia celular está en constante crecimiento a medida que la investigación avanza en su identificación y caracterización (Kuilman,

Michaloglou et al. 2010). Sin embargo, existen inductores ampliamente caracterizados y aceptados como causantes de senescencia típicos o “canónicos”. Cabe señalar que todos ellos poseen entre sí una íntima relación en la que la incursión de uno de los estímulos habitualmente desencadena la aparición de más. De hecho, las vías de señalización que alertan a la célula de los distintos daños suelen confluir, por lo que su análisis adecuado requiere de una disección genética extremadamente precisa.

## Senescencia replicativa (Replicative senescence, RS)

Cuando las células alcanzan el llamado límite de Hayflick, es decir, agotan la longitud de las regiones teloméricas situadas en los extremos de sus cromosomas, la acumulación de histonas fosforiladas H2AX y de 53BP1 en la cromatina desencadena la activación de las quinasas ATM y ATR (d'Adda di Fagagna, Reaper et al. 2003), iniciadoras de la respuesta a daño al DNA (DNA damage response, DDR). Tras ello, la señal de daño cromosómico se amplifica mediante la activación de CHK1 y CHK2, convergiendo en la fosforilación de la serina 15 de p53 (Herbig, Jobling et al. 2004). De este modo, las células inducen una parada del ciclo celular mediante el incremento de la expresión del inhibidor de complejos ciclina-cdk p21. Por otro lado, pese a que los mecanismos precisos no han sido completamente desvelados todavía, la senescencia replicativa se encuentra íntimamente relacionada con la disminución de los elementos de represión transcripcional del locus CDKN2A, los llamados grupos Polycomb (Gil, Bernard et al. 2004). La edad celular favorece la desaparición de ciertos componentes de estos complejos proteicos (Bracken, Kleine-Kohlbrecher et al. 2007) y, en consecuencia, se pierden las marcas epigenéticas represoras H3K27me3 dando lugar a la expresión del locus INK4a/ARF. Ello promueve la estabilización de p53 por la acción de ARF sobre MDM2 y la hipofosforilación de Retinoblastoma (RB) que impide la progresión del ciclo celular (Itahana, Zou et al. 2003).

## Senescencia inducida por daño al DNA (DNA damage-induced senescence, DDIS)

De manera similar a lo descrito en el apartado anterior, cuando las células sufren daño en la estructura de su cromatina, se desencadena una respuesta de daño al DNA, activando las mismas vías de señalización ya citadas (DNA damage response, DDR). Esta inducción es llevada a cabo cuando, de manera sub-lethal para la célula, se producen roturas en la estructura del DNA a consecuencia de radiaciones ionizantes, compuestos químicos (Correia-Melo, Marques et al. 2016), radicales libres causados por el estrés oxidativo (Barzilai and Yamamoto 2004) y errores en la replicación causados por una acelerada proliferación celular debida a la activación de oncogenes (Di Micco, Fumagalli et al. 2006). Por tanto, de alguna manera, la vía de DDR recoge e integra las señales del conjunto de los inductores de senescencia celular clásicos puesto que todos son capaces de inducir esta respuesta molecular ya sea de manera más o menos directa (d'Adda di Fagagna 2008, Feringa, Raaijmakers et al. 2018).

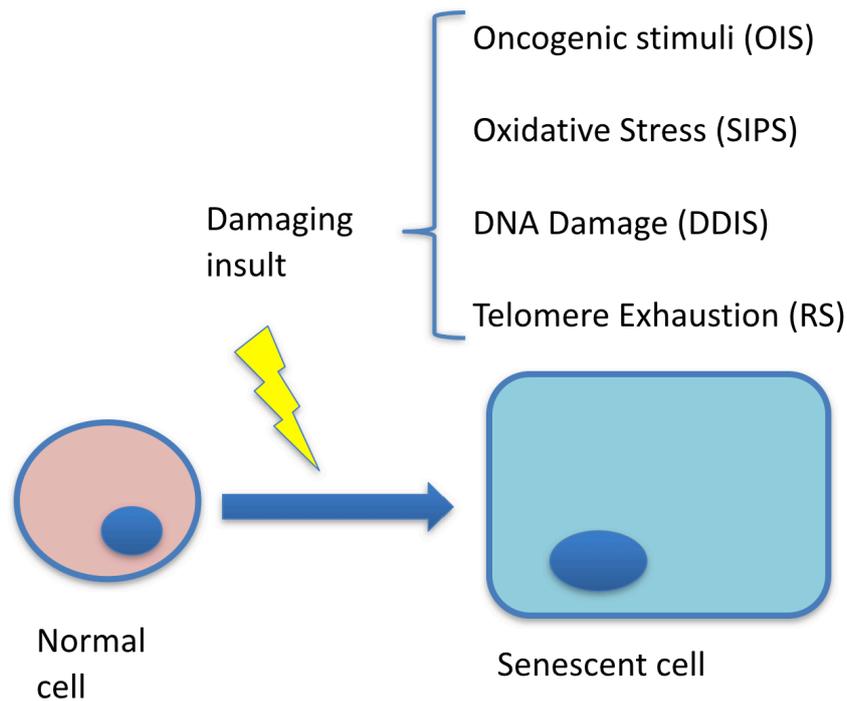
## Senescencia inducida por estrés oxidativo (Stress-induced premature senescence, SIPS)

El estrés oxidativo es un agente causante de senescencia celular a través de la producción, anteriormente comentada, de daño al DNA así como mediante la activación de las quinasas de la familia de MAPK p38 (Passos, Nelson et al. 2010). Como sucede en el caso comentado en el apartado anterior, este tipo de inducción de senescencia es independiente de la integridad telomérica. Ello queda patente cuando cultivos de fibroblastos de ratón, cuyos telómeros son sustancialmente más largos que los humanos (Kipling and Cooke 1990), inducen una parada proliferativa a los pocos pases llevados a cabo en un ambiente de oxígeno a concentración atmosférica (21%). Esta detención del ciclo celular prematura no se halla en estas mismas células cultivadas a una concentración de oxígeno cercana a la fisiológica (3%), poniendo de manifiesto la relevancia de la sensibilidad de las distintas especies al estrés oxidativo en cuanto a la inducción de senescencia celular (Parrinello, Samper et al. 2003). La activación de la vía de p38 debida al estrés oxidativo es capaz de inducir senescencia celular mediante la modulación del eje p53/p21 y la inducción de p16 INK4a (Han and Sun 2007). Además, la

producción de radicales oxidantes puede contribuir a la formación y el mantenimiento de focos de daño sub-letal en el DNA, estableciendo así la conexión entre el estrés oxidativo y la señalización de DNA damage response (Passos, Nelson et al. 2010).

## Senescencia inducida por oncogenes (Oncogene-induced senescence, OIS)

Las células del organismo responden a la activación aberrante de ciertos genes promotores de tumores, los llamados oncogenes, mediante la inducción de senescencia celular. Este concepto decisivo fue descrito por primera vez por Manuel Serrano y Scott Lowe en el año 1997, suponiendo la evidencia inicial de que la senescencia celular actúa como barrera frente a la transformación tumoral de las células. Tras este primigenio descubrimiento, se han identificado gran cantidad de oncogenes que producen senescencia al ser anormalmente activados (Gorgoulis and Halazonetis 2010) y de supresores tumorales que al ver alterada su correcta función despiertan esta misma respuesta en las células (Courtois-Cox, Genter Williams et al. 2006). La señalización descontrolada que se da en las primeras fases de la transformación carcinogénica produce los estímulos necesarios para inducir senescencia celular, evitando así de manera inicial un crecimiento celular descontrolado dentro de los diferentes tejidos que componen el organismo (Collado and Serrano 2010). Los distintos estímulos inductores que integran la OIS dan una idea de la complejidad del fenómeno, albergando gran variabilidad en las vías que se activan dependiendo de tipo celular y especie (Efeyan and Serrano 2007). Este tipo de senescencia manifiesta todas las características e integra todas las vías de señalización relacionadas con la senescencia: la producción de estrés oxidativo que activa p38 MAPK (Wang, Chen et al. 2002), el daño al DNA que induce la respuesta de las quinasas ATM y ATR que conlleva la activación de p53 (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008) o la inducción del locus INK4a/ARF (Evangelou, Bartkova et al. 2013).



**Figura 9. Esquema gráfico de los distintos inductores clásicos de senescencia celular.** En la figura se muestran los inductores de respuesta senescente comentados en este apartado de la introducción como son la activación de oncogenes, el estrés oxidativo, el daño al DNA o el agotamiento telomérico.

## CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS SENESCENTES

### Inhibición del ciclo celular (Senescence-associated growth arrest, SAGA)

Uno de los pilares centrales de la senescencia celular es la inducción de una parada proliferativa de la célula irreversible por definición (Serrano, Lin et al. 1997). Dentro de este rasgo fundamental de las células senescentes, pese a la coexistencia con más inhibidores de ciclo, dos ejes moleculares emergen como principales para este cometido: p53/p21 y p16INK4a/RB (Munoz-Espin and Serrano 2014).

El primero de ellos, p53/p21, como profundizaremos más tarde, está regulado por las vías de DNA damage response y p38 MAPK. La modulación que estas dos vías producen sobre determinados residuos de la estructura de p53 induce la transcripción del inhibidor

de quinasas dependientes de ciclina p21. Este inhibidor de ciclo ejerce su actividad sobre la proteínas como la CDK4/6, impidiendo la fosforilación de RB que tiene como consecuencia la progresión del ciclo celular (Stein, Drullinger et al. 1999). No obstante, la inducción no transitoria de esta vía requiere de la activación sostenida de p53 a causa de niveles sub-letales de daño al DNA producidos en los llamados DNA-SCARs, o zonas con alteraciones de la cromatina que refuerzan la senescencia (Kruiswijk, Labuschagne et al. 2015). Además, existen elementos de injerencia por parte del eje de p16INK4a sobre p53/p21. Fundamentalmente, el transcrito alternativo del locus INK4a/ARF, la llamada proteína p14ARF, es capaz de impedir la degradación de p53 mediante el secuestro de MDM2 (Kim and Sharpless 2006).

Por otro lado, p16INK4a es el principal efector del eje p16INK4a/RB. Además, este inhibidor de ciclo tan relevante en fenómenos sistémicos como el envejecimiento (Krishnamurthy, Torrice et al. 2004) cohabita en el mismo locus del genoma con dos supresores tumorales más: el ya citado p14ARF, codificado por el mismo gen que p16INK4a, denominado CDKN2A, y p15INK4b, codificado por el gen CDKN2B, y relacionado con la inducción de senescencia a través de TGFbeta (Acosta, Banito et al. 2013). Aparte de la función de p14ARF ya comentada, tanto p16INK4a (Rayess, Wang et al. 2012) como p15INK4b (Kuilman, Michaloglou et al. 2010) son capaces de inhibir el ciclo celular de manera similar a p21, resultando en la hipofosforilación de RB.

La regulación transcripcional del locus INK4a/ARF depende en gran medida de la deposición de marcas epigenéticas represoras H3K27me3 (Bracken, Kleine-Kohlbrecher et al. 2007). Dicho control represor es ejercido por los llamados grupos Polycomb (PRC2, PRC1) y se ve afectado cuando alguno de sus componentes, como CBX7 (Gil, Bernard et al. 2004), EZH2 (Vire, Brenner et al. 2006) o SUZ12 (Kotake, Cao et al. 2007) aparecen mutados. También es de vital relevancia la acción demetilasa de H3K27 realizada por JMJD3 durante la inducción de senescencia para la transcripción del locus INK4a/ARF (Barradas, Anderton et al. 2009). Por otro lado, como elemento adicional de regulación de los grupos Polycomb, encontramos los complejos proteicos SWI/SNF. Éstos ejercen de inhibidores de los grupos Polycomb, facilitando la inducción del locus INK4a/ARF (Kia, Gorski et al. 2008). En un nivel aún más intrincado, los complejos MLL1 son capaces de alterar estructuralmente la zona del locus INK4a/ARF mediante la deposición de marcas epigenéticas activadoras H3K4me3. Sin embargo, a través de la disminución de los niveles de proteínas ID, cuyo papel como reguladoras negativas de factores de

transcripción como Ets1/2 ha sido caracterizado (Zebedee and Hara 2001), son capaces de impedir la inducción de p16INK4a. En este doble ajuste molecular por parte de MLL1 parece tener un mayor peso para la célula el control sobre las proteínas ID, puesto que la eliminación de un elemento de los complejos MLL1 facilita el acceso de factores de transcripción necesarios para la inducción de INK4a/ARF pese a la ausencia de marcas activadoras H3K4me3 en el promotor de este locus (Simboeck and Di Croce 2013).

En relación con las vías de señalización MAPK, tanto p38 como ERK son capaces de regular la transcripción de INK4a/ARF mediante la inhibición de la unión a cromatina de los represores BMI1 (Voncken, Niessen et al. 2005) o HBP1 (Xiu, Kim et al. 2003) dependientes de p38, así como a través de la modulación directa de factores transcripcionales requeridos en senescencia para la inducción de p16INK4a como Ets1/2 por parte de ERK (Ohtani, Zebedee et al. 2001) o Sp1 por parte de p38 (Wu, Xue et al. 2007). Recientemente se ha descrito cómo Msk1, diana conjunta de ambas vías de señalización mentadas, es capaz de controlar la transcripción del locus INK4a/ARF en OIS (Culerrier, Carraz et al. 2016), adicionando una prueba más de la relevancia de las vías ERK y p38 en la regulación de la inhibición del ciclo celular en las células senescentes.

De manera tan llamativa como sustancial, la inducción de senescencia celular por la mera sobreexpresión de inhibidores de ciclo como p16INK4a o p21 no conlleva la secreción de SASP (Coppe, Rodier et al. 2011). Ello indica que las dos características principales de la senescencia celular, el SASP y la inhibición del ciclo, son controladas por vías de señalización que, aunque comunes, son completamente separables si se realizan las disecciones genéticas suficientemente precisas.

## Fenotipo secretor (Senescence-associated secretory phenotype, SASP)

El fenotipo de senescencia no queda restringido a una simple inhibición de la progresión del ciclo celular. De hecho, las células senescentes implementan la secreción de un amplio conglomerado de factores que modulan la comunicación que éstas llevan a cabo con su entorno (Coppe, Desprez et al. 2010). Este hecho es de vital importancia dado que su efecto sobre el vecindario celular es capital para comprender la dualidad que la senescencia celular muestra como agente de pleiotropía antagonista en el organismo,

siendo beneficiosa en seres jóvenes y globalmente equilibrados y pernicioso en un contexto de decadencia homeostática (Campisi 2005). Precisamente, el efecto nocivo de las células senescentes en los contextos patológicos en que aparecen radica, en gran medida, en la influencia paracrina descontrolada que ejercen sobre el entorno tisular, más allá de la mera acumulación de células con un freno irreversible sobre su capacidad mitótica.

En un primer grupo de factores secretados por las células senescentes podemos incluir al llamado SASP inflamatorio, regulado de manera principal por la vía NFκB (Chien, Scuoppo et al. 2011). En esta categoría de SASP se encuentran la amplia mayoría de factores que estas células secretan al medio y, por ende, los estudiados a un nivel más profundo en cuanto a su función y su control. Entre un gran número de citoquinas y quimiocinas destacan la IL6, la IL8 o la IL1a, cuyo papel en senescencia ha sido pródigamente descrito en cuanto a la transmisión autocrina y paracrina de ésta (Acosta, O'Loughlen et al. 2008). Incluso, recientes descubrimientos describen de qué forma este tipo de SASP es capaz de favorecer procesos como la plasticidad celular relacionada con la regeneración de tejidos dañados (Ritschka, Storer et al. 2017) o el reprogramming en un interesante modelo murino de inducción de pluripotencia celular (Mosteiro, Pantoja et al. 2016). Sin embargo, también algunos efectos nocivos del SASP inflamatorio han sido descritos. Generalmente, se asume que cuando las células senescentes no son eficientemente eliminadas este tipo de SASP favorece procesos como el envejecimiento (Childs, Durik et al. 2015) o la iniciación y progresión tumoral (Rodier and Campisi 2011).

Otra subclase de factores del SASP es la que encierra a las llamadas IGF-binding proteins, o IGFBPs. Son capaces de modular la vía de señalización de IGF (Insulin-like growth factor) y fueron causalmente relacionados con la senescencia celular debido a la inducción de ésta por parte de IGFBP5 (Kim, Seu et al. 2007). Otro estudio posterior muestra como IGFBP7 es capaz de modular la inducción de senescencia de manera tanto autocrina como paracrina (Wajapeyee, Serra et al. 2008). En general, todos los factores de esta familia de proteínas se encuentran incrementados en senescencia, lo que indica que la injerencia sobre la vía de señalización de IGF es de gran relevancia para las células senescentes. Como refuerzo sobre esta necesidad de modulación de la vía de IGF, se ha descrito en qué modo otros componentes del SASP como la IL6 o IL1a son capaces de causar resistencia a esta vía de señalización (O'Connor, McCusker et al. 2008), lo que manifiesta una cierta redundancia acerca de la función de distintos

componentes secretados por las células senescentes en cuanto a la intromisión en la señalización metabólica de tejidos circundantes.

El SASP también es capaz de influir sobre la matriz extracelular (Liu and Hornsby 2007) mediante la secreción de proteínas de la familia de las MMP (Matrix-metalloproteinas). Además, este tipo de factores secretados son capaces de contribuir al procesamiento de otros factores del SASP como IL8 (McQuibban, Gong et al. 2002), entre otros miembros de esta familia de quimiocinas CXCL/CCL (Van Den Steen, Wuyts et al. 2003).

Otros factores como serin-proteasas y sus inhibidores (uPA, tPA, PAI-1, PAI-2) son secretados por células senescentes (Blasi and Carmeliet 2002). De hecho, PAI-1 es un factor que ha sido descrito como crucial para la inducción de senescencia replicativa por p53, puesto que la refuerza (Kortlever, Higgins et al. 2006). Además, PAI-1 aparece como un marcador ciertamente robusto que se expresa en mayor medida en células de donantes envejecidos (Mu, Staiano-Coico et al. 1998) e, incluso, en tejidos de ratones con progeria (Baker, Wijshake et al. 2011) o envejecidos de manera natural (Baker, Childs et al. 2016).

Factores de crecimiento como FGF2, FGF7 (Coutu and Galipeau 2011), FGF4, FGF8 (Storer, Mas et al. 2013), EGF (Park, Cho et al. 2001), VEGF (Coppe, Kauser et al. 2006) o PDGF (Demaria, Ohtani et al. 2014) han sido descritos como componentes del SASP. Sin embargo, su función respecto a la inducción de senescencia celular no resulta evidente todavía, puesto que gran parte de los estudios que relacionan estos factores con la senescencia hablan de un posible papel inhibitor de algunos de ellos en función del contexto (Alexander, Yuan et al. 2015). Además, sus niveles de expresión relativamente bajos en comparación con los del SASP inflamatorio (Freund, Orjalo et al. 2010) han ensombrecido su relevancia dentro de la plétora de factores descritos. Cabe la posibilidad de que su inducción, más que como sostén autocrino y paracrino de senescencia celular, esté centrada en la inhibición de senescencia en algunos tejidos circundantes, así como en la diferenciación o el mantenimiento de las células madre (Coutu, Francois et al. 2011) que permitan la sustitución de los tejidos senescentes.

Mención especial cabe para TGFbeta. Dicho factor de crecimiento fue relacionado por primera vez con la senescencia celular como un inductor autocrino y paracrino de la parada del ciclo celular (Acosta, Banito et al. 2013). De hecho, TGFbeta es capaz de inducir la expresión de p15 y p21 en células vecinas, así como de p21 en procesos como

la senescencia programada en desarrollo embrionario (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013).

En torno al 75% de los factores secretados por el SASP están controlados, al menos en parte, por la vía NFκB (Davalos, Coppe et al. 2010). Además, esta vía requiere de la comparecencia de otras que ejercen como potenciadores o complementos necesarios para una secreción efectiva de este tipo de SASP como DDR (Rodier, Coppe et al. 2009), p38 MAPK (Freund, Patil et al. 2011), mTOR (Herranz, Gallage et al. 2015), MLL1 (Capell, Drake et al. 2016) o GATA4 (Kang, Xu et al. 2015).

Sin embargo, quedan todavía por caracterizar en profundidad los reguladores cruciales para la secreción de gran número de factores de las familias de FGF, EGF o TGFβ. En este último caso, recientemente se ha descrito como el control de la célula sobre la vía Notch es necesario para la secreción temprana de TGFβ en senescencia (Hoare, Ito et al. 2016) y, de manera relevante, dicha señalización reprime en una etapa inicial el SASP inflamatorio, poniendo de manifiesto la existencia de una dimensión temporal en la que la composición del SASP varía.

## Modificaciones estructurales de la cromatina (Senescence-associated heterochromatic foci, SAHF)

Las células senescentes establecen una serie de modificaciones estructurales en su cromatina que conllevan la ablación de la expresión de genes de progresión del ciclo celular como E2F (Narita, Nunez et al. 2003). Dichas modificaciones fueron definidas como Senescence-associated heterochromatic foci (SAHF) y consisten en el cambio global en ciertas regiones de la cromatina de las células senescentes que acumulan marcas epigenéticas represoras como H3K9 metilada, HP1 o macroH2A (Aird and Zhang 2013). También se produce una translocación del complejo de histonas y chaperonas HIRA a zonas de acúmulo de proteínas nucleares PML necesaria para la represión de E2F (Vernier, Bourdeau et al. 2011), de algún modo dependiendo de la inhibición de la vía WNT (Ye, Zerlanko et al. 2007). Los SAHFs esencialmente están compuestos de núcleos de H3K9me3 rodeados por capas de H3K27me3 (Chandra, Kirschner et al. 2012). La complejidad de este fenómeno permite que los cambios globales de la cromatina en las células senescentes sean capaces tanto de reprimir la expresión de ciertos genes como

de activar la de otros necesarios para la implantación de su fenotipo (Chandra and Narita 2013).

### Actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia (Senescence-associated beta-galactosidase, SAbetaGal)

La actividad beta-galactosidasa específica de senescencia (SAbetaGal) es un marcador de uso común para la identificación de la senescencia celular (Dimri, Lee et al. 1995). Su incremento de actividad se deriva de la potenciación que las células senescentes manifiestan en cuanto a su actividad lisosomal (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009). Su detección requiere de una mínima conservación de la actividad enzimática de los tejidos o células a explorar y se fundamenta en la detección de dicha actividad del enzima beta-d-galactosidasa a un pH subóptimo de 6.0, difiriendo así de la actividad beta galactosidasa típica que se da a pH 4.0. Sin embargo, todavía se desconoce la implicación que esta actividad lisosomal mantiene en la consecución de la senescencia más allá de ser aceptada como marcador clásico que acompaña de manera habitual a las células senescentes (Lee, Han et al. 2006). A nivel transcripcional, la expresión de este enzima depende de un factor de transcripción relacionado con otros marcadores de senescencia como la inducción de p16INK4a, el factor Sp1 (Morreau, Bonten et al. 1991). Ello suscita la posibilidad de que un marcador tan inexplorado como la actividad beta galactosidasa asociada a las células senescentes puede encontrarse bajo el control de vías de señalización comunes a otras características de la senescencia que han sido delineadas molecularmente con un mayor detalle.

Recientemente, el grupo de Manuel Serrano ha hallado una manera de servirse de esta característica de las células senescentes, la actividad beta-galactosidasa a pH 6.0, para distribuir fármacos específicamente en estas células que permitan, por ejemplo, inducir su desaparición en contextos donde su presencia resulte nociva para la homeostasis tisular (Munoz-Espin, Rovira et al. 2018).

## Alteraciones metabólicas de las células senescentes

Las células senescentes, en contraste con las apoptóticas o las quiescentes, mantienen una elevada actividad metabólica (Wiley and Campisi 2016). Existen varias obviedades al respecto como, por ejemplo, el evidente incremento del tamaño celular derivado del desacoplamiento entre vías anabólicas como PI3K-AKT y el ciclo celular (Demidenko and Blagosklonny 2009). Otro de los fenotipos manifestados por estas células es la producción exacerbada de un gran número de factores secretados necesarios para incidir en el estado celular de manera tanto autocrina como paracrina, el llamado SASP. Curiosamente, ambas características dependen en último término de la activación de mTOR de la que la senescencia celular ha sido identificada como dependiente para muchos de sus rasgos primordiales (Laberge, Sun et al. 2015).

Es conocido de hace tiempo cómo las células senescentes adquieren una mayor inducción de vías glicolíticas en comparación con su fase proliferativa (Bittles and Harper 1984). Sin embargo, y de manera aparentemente contradictoria, tal nivel de activación de la glicólisis conlleva un estado energético bajo debido a los requisitos metabólicos de estas células, produciéndose un incremento importante de los niveles de AMP (Zwerschke, Mazurek et al. 2003) en el que influyen además ciertos cortafuegos metabólicos como, por ejemplo, los que se dan a nivel de la producción de nucleótidos trifosfato para la síntesis de DNA (Aird, Zhang et al. 2013). Este aumento de AMP conduce a la activación de AMPK, uno de los principales sensores celulares de estrés energético (Hardie, Ross et al. 2012). La quinasa AMPK contribuye a la biogénesis mitocondrial, incide sobre la incorporación de glucosa e, incluso, está relacionada de manera íntima con la activación de p53 (Jones, Plas et al. 2005) o de p21 y p16INK4a a través de la degradación de HuR (Wang, Yang et al. 2003). No obstante, y como sucede en diversas facetas fenotípicas de la senescencia celular, en el caso de la biogénesis mitocondrial paradójicamente se requiere también de la activación de mTOR (Correia-Melo, Marques et al. 2016). A este respecto, la activación simultánea de AMPK y mTOR se ha demostrado como necesaria para la producción de metabolitos requeridos en procesos en los que aumenta la biosíntesis celular (Dalle Pezze, Ruf et al. 2016). Casualmente, durante la senescencia, la localización subcelular de mTOR se ve modificada (Narita, Young et al. 2011) y ello habilita su comparecencia simultánea con una vía metabólica clásicamente definida como opuesta: la autofagia. Esta variación en la

ubicación celular de mTOR puede implicar también una interrupción en la inhibición de esta vía llevada a cabo por AMPK al ser activada. Determinar si se requiere de la concurrencia de estas dos vías, mTOR y AMPK, para la producción de metabolitos intermedios destinados a la biosíntesis aumentada típica de la senescencia está todavía por explorar.

Por otro lado, además de contribuir a la inhibición del ciclo celular, p53 es capaz de incidir sobre el estado metabólico de la célula orientándolo, en detrimento de la glicólisis, hacia la fosforilación oxidativa (Kruiswijk, Labuschagne et al. 2015), ruta metabólica descrita como necesaria tanto para la inducción (Kaplun, Zheng et al. 2013) como para el mantenimiento de la senescencia (Passos, Nelson et al. 2010). Con este fin, p53 puede oponerse a la incorporación de glucosa disminuyendo la expresión de transportadores GLUT1 y GLUT4 (Schwartzberg-Bar-Yoseph, Armoni et al. 2004), desviando el flujo glicolítico hacia las vías pentosa-fosfato (PPP) para combatir el estrés oxidativo mediante la inducción de TIGAR (Bensaad, Tsuruta et al. 2006), inhibiendo la glicólisis a nivel de la PDK2 al favorecer la expresión de PARK2 (Zhang, Lin et al. 2011) e incluso conteniendo la activación de mTOR a través de AMPK y PTEN (Feng, Hu et al. 2007). Además, reforzando el papel de AMPK y p53 en parte de la modulación metabólica que se produce en senescencia, un trabajo reciente describe como la disfunción mitocondrial conduce a la activación de ambas vías y establece un tipo de senescencia especial que carece de la producción del SASP inflamatorio (Wiley, Velarde et al. 2016). En este mismo sentido metabólico, otra vía de señalización crucial para la senescencia recientemente vinculada con el apoyo a la respiración mitocondrial en la célula es p38 (Trempelec, Munoz et al. 2017). Concretamente, MK2, quinasa controlada de manera directa por p38, es una de las piezas clave en la influencia de esta vía de estrés sobre el balance del metabolismo celular. No obstante, y de manera aparentemente contradictoria a lo expuesto en la anterior línea, es capaz de afectar a la célula también favoreciendo el flujo glicolítico (Novellasdemunt, Bultot et al. 2013), lo que hace intuir que la acción de la vía sobre el metabolismo puede actuar en sentidos diferentes en función de factores que se sabe influyen en otras vías como, por ejemplo, los niveles de activación o el estado de vías adyacentes.

Otro de los procesos metabólicos inducidos, también controvertido en relación a la activación en senescencia de mTOR, es la autofagia (Narita, Young et al. 2011). A este respecto, la activación simultánea de ambas vías es capaz de lidiar con el necesario

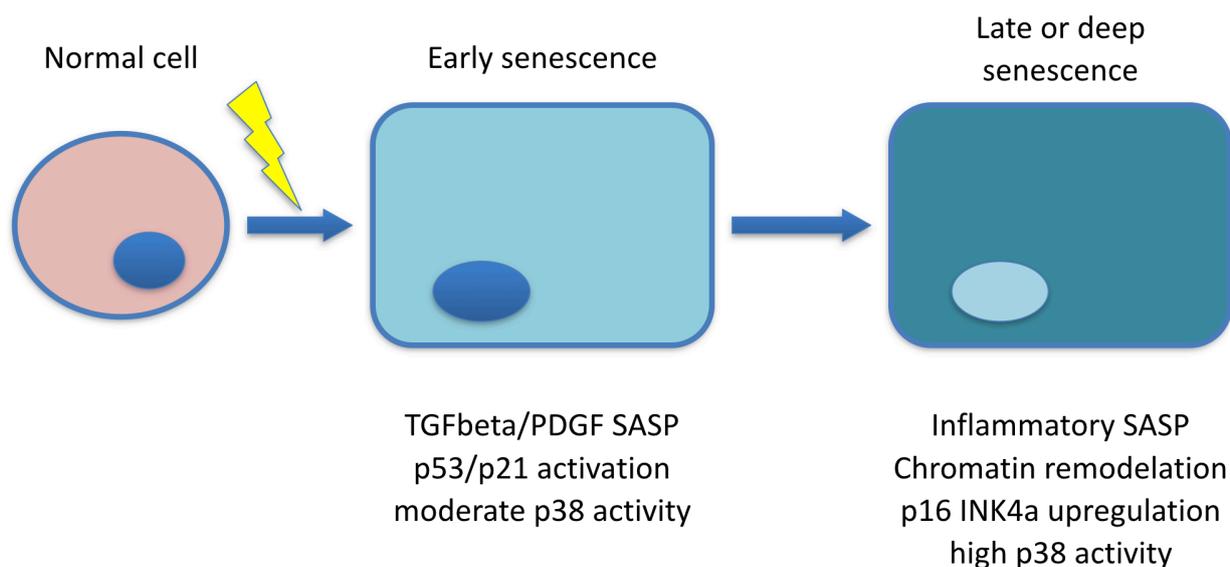
incremento en el recambio celular derivado de una síntesis proteica desmesurada (Salama, Sadaie et al. 2014). De hecho, el incremento global de la autofagia derivada del estrés al que están sometidas las células senescentes permite la estabilización de elementos que son degradados por autofagia basal, como en el caso de GATA4, necesario para la inducción del SASP inflamatorio (Kang, Xu et al. 2015).

Por último, existe un estudio reciente que exhibe un nivel de contradicción similar a todo lo ya mencionado en relación con el metabolismo de las células senescentes, puesto que destaca el papel de RB en la inducción de genes que aumentan el flujo glicolítico aunque, al fin y al cabo, sea para terminar favoreciendo un aumento de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Takebayashi, Tanaka et al. 2015).

Por tanto, en las células senescentes se da una activación de vías metabólicas en principio opuestas que son requeridas para el complejo despliegue fenotípico que manifiestan. Determinar de manera detallada el equilibrio energético en que se encuentran es necesario para comprender la contribución concreta de cada una de las vías de señalización asociadas a senescencia al control metabólico, y por ende fenotípico, de la misma.

## Fenotipo dinámico de las células senescentes

Con la publicación reciente de diversos trabajos esenciales en el campo de la senescencia, el estudio estático de la misma mediante la comparación de células cuya capacidad proliferativa se mantiene intacta con células llevadas a término en su estado senescente otorga una visión muy limitada debido a la naturaleza dinámica de dicho proceso de respuesta celular (van Deursen 2014). Son varias las vías que manifiestan un comportamiento fluctuante durante las distintas fases de la implementación del fenotipo senescente y se presume necesario especificar la relación entre el comportamiento dinámico de todas ellas para el adecuado control de la senescencia, así como para el establecimiento pertinente de la misma en los distintos contextos en que se presenta.



**Figura 10. La senescencia no es un fenómeno estático.** Las células senescentes muestran un fenotipo dinámico en el que el control de distintas vías es capaz de coordinar la evolución adecuada de la respuesta en función del estrés.

La activación de p53 depende principalmente de la señalización por daño al DNA (d'Adda di Fagagna 2008). Resulta notorio el hecho de que la señalización DDR es al inicio más potente y va atenuándose conforme la célula senescente se adentra en su evolución temporal (Freund, Patil et al. 2011). De hecho, para el mantenimiento residual de dicha señalización, uno de los mecanismos postulados es el de la producción de ROS por parte de la mitocondria (Passos, Nelson et al. 2010). En un primer momento, la célula senescente muestra un pico de producción de ROS que parece disminuir levemente para permanecer constante después. Sin embargo, existen diversos trabajos en los que se resalta cómo la producción de ROS mitocondrial no implica necesariamente la producción de daño en el DNA nuclear (Wiley, Velarde et al. 2016), indicando la comprensión parcial existente a este respecto. Una de las dianas insignes de la función de p53 como factor de transcripción en senescencia es p21 (Rufini, Tucci et al. 2013). Existe un gran número de datos en la literatura que destacan cómo los niveles de transcripción de p21 son mayores en un primer momento de la senescencia, coincidiendo con la activación aguda de p53 por DDR, y disminuyen ligeramente con el paso del tiempo (van Deursen 2014). Otro de los indicios que sitúan a p53 como actor clave en el control de la evolución del fenotipo de las células senescentes es el hecho de que mitigue la secreción del SASP

inflamatorio, marcador de senescencia terminal, como ha sido demostrado tanto in vitro (Coppe, Patil et al. 2008) como in vivo (Mosteiro, Pantoja et al. 2016). Existe, por otro lado, un estudio que describe cómo la expresión de Notch1 en queratinocitos, modelo conocido de senescencia (Lewis, Yi et al. 2008), está regulada positivamente por p53. Si en senescencia, la activación temprana de p53 puede conllevar un aumento en la expresión de Notch (Lefort, Mandinova et al. 2007), éste puede acumularse en la membrana y desencadenar la inhibición de C/EBPbeta de la que ya ha sido demostrado como responsable en la fase inicial de la respuesta senescente (Hoare, Ito et al. 2016), produciendo en primer término la represión del SASP inflamatorio. De hecho, el mecanismo que favorece la acumulación de Notch en la membrana de las células senescentes no ha sido todavía desvelado.

En relación con lo mentado en el anterior párrafo acerca de p53, parece lógico que, en cuanto a la inhibición del ciclo celular, la acción casi inmediata del eje p53/p21 preceda al progresivo establecimiento de la expresión persistente de p16INK4a (Stein, Drullinger et al. 1999), puesto que ésta depende en último término de la regulación de elementos epigenéticos como los grupos Polycomb (Bracken, Kleine-Kohlbrecher et al. 2007). A este respecto, la modificación estructural global de la cromatina en las células senescentes es responsable de la consecución de varias de sus diversas características (Shah, Donahue et al. 2013), tratándose de un proceso que se intuye más sosegado que una respuesta inicial de daño al DNA vía p53.

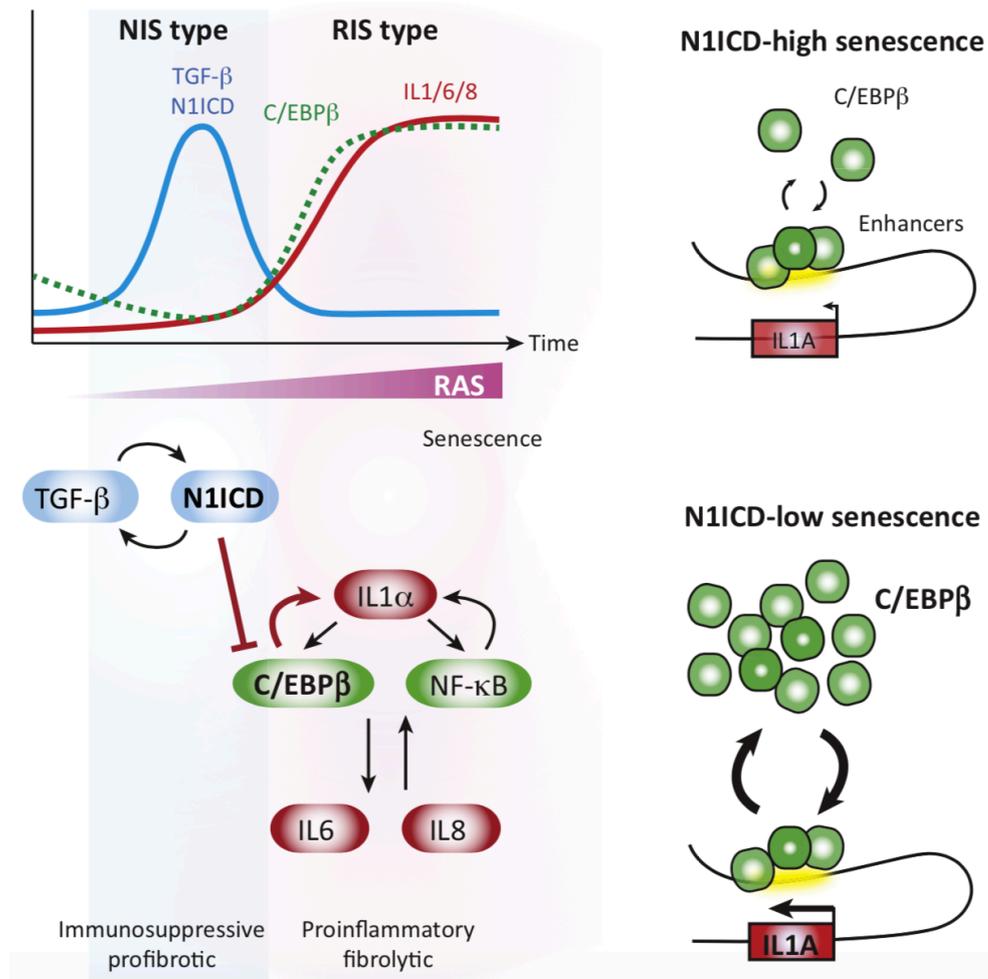
Resulta también llamativo el progresivo incremento de la activación de la vía p38 a lo largo de la implementación dinámica de la senescencia celular. La vía p38, ampliamente descrita como elemento de respuesta al estrés, resulta inducida rápidamente tras cualquier estímulo inductor de senescencia (Debacq-Chainiaux, Boilan et al. 2010). No obstante, al comienzo sus niveles de inducción son manifiestamente menores a los que muestra en la etapa final, encajando además con el grado de expresión de marcadores del SASP tardío como IL6. Concordando con lo anteriormente mentado respecto a la mayor activación de la señalización DDR y p53 en la senescencia temprana, los niveles de activación de p38 son controlados por p53 (Freund, Patil et al. 2011), probablemente a través de la fosfatasa WIP1 (Takekawa, Adachi et al. 2000, Lee, Lee et al. 2009). Cabe también citar la relación de la vía p38 con la inducción de un marcador inicial de senescencia, Notch (Hoare, Ito et al. 2016) en un contexto de expresión oncogénica de Ras (Weijzen, Rizzo et al. 2002). Incluso la consecuencia celular más relevante de dicha

activación de Notch en senescencia, la secreción de TGFbeta, guarda una íntima relación con la vía p38 (Passos, Nelson et al. 2010). Por tanto, el volumen de indicios existentes en torno a la relación de p38 con todas las fases de la senescencia celular posibilita especular acerca de la relevancia de esta vía en la adecuada evolución temporal del fenotipo de la célula senescente.

Por otro lado, la activación de mTOR actúa como soporte metabólico esencial de las células senescentes para la consecución de su fenotipo (Laberge, Sun et al. 2015). De hecho, guardando gran semejanza con la vía p38, mTOR es primordial para la producción tanto del SASP inicial, representado por TGFbeta (Aarts, Georgilis et al. 2017), como del SASP tardío, compuesto de elementos inflamatorios (Herranz, Gallage et al. 2015). En esta misma línea de similitudes con p38, la activación de mTOR es contenida por parte de p53 (Feng, Hu et al. 2007), lo que muestra cómo un control inicial por parte de p53 sobre la activación de estas dos vías puede ser crucial para la naturaleza cambiante del fenotipo senescente. En este mismo sentido caminan ciertos estudios que muestran cómo la activación perpetuada de AMPK, elemento a su vez inhibidor de mTOR y activador de p53, es capaz de estancar a las células senescentes en uno de sus fenotipos tempranos dado que bloquea la producción del SASP inflamatorio mientras la expresión de inhibidores de ciclo no se ve perturbada (Moiseeva, Deschenes-Simard et al. 2013). Cabe señalar, además, cómo la senescencia derivada de disfunción mitocondrial, encauzada a través de la activación de p53 y AMPK, muestra un SASP diferencial en el cual no se hallan los principales elementos del SASP inflamatorio (Wiley, Velarde et al. 2016).

Haciendo acopio de todo lo mentado en los anteriores párrafos, parece que la potente comparecencia inicial de p53 en la senescencia que presenta daño al DNA permite que la célula sea capaz de madurar paulatinamente su respuesta, posibilitando así que sea pertinente y controlada, mostrando dos fases bien diferenciadas: una en que se secreta el SASP derivado de Notch y otra dirigida por NFkB para la secreción del SASP inflamatorio. No obstante, existen contextos en los cuales la senescencia no requiere de la función de p53 para su consecución, y en los que además no se ha hallado la presencia de marcadores de daño al DNA ni producción de SASP inflamatorio. Como ejemplo primordial se encuentra la senescencia asociada al desarrollo embrionario (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013). Este tipo de senescencia pasa por la integridad de p21 pero es independiente de p53, y requiere de la secreción de elementos del SASP no

relacionados con la vía DDR como TGFbeta o FGFs, además de vías como Hedgehog, PI3K-AKT-mTOR o ERK (Storer, Mas et al. 2013). Existe ya literatura que señala la relevancia de las vías mTOR y TGFbeta para la expresión de p21 en senescencia (Aarts, Georgilis et al. 2017), por lo que se deduce que no se trata de un fenómeno aislado sino más bien de un mecanismo adyacente e, incluso, alternativo a la activación de p21 por p53.



**Figura 11. La inducción de la vía Notch es capaz de evitar la secreción de SASP inflamatorio en la fase temprana de la senescencia.** Mediante la inducción del SASP centrado en TGFbeta, la vía Notch es capaz de reprimir la acción de CEBPbeta y, por tanto, la inducción de NFkB y el consiguiente SASP inflamatorio. Obtenido de (Ito, Hoare et al. 2017).

Por tanto, parece que la senescencia dirigida por daño al DNA requiere de la atenuación inicial de la señalización de vías como p38 y mTOR por parte de p53 para, al menos, la coordinación dinámica de los distintos tipos de SASP, mientras que la senescencia

independiente de DDR no necesita de este control temporal sobre la secreción del SASP inflamatorio puesto que no posee activadas todas las vías requeridas para este cometido. Determinar la relación exacta y precisa entre todos estos factores ayudaría a desvelar la relevancia concreta de los mismos en cada fase así como en cada tipo de senescencia celular.

## VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE MODULAN LA SENESCENCIA

### DNA damage response (DDR)

La respuesta de daño al DNA (DNA damage response, DDR) es un complejo mecanismo celular capaz de contestar molecularmente ante la formación de lesiones en la estructura del DNA mediante la activación de diversas vías de señalización. En un primer momento, dichas lesiones acumulan proteínas sensoras que culminan en la inducción de las vías de ATM y ATR. Éstas desencadenan la fosforilación de CHK1 y CHK2, conduciendo a la modificación de proteínas efectoras como p53 y CDC25 (d'Adda di Fagagna 2008). La persistencia de dicha señalización, representada tanto por el agotamiento definitivo de los telómeros (Herbig, Ferreira et al. 2006) como por segmentos de DNA con alteraciones estructurales de la cromatina que refuerzan la senescencia (DNA-SCARs) (Rodier and Campisi 2011), es una de las características asociadas al mantenimiento de la activación de p53. Sin embargo, conforme se profundiza en el conocimiento y la caracterización de los diversos tipos de senescencia, se comienza a observar cómo no en todos los casos se requiere de la activación de la DDR para la función pertinente de ésta, ya que existen varios contextos en los cuales la secreción de los principales factores SASP regulados por dicha señalización (IL6, IL8) no se produce. Ello sucede en procesos donde se ha determinado recientemente el papel crucial de la senescencia como en el desarrollo embrionario (Storer, Mas et al. 2013) o la reparación de heridas cutáneas (Demaria, Ohtani et al. 2014).

## p53

La función que uno de los genes más célebres del genoma de los vertebrados, p53, ejerce en relación con la senescencia celular es tan destacada como compleja. Ello es debido a que en la modulación postraduccional de un amplio abanico de motivos reguladores de p53 convergen varias de las principales vías de señalización relacionadas con senescencia. De hecho, de la combinación de las diferentes modificaciones postraduccionales de p53 se desprende la acción de éste sobre el destino que la célula afronta frente a un determinado estrés, dirimiendo así entre la inducción de senescencia o de apoptosis (Childs, Baker et al. 2014). En un primer momento, p53 fue descrito como un mediador molecular crucial para la inducción de apoptosis en respuesta al estrés celular. Sin embargo, dependiendo de la intensidad o la clase de estresor, p53 es capaz de modular además genes relacionados con homeostasis, inhibición del ciclo celular transitoria e, incluso, senescencia celular (Murray-Zmijewski, Slee et al. 2008). De hecho, el rol principal de p53 en senescencia es la inducción de la expresión de p21, mediador clave de la inhibición del ciclo celular (Rufini, Tucci et al. 2013). La intrincada labor de p53 en senescencia se adivina tras la descripción del papel que interpreta en cuanto a la modulación del SASP inflamatorio, el cual aparece aumentado tanto en células cuya actividad de p53 es inhibida (Coppe, Patil et al. 2008) como en un modelo murino de reprogramming que posee un alelo nulo para este gen (Mosteiro, Pantoja et al. 2016). De acuerdo con este rol controvertido en referencia al SASP, ciertas evidencias señalan que p53 es capaz de influir sobre la señalización metabólica de las células a nivel de AMPK y PTEN, promoviendo por tanto la inhibición de la vía PI3K-AKT-mTOR (Feng, Hu et al. 2007) cuya implicación en la inducción del SASP inflamatorio ha sido recientemente descrita (Herranz, Gallage et al. 2015). No obstante, en un contexto de daño hepático, la ausencia de p53 es suficiente para evadir la respuesta de senescencia en las células esteladas del hígado, conduciendo a un defecto en la secreción de mediadores inflamatorios necesarios para evitar la fibrosis hepática tales como IL6 o ICAM1 (Lujambio, Akkari et al. 2013).

Tanto la señalización de respuesta a daño al DNA como p38 MAPK son capaces de activar p53 mediante la fosforilación de la serina 15 (Saito, Goodarzi et al. 2002) y de las serinas 33 y 37 (Bulavin, Saito et al. 1999), respectivamente. Además, la inducción de p14ARF es capaz de incrementar los niveles de p53 mediante el secuestro de su

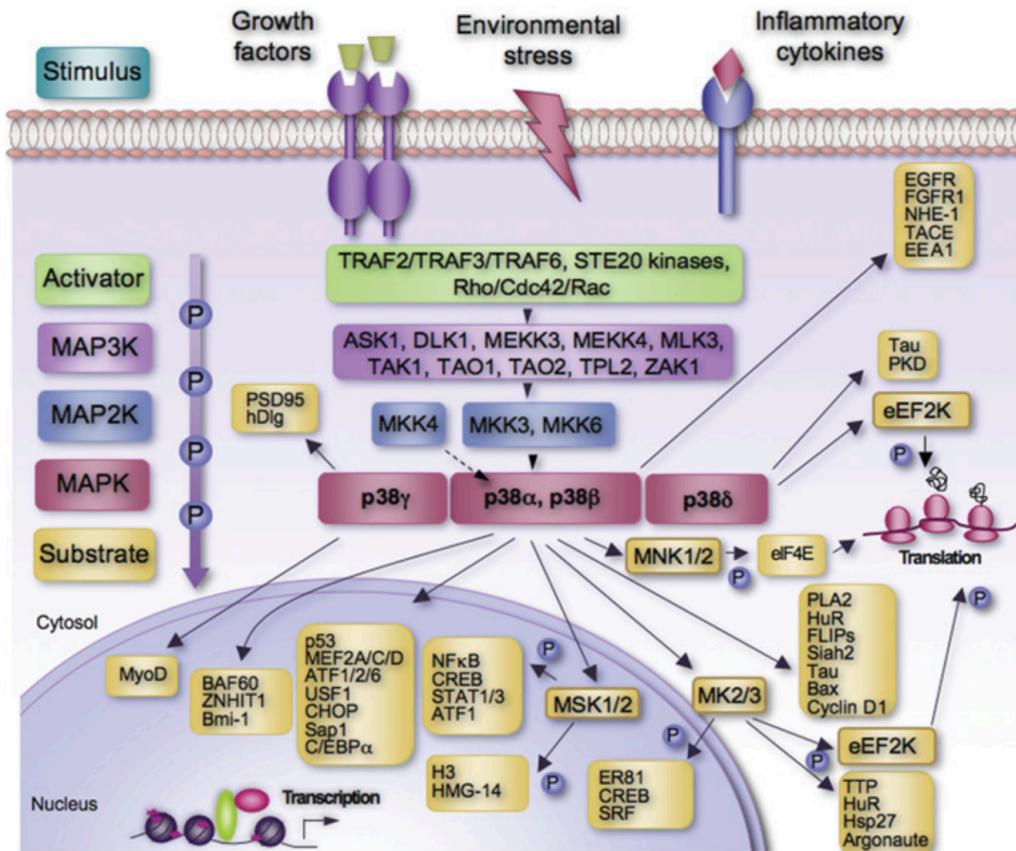
ubiquitin ligasa MDM2 (Kim and Sharpless 2006). Recientemente se han descrito otras formas para regular la función de p53 en senescencia como, por ejemplo, el control de su localización celular por parte de FOXO4 (Baar, Brandt et al. 2017). En senescencia, p53 requiere de interacción con FOXO4 para favorecer su función como factor de transcripción de genes pro-supervivencia y pro-senescencia. Por citar un ejemplo esencial, el gen a partir del que se transcribe p21 posee motivos de regulación transcripcional de p53 y FOXO4, señalando que la acción coordinada de ambos factores de transcripción es requerida para la correcta inducción del mRNA en cuestión. Sin embargo, cuando esta interacción no se lleva a cabo, p53 desencadena apoptosis a través de la transcripción de otro tipo de genes como PUMA, BAX o NOXA, o bien a través de su acción directa sobre los mecanismos de muerte celular (Fridman and Lowe 2003).

Por tanto, p53 se presenta como un efector central de la inmediata inhibición del ciclo celular que se establece en senescencia. Sin embargo, hechos controvertidos como su papel inhibitorio del SASP inflamatorio dan visos de la todavía somera descripción de la labor que p53 lleva a cabo en las células senescentes.

## p38 MAPK

La vía p38 es una de las vías de señalización de las llamadas MAPK (Mitogen-activated protein kinase), compuestas, además, por las vías ERK y JNK. La familia de quinasas p38, también denominadas SAPK (Stress-activated protein kinase) está compuesta por cuatro isoformas: alpha, beta, delta y gamma. Estas isoformas difieren en expresión a través de los diferentes tipos celulares, en las quinasas responsables de su activación y en las consecuencias a nivel molecular de dichas activaciones. Como en otras cascadas de señalización, la vía de p38 requiere de la activación escalonada de MAPK quinasas quinasas en primer término (MAPK3Ks como MTK1, MLK2, MLK3, DLK, ASK1 o TAK1), y de MAPK quinasas en segundo lugar (MKKs como MKK3, MKK4 o MKK6). Estas últimas activan directamente p38 mediante fosforilaciones que dependen de tipo celular y de estímulo inductor (Cuadrado and Nebreda 2010). No obstante, la activación de p38 de manera independiente de las MKKs ha sido también observada en varios contextos celulares (Ashwell 2006). Tras la inducción, la actividad de p38 es negativamente regulada por fosfatasa como MKP1, MKP4 o MKP5, además de otras como PP2C o

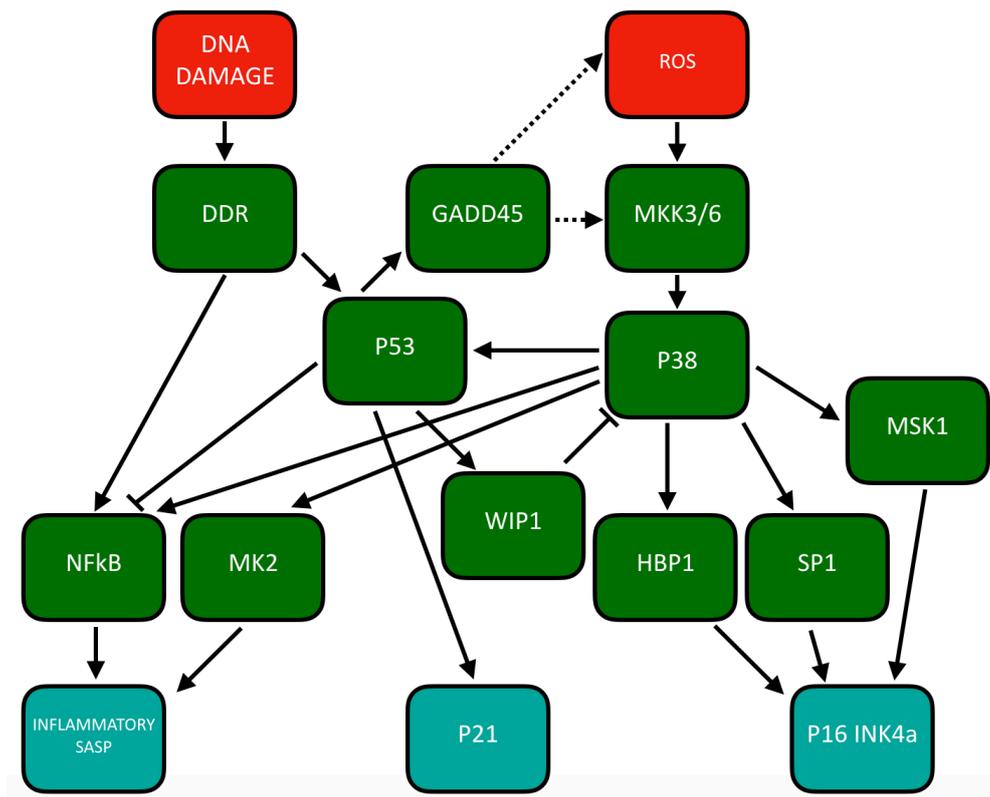
WIP1. Por otro lado, numerosas serina-treonina quinasas, factores de transcripción y reguladores de ciclo celular han sido identificados como dianas moleculares que median la acción de p38 sobre el statu quo celular (Shi and Gaestel 2002).



**Figura 12. Diagrama descriptivo de la vía p38 MAPK.** Se muestran en este esquema tanto los distintos inductores de la vía como los elementos que forman parte de la misma, las MAP3Ks, MAP2Ks y MAPKs, así como sus sustratos moleculares que determinan el efecto sobre la célula. Obtenido de (Cuadrado and Nebreda 2010).

La implicación de la vía p38 MAPK en la senescencia celular fue puesta de manifiesto por primera vez al ser observada como efecto colateral de la hiperactivación de la vía RAS asociada a la senescencia inducida por oncogenes (Wang, Chen et al. 2002). De hecho, en dicha publicación se relata como, de ser inhibida la vía p38, la senescencia inducida por RAS no se lleva a cabo, desvelando así el papel esencial que p38 interpreta en la respuesta celular frente a la señalización aberrante en este tipo de senescencia. Este rol concreto de p38 en OIS pasa por la activación que se da en las MKKs 3 y 6 a consecuencia de la inducción de ERK, situada bajo el control del eje RAS-RAF-MEK (Iwasa, Han et al. 2003). El exceso de señalización de ERK conduce a la activación de

las MKKs no mediante una modulación directa de la vía p38, sino a través del aumento de producción de ROS que conlleva tal exceso de actividad mitogénica (Colavitti and Finkel 2005). Dicha conexión entre las vías ERK y p38 a través de la producción de ROS requiere, en parte, de la acción de las oxidasas Nox1 y Nox4 (Kodama, Kato et al. 2013). No obstante, un fenómeno que enlaza dos vías cruciales para la senescencia, ERK y p38, requiere de una caracterización más profunda de los recursos moleculares utilizados por la célula para el acoplamiento de estas dos vías de señalización. Además, los nexos descritos se dan en casos y tipos celulares concretos, como sucede para Nox1 y Nox4 en células REF52 y TIG-3 o para MINK en células epiteliales de ovario, por lo que actualmente se carece del conocimiento de mecanismos más generales suficientemente detallados que establezcan una relación más robusta entre ERK, ROS y p38 en senescencia.



**Figura 13. Representación de los elementos moleculares sobre los que la vía p38 tiene un papel en la senescencia.** En la figura se muestran, además del principal inductor, el estrés oxidativo, las proteínas sobre las que p38 ejerce un control ya demostrado en la senescencia celular.

El hecho de que la expresión forzada de mutantes constitutivamente activos de MKK3 y 6 cause senescencia y de que la adición de un inhibidor de p38 denominado SB203580 evite la inducción de OIS sitúan a p38 en un lugar central de la respuesta celular al estrés causado por activación oncogénica (Han and Sun 2007). Con los conocimientos desarrollados en torno a la senescencia celular de manera posterior al estudio de p38 en OIS, el papel de esta vía adquiere una relevancia incluso mayor dado que ha sido identificada como activada por todos los inductores de senescencia celular. Tanto el estrés oxidativo (Barascu, Le Chalony et al. 2012) como el daño al DNA (Raman, Earnest et al. 2007) que se producen como consecuencia de la activación de oncogenes son estímulos que convergen en el incremento de la actividad de p38. También, otros elementos de la vía como la quinasa Mnk1, que también depende de ERK, incrementa su actividad en senescencia (Ziaei, Shimada et al. 2012). Incluso, en situaciones en las que la senescencia es controlada de manera paracrina mediante TGFbeta (Acosta, Banito et al. 2013) p38 puede aparecer como elemento relevante debido a la estrecha relación molecular que mantiene con esta vía (Yu, Hebert et al. 2002). De hecho, el eje que comprende a p53/p21, ROS, p38 y TGFbeta ha sido desvelado como una de las rutas clave de retroalimentación positiva para el establecimiento y la persistencia de la senescencia celular (Passos, Nelson et al. 2010). Por tanto, obviando la relación jerárquica existente entre todos los estímulos inductores de senescencia, p38 aparece como mediador clave de todos ellos.

Varios estudios sitúan a p38 como regulador directo de diversos eventos relacionados con las características clásicas manifestadas por las células senescentes. En primer lugar, la activación de p38 modula post-traduccionalmente a p53, influyendo de manera directa o indirecta en éste mediante fosforilaciones en diversos residuos de serina relevantes para la función de p53 en senescencia (Sun, Yoshizuka et al. 2007). No obstante, a su vez, p53 es capaz de controlar el nivel de activación de p38 por medio de la inducción de WIP1, indicando la necesidad de una cierta contención de la actividad de p38 en función de los requerimientos de la célula (Takekawa, Adachi et al. 2000). De hecho, existe un considerable número de estudios que señalan, por ejemplo, la intervención de WIP1 en un sentido contrario a la inducción de senescencia por la cooperación de p53 y p38 (Sakai, Fujigaki et al. 2014), la oposición de esta fosfatasa a la inducción de p16INK4a por parte de p38 en tumores mamarios (Bulavin, Phillips et al. 2004), e incluso la contraposición de WIP1 a la inducción de la vía NFkB derivada de la activación de p38 (Chew, Biswas et al. 2009). No obstante, la jerarquía y la relevancia

mecanística entre WIP1, p53 y p38 en senescencia celular es un asunto que todavía está por desvelar. Aunque no entre en gran detalle, existe ya un estudio que muestra la relevancia de la vía p38 en la expresión de diversos inhibidores de ciclo en varios tejidos envejecidos que correlacionan, además, con la disminución de los niveles de WIP1 en los mismos (Wong, Le Guezennec et al. 2009), hecho que insinúa la importancia que puede guardar la relación entre las proteínas citadas en procesos relacionados con la senescencia.

Por otro lado, p38 es capaz de regular la expresión del locus INK4a/ARF mediante la fosforilación inactivadora de HBP1, que ejerce como represor transcripcional de dicho locus (Xiu, Kim et al. 2003), la activación de Msk1, que ejerce control epigenético de la expresión del locus (Culerrier, Carraz et al. 2016) o la inhibición de la unión a cromatina del componente represor Polycomb BMI1 (Voncken, Niessen et al. 2005). Un estudio reciente habla, incluso, de la influencia directa de p38 sobre el estado post-traducciona l de RB (Gubern, Joaquin et al. 2016). Aunque se hayan demostrado de manera algo preliminar, existen elementos moleculares relacionados con esta vía que se han desvelado relevantes para la inhibición del ciclo implementada en senescencia como, por ejemplo, el control del factor de transcripción Sp1 por parte de p38 (Wu, Xue et al. 2007). Sin embargo, el hecho de que p38 sea activado también en la inhibición por contacto de la proliferación celular (Faust, Dolado et al. 2005) indica que la regulación de la expresión de inhibidores de ciclo por parte de esta vía requiere de elementos adicionales, y todavía inexplorados, que desencadenen una inducción irreversible con tal de establecer senescencia (Sun 2014).

En cuanto al SASP, p38 ha sido caracterizado como un potenciador necesario de la vía NFkB que actúa independientemente de la señalización de daño al DNA para la producción del SASP inflamatorio (Freund, Patil et al. 2011). Pese a que en el citado trabajo la inducción forzada de p38 mediante MKK3/6 constitutivamente activa es capaz de conducir a la célula a la producción de citoquinas como IL6 e IL8, una reducción de la activación de p38 a niveles acordes a lo que acaece en una senescencia canónica sugiere la necesidad de confluencia de varias vías reguladoras del SASP inflamatorio para la producción efectiva de éste. Además, en relación a este tipo de SASP, p38 colabora con mTOR puesto que, mediante 4EBP1, mTOR regula los niveles de MK2, quinasa directamente regulada por p38 que controla los niveles de mRNA de componentes del SASP inflamatorio (Herranz, Gallage et al. 2015). Recientemente, la vía

Notch ha sido descrita como crucial para la regulación en cuanto a la dinámica temporal de inducción del SASP (Hoare, Ito et al. 2016). En un primer momento, en la OIS, se induce la vía Notch y se produce la secreción de factores de SASP cuyo elemento central es TGFbeta. Posteriormente, este tipo de SASP da paso al de cariz inflamatorio centrado en citoquinas como IL6 e IL8 (Ito, Hoare et al. 2017). Pese a que la relación directa no está descrita de manera concreta, la regulación de la activación de Notch por p38 en un contexto de senescencia (Weijzen, Rizzo et al. 2002) permite especular sobre la importancia de esta vía en la variación del contenido del SASP en un sentido temporal. El control de p38 sobre fenómenos que son excluyentes en la senescencia, como los dos SASPs citados, puede ser explicado, por ejemplo, por la variación en los niveles de activación que se dan en la vía al comparar una etapa de senescencia temprana con una tardía, siendo sustancialmente mayores en esta última fase de la respuesta senescente (Freund, Patil et al. 2011). Incluso, dado que aparece íntimamente relacionada, cuando no implicada directamente, con todos los tipos de senescencia descritos hasta la fecha, la vía p38 se presume como relevante en la modulación del fenotipo de senescencia implementado por la célula en función del contexto en que ésta se presenta, pudiendo ejercer de elemento de control central dependiente de la comparecencia de otras vías adyacentes que terminen de definir la respuesta senescente en cada situación.

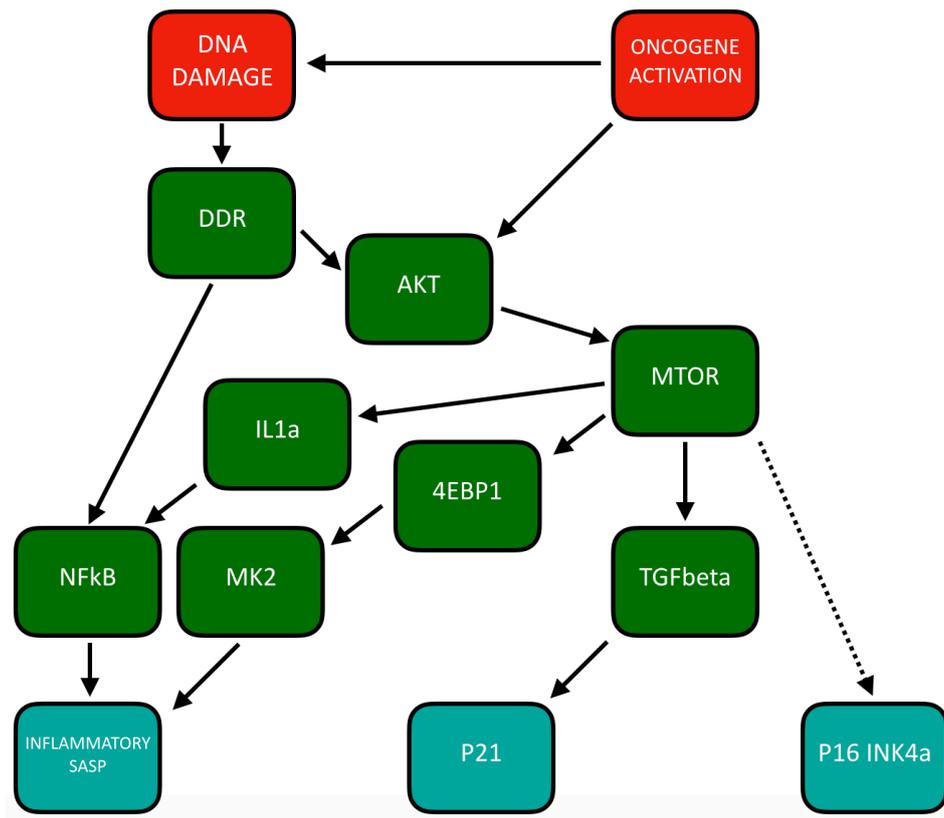
## AKT - mTOR

Este eje regulador crucial del metabolismo anabólico celular, compuesto por la diana molecular de la rapamicina (mammalian target of rapamycin, mTOR) y PI3K-AKT, ha sido descrito en gran número de publicaciones como una de las vías activadas en la senescencia causada por todos los tipos de inductores clásicos (Blagosklonny 2012). De hecho, más allá de la activación aberrante de PI3K-AKT que se presupone de la señalización constitutiva de Ras en OIS, AKT se activa tras la producción de daño al DNA (Viniestra, Martínez et al. 2005) y es un mediador clave de la transmisión de dicha señal de estrés a la vía ERK que permite que las células sobrevivan con niveles de daño como los que inducen senescencia en lugar de apoptosis (Khalil, Morgan et al. 2011). Adicionalmente, a este nivel de la vía AKT-mTOR, la delección del regulador negativo PTEN es capaz de inducir un tipo de senescencia celular que no está mediada por la inducción de DDR (Alimonti, Nardella et al. 2010).

Las células senescentes, debido a su carácter secretor, requieren de una elevada síntesis proteica que puede explicar la dependencia de éstas de la vía mTOR. De hecho, se ha descrito cómo en células a las que se les ha inducido senescencia con tratamientos quimioterapéuticos el índice de incorporación de metionina marcada se ve incrementado (Dorr, Yu et al. 2013). También, una de las características que manifiestan las células senescentes es un incremento en su tamaño que puede estar reflejando el desacoplamiento de las vías de crecimiento anabólico como mTOR y el ciclo celular (Demidenko and Blagosklonny 2009).

Como anteriormente ya se ha relatado, mTOR es capaz de influir sobre el SASP inflamatorio mediante la regulación de los niveles de traducción tanto de la IL1a (Laberge, Sun et al. 2015) como de la quinasa dependiente de p38 MK2 (Herranz, Gallage et al. 2015). Este último estudio se basa en el análisis del fenotipo secretor de las células senescentes tras la adición de reconocidos inhibidores de la vía mTOR como la rapamicina. No obstante, generalmente, la disminución en la secreción de factores del SASP se acompaña de un defecto en la inducción de los inhibidores de ciclo clásicos de senescencia como p16INK4a o p21 suficiente para la evasión de senescencia inducida por reprogramming con OSKM (Aarts, Georgilis et al. 2017) pero incapaz de revertir su freno proliferativo en OIS (Herranz, Gallage et al. 2015). Tal refuerzo de la capacidad de mTOR de inducir la inhibición del ciclo celular se deriva, principalmente al menos, de la necesidad celular de activación de esta vía para mantener un soporte metabólico a la producción de todos los tipos de SASP, tanto el temprano asociado a TGFbeta (Aarts, Georgilis et al. 2017) como el tardío dependiente de NFkB (Herranz, Gallage et al. 2015). Por otro lado, la vía mTOR puede servir de enlace entre la señalización DDR activadora de AKT y la producción aumentada de mitocondrias, y por consiguiente de ROS, a través del incremento de PGC1b (Correia-Melo, Marques et al. 2016).

Sin embargo, pese al soporte que la señalización de mTOR proporciona a la expresión de los inhibidores de ciclo, esta vía parece guardar un mayor nivel de trascendencia para la faceta secretora de las células senescentes. Apuntando en esta dirección, existen estudios que señalan cómo el uso de fármacos que inhiben mTOR tanto de manera directa, siendo la rapamicina el ejemplo por antonomasia (Laberge, Sun et al. 2015), como de manera indirecta al referirnos al activador molecular de AMPK, la metformina (Moiseeva, Deschenes-Simard et al. 2013), son capaces de entorpecer la secreción del SASP.



**Figura 14. La vía PI3K-AKT-mTOR y su papel en la senescencia celular.** En el esquema se muestran los distintos activadores directos de AKT-mTOR en senescencia y sus consecuencias moleculares, relevantes para las distintas características de las células senescentes.

## NFkB

Varias de las vías ya desglosadas, como DDR, mTOR o p38 son capaces de inducir o potenciar NFkB, promoviendo en último término la producción del SASP inflamatorio, uno de los principales fenotipos que manifiestan las células senescentes (Chien, Scuoppo et al. 2011). Esta activación de NFkB y CEBPbeta es capaz de desencadenar el establecimiento de un loop autocrino y paracrino iniciado por IL1 que conlleva la secreción amplificada de IL6 e IL8 (Kuilman, Michaloglou et al. 2008).

Los complejos de NFkB involucran la dimerización de cinco miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 y p52/p100, siendo la composición canónica el dímero p50 y p65 (Hoffmann and Baltimore 2006). Esta vía se mantiene inactiva hasta que se produce la disgregación entre los elementos inactivadores Ikb y la subunidad con actividad

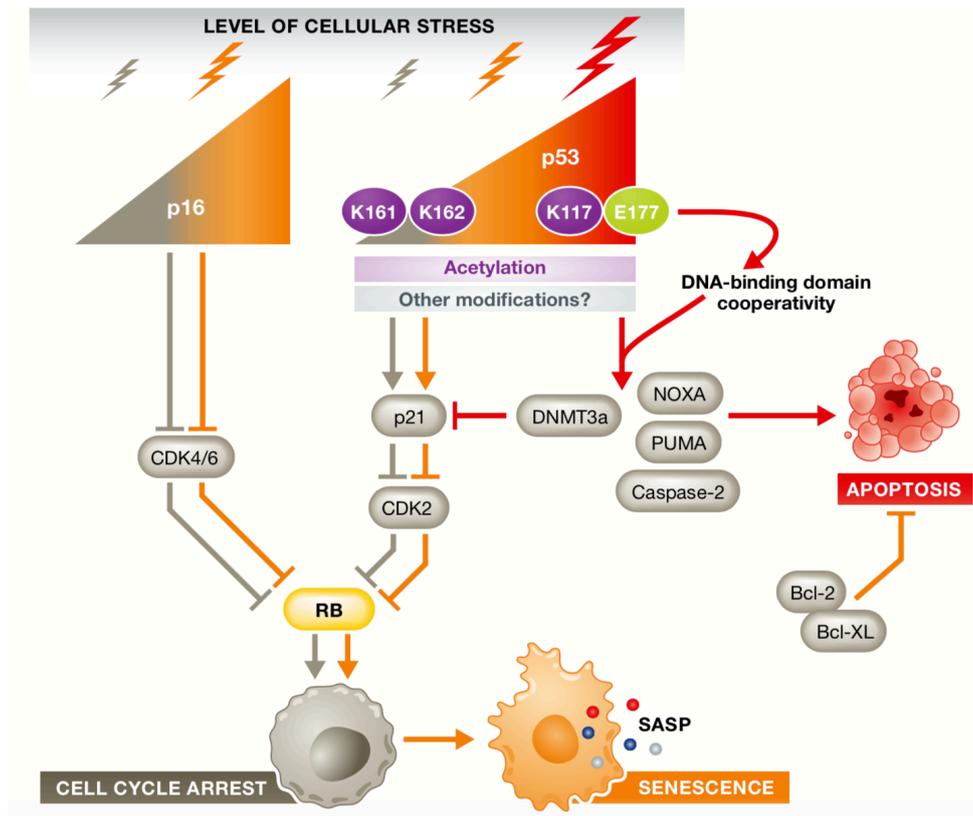
transcripcional p65, permitiendo así la interacción de esta última con p50 y la posterior translocación al núcleo de la célula (Wan and Lenardo 2009).

La relevancia de esta vía para el control del SASP es tal que se responsabiliza de la correcta secreción de en torno al 75% del compendio de factores producidos por las células senescentes (Davalos, Coppe et al. 2010). Por ello, requiere de múltiples elementos de control adyacentes que modulan el espectro de factores producidos en función del tipo celular y el estímulo inductor (Soto-Gamez and Demaria 2017).

## Resistencia a apoptosis

Esencialmente, la senescencia es una respuesta celular ante un variado catálogo de estresores capaces de desencadenar sus procesos moleculares característicos ya desglosados. Sin embargo, cuando la magnitud de estos estresores es lo suficientemente grande, las células favorecen una respuesta de tipo apoptótica (Childs, Baker et al. 2014). Dilucidar los mecanismos de los que se sirven las células para dirimir la respuesta frente a un determinado estrés se presume esencial de cara a un necesario entendimiento de la relación entre los fenómenos de senescencia y apoptosis.

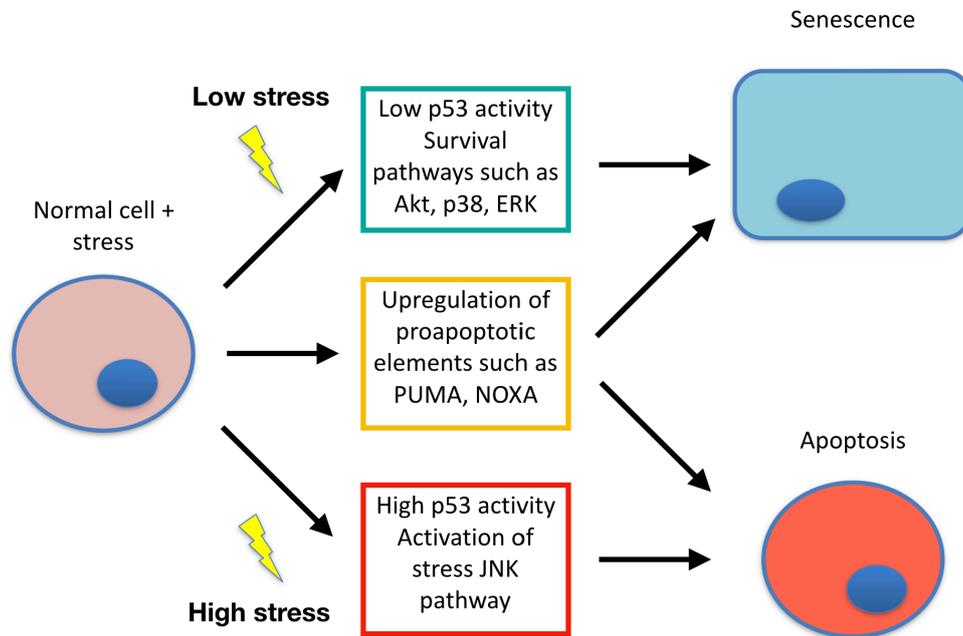
Como ya se ha comentado, vías de señalización como la respuesta al daño en el DNA son capaces de inducir senescencia celular (d'Adda di Fagagna, Reaper et al. 2003). Sin embargo, dicha vía de señalización ha sido ampliamente descrita como una de las causas del proceso de apoptosis (Roos and Kaina 2006). Curiosamente, uno de los principales elementos regulados por la señalización DDR es p53, clave tanto en senescencia (Efeyan and Serrano 2007) como en apoptosis (Vousden and Lane 2007). De hecho, ha sido reiteradamente descrito cómo, en función de la intensidad del estrés, las células inducen senescencia en el caso de niveles bajos de estresor o apoptosis si se trata de dosis elevadas, siempre y cuando dichos estresores superan cierto umbral. Para este cometido, se han utilizado inductores de daño al DNA como etopósido (Probin, Wang et al. 2006) o radiación ultravioleta (Debacq-Chainiaux, Borlon et al. 2005) y se ha evaluado el contraste de la respuesta celular a diferentes niveles de daño.



**Figura 15. La determinación de la magnitud del estrés recibido por la célula llevada a cabo por p53 es capaz de decidir entre senescencia y apoptosis.** En el esquema se especifica cómo, a través de las modificaciones post-traduccionales de p53, la célula es capaz de activar programas de senescencia o apoptosis en función del nivel de daño recibido.

De manera similar a los agentes lesivos del DNA, el estrés oxidativo manifiesta esta característica de dependencia de dosis en cuanto a la inducción de senescencia o apoptosis en fibroblastos como las IMR90. En estas aproximaciones experimentales, la inducción de estrés oxidativo en fibroblastos produce un mosaico de células que inducen senescencia o apoptosis en función del estrés recibido. Al analizar los niveles de p53 en cada uno de los casos, se observa como aquellas condenadas a muerte apoptótica se expresa casi el doble que en las que implementan senescencia (Chen, Liu et al. 2000). Por tanto, los inputs que recibe p53 en función del estrés utilizado parecen ser determinantes para el destino de la célula y ello conduce a que una revisión exhaustiva de las vías de señalización reguladoras de p53 activadas en cada caso adquiera gran relevancia. De hecho, en un modelo de ratón cuyo p53 tiene una capacidad deficiente de inducción de la respuesta apoptótica al albergar la mutación R172P, la acumulación de células senescentes en el organismo se produce de forma prematura y conduce a la aparición de enfermedades asociadas a la edad como la diabetes tipo 2 (Tavana, Puebla-

Osorio et al. 2010), sugiriendo la capacidad de p53 de influir sobre la aparición del envejecimiento en función de su mediación entre las respuestas de apoptosis y senescencia.



**Figura 16. Resumen gráfico de las vías activadas por la célula en función del estrés.** En este esquema podemos observar cómo a niveles bajos de estresor se activan vías de supervivencia y de senescencia como AKT, p38 o ERK mientras que, en casos de daño elevado, las células no son capaces de activarlas y la acción de p53 se dirige hacia la inducción de apoptosis.

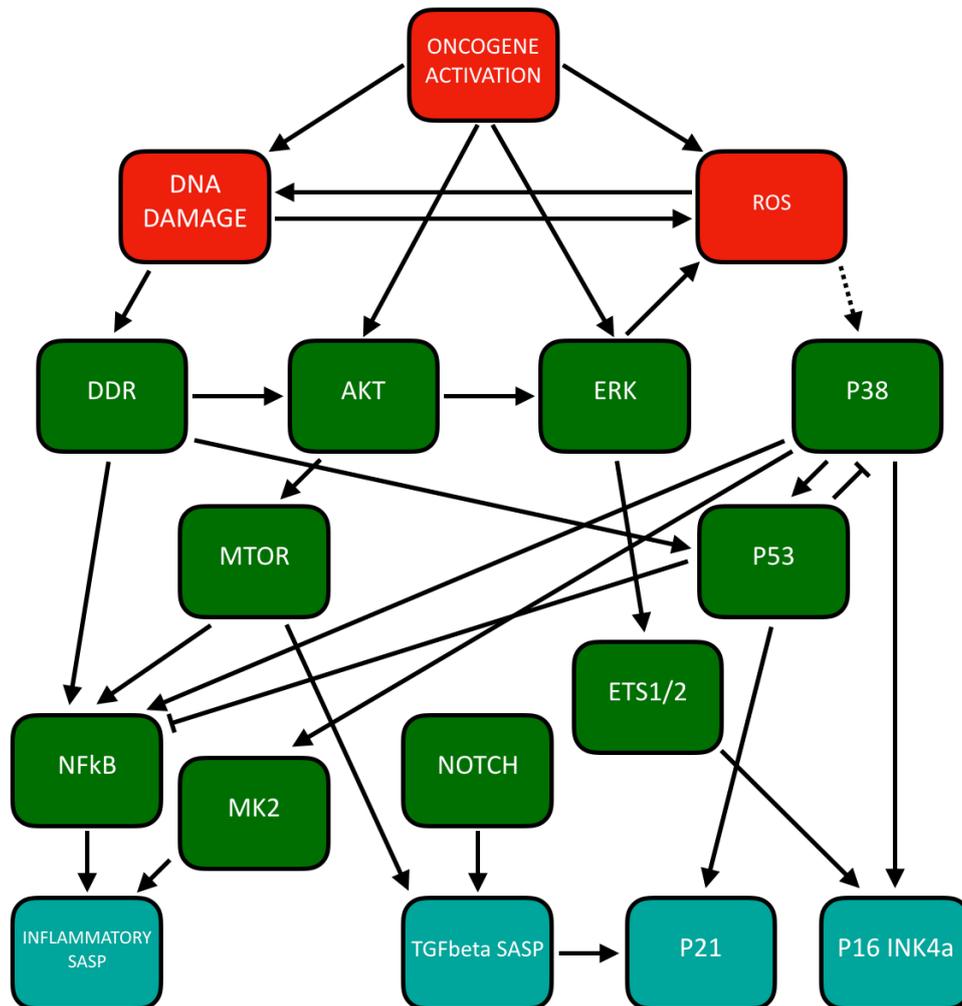
A este respecto, tanto las vías de supervivencia asociadas a senescencia como las de muerte apoptótica son capaces de regular a p53 y de ser, a su vez, moduladas por éste. Esta proteína, tan célebre como compleja, posee un gran número de reguladores que pueden influir en un amplio abanico de modificaciones post-traduccionales hacen discernir a este factor de transcripción entre la inducción de apoptosis o senescencia (Webley, Bond et al. 2000). Por ejemplo, residuos de p53 acetilables como la lisina 117 son capaces de determinar la preferencia de la proteína por la inducción de PUMA o NOXA en lugar de p21 (Li, Kon et al. 2012). Existen diversos estudios que relacionan p53 y p38 en la modulación de la respuesta apoptótica en función de la magnitud del estrés ocasionado a la célula (Gong, Liu et al. 2010). En este mismo sentido, ciertas

serinas de p53 pueden ser reguladas por p38, favoreciendo así la expresión de p21 necesaria para la senescencia en gran variedad de contextos celulares en que se presenta (Sun, Yoshizuka et al. 2007, Xu, Li et al. 2014). Este inhibidor de ciclo ha sido recientemente señalado como crucial para el mantenimiento de la viabilidad celular bajo la señalización persistente de daño al DNA característica de senescencia a través de la contención en cuanto a los niveles de activación de esta vía así como, simultáneamente, mediante la inhibición de JNK (Yosef, Pilpel et al. 2017). En este sentido, resulta relevante señalar cómo el balance entre p38 y JNK controla la expresión de p16INK4a en función de la dosis de estresores como, por ejemplo, la doxorrubicina (Spallarossa, Altieri et al. 2010). En fibroblastos MRC5, la inducción de la vía PKC se presenta como necesaria para el impedimento de la inducción de apoptosis por parte de p53, al parecer a través del control de su nivel de expresión tras la acción de un estresor (Bluwstein, Kumar et al. 2013). En cuanto a la vía PI3K-AKT, las células requieren de su activación para el mantenimiento de la viabilidad celular, puesto que cuando dicha señalización es deficiente aumenta la susceptibilidad a apoptosis en condiciones de estrés oxidativo (Nogueira, Park et al. 2008). Reforzando la posibilidad de una cierta cooperación entre todas estas vías relacionadas con la supervivencia en ciertas circunstancias de estrés leve o moderado, p38 es capaz de favorecer la activación del eje mTOR-S6K (Gutierrez-Uzquiza, Arechederra et al. 2012).

Las células senescentes, por tanto, son células que deciden hacer frente a un estrés induciendo vías de supervivencia y resistencia a apoptosis. El sentido evolutivo de esta dicotomía molecular reside en que la persistencia de las células senescentes debidamente controladas favorece procesos de regeneración o vigilancia inmune frente a la aparición de estresores que rompen con la homeostasis tisular como daños celulares o activación de oncogenes en comparación con el mero suicidio celular que implementan las células apoptóticas (Childs, Baker et al. 2014). Sin embargo, el hecho de que las células senescentes activen vías de supervivencia surge como compensación a la activación de vías apoptóticas inherentes al daño celular (Baar, Brandt et al. 2017). De hecho, las células senescentes se sitúan en un delicado equilibrio sostenido por vías que mantienen su viabilidad y evitan que caigan en la inducción de una apoptosis hacia la que están molecularmente orientadas mediante la inducción de genes como PUMA o BIM. Esta característica está siendo explotada a través de la adición de fármacos llamados senolíticos, cuyo objetivo es eliminar preferentemente células senescentes bloqueando sus imprescindibles soportes de viabilidad. De hecho, inhibidores de proteínas

antiapoptóticas de la familia de BCL2 (Chang, Wang et al. 2016) como BCL-XL (Yosef, Pilpel et al. 2016), inhibidores de HSP90 (Fuhrmann-Stroissnigg, Ling et al. 2017) o un inhibidor de la interacción entre FOXO4 y p53 (Baar, Brandt et al. 2017) han sido probados como efectivos para la eliminación de células senescentes en contextos donde ejercen un papel nocivo para el organismo, revirtiendo así los perjuicios tisulares de los que son responsables. Por tanto, nos encontramos ante un momento clave en que la identificación de posibles dianas senolíticas a través del conocimiento de las vías específicas requeridas por las células senescentes para su supervivencia se presume esencial para abordar problemas de salud tan relevantes como el envejecimiento (Soto-Gamez and Demaria 2017) o el cáncer (Demaria, O'Leary et al. 2017).

Existen también estudios que resultan ciertamente controvertidos en cuanto a la relación excluyente entre senescencia y apoptosis comentada en este apartado. Siendo más concretos, los dos artículos primigenios acerca de la senescencia en el desarrollo embrionario (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013, Storer, Mas et al. 2013), comentan cómo, una vez realizada la función morfogénica de la que hacen gala en las diversas estructuras embrionarias, las células senescentes desaparecen por apoptosis y son eliminadas por el sistema inmune. La entrada de las células senescentes en apoptosis en este caso particular, resulta, cuanto menos, llamativa si consideramos todo lo expuesto en los anteriores párrafos. No obstante, incluso en los estudios citados en estas líneas, se especula acerca del papel antiapoptótico que protagonizaría p21 en un primer momento, conducido por TGFbeta, mientras que al cabo de un determinado tiempo dicho pico de expresión, al disminuir, conduciría a la inducción de apoptosis, hecho que no sucede en otros casos más generales de senescencia, que se sirven de otros mecanismos de irreversibilidad que probablemente también se contrapongan a la muerte apoptótica (Storer, Mas et al. 2013). Sin embargo, para un mejor entendimiento del proceso que nos aleje de la mera especulación se necesitaría un estudio en mayor profundidad de la dinámica de los distintos estímulos recibidos por las células senescentes en este contexto específico y un conocimiento preciso de las vías de señalización activadas en cada momento.



**Figura 17. Esquema general de las vías relevantes para la senescencia celular descritas en la literatura.** Las tres causas principales, activación oncogénica, daño al DNA y producción de ROS, íntimamente relacionadas entre sí, activan diferentes vías de señalización con el objetivo de coordinar de manera precisa la inducción de senescencia.

## SENESCENCIA CELULAR IN VIVO

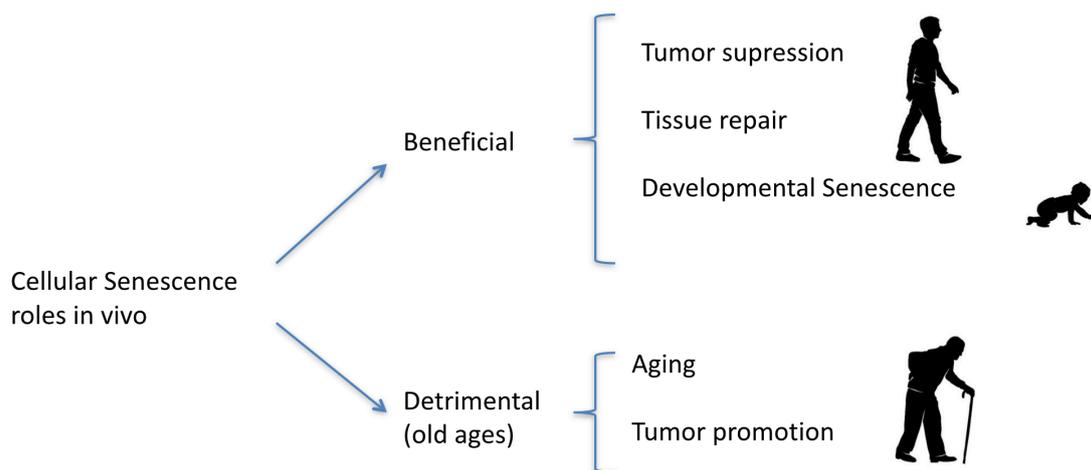
### Regeneración tisular

La senescencia, a través de su fenotipo secretor, es capaz de coordinar la reparación eficiente de ciertos tejidos tras la producción de lesiones celulares en éstos. Un ejemplo bien descrito de este papel beneficioso en cuanto a la regeneración de tejidos dañados se halla en la reparación de heridas cutáneas (Jun and Lau 2010). En este primer estudio se describió cómo los fibroblastos son reclutados a las zonas dañadas y se diferencian en miofibroblastos productores de matriz extracelular necesaria para la reparación. La unión de dichos miofibroblastos a CCN1, una proteína de la matriz, desencadena la inducción de senescencia celular, hecho que parece impedir la aparición de fibrosis en el tejido cutáneo. Ello fue corroborado por un estudio reciente que ofrece una profundización en el entendimiento de la implicación de la senescencia en la reparación de este tipo de lesiones (Demaria, Ohtani et al. 2014). A través de un modelo murino transgénico en el que se pueden eliminar de manera selectiva las células senescentes se identificó cómo la producción de ciertos factores del SASP por éstas es necesaria para la reparación óptima del tejido cutáneo. Concretamente, se revela cómo la producción de PDGF $\alpha$  por parte de células epiteliales senescentes es crucial para este proceso de regeneración. No obstante, la aproximación experimental que realizan para obtener las células senescentes del tejido dañado produce un enriquecimiento en el contenido de células epiteliales, omitiendo el rol de otros tipos celulares previamente descritos como relevantes, como son los miofibroblastos. Este hecho oscurece la comprensión de la contribución de los factores SASP producidos otras estirpes celulares senescentes en este proceso. Por ejemplo, existen claras evidencias del papel de factores englobados en el SASP en la reparación de heridas cutáneas. Algunos como TGF $\beta$  (Penn, Grobbelaar et al. 2012), PAI-1 (Kortlever and Bernards 2006), FGF2 (Akita, Akino et al. 2013), FGF7 (Peng, Chen et al. 2011), VEGF (Bao, Kodra et al. 2009) o IL6 (Lin, Kondo et al. 2003) han sido relacionados con la cicatrización cutánea. Sin embargo, la implicación directa de las células senescentes en la producción de factores de este tipo en las heridas, así como su causalidad sobre la mejora del proceso regenerativo son, por el momento, hechos por desvelar. No obstante, en consonancia con la dualidad beneficiosa-perjudicial de la senescencia celular en el organismo, la presencia nociva de

células senescentes en heridas cronicadas ha sido repetidamente documentada (Velarde and Demaria 2016, Wang and Dreesen 2018).

Otro paradigma del papel bienhechor de la senescencia en la regeneración tisular es la fibrosis hepática (Krizhanovsky, Yon et al. 2008). En este caso, la senescencia es inducida en las células esteladas para controlar su proliferación a consecuencia de un daño hepático, controlando así la producción de matriz extracelular requerida para la reparación del tejido pero perjudicial cuando se genera en exceso. En ratones poseedores de defectos genéticos en efectores clave de la senescencia, las células esteladas continúan proliferando tras la fase inicial de daño hepático y terminan favoreciendo la aparición de fibrosis. Sin embargo, y de manera similar a los efectos pleiotrópicos de la senescencia en cuanto al cáncer, la senescencia es, a la larga, un elemento promotor de la fibrosis hepática severa y conduce a la aparición de cirrosis (Hardy, Oakley et al. 2016).

Otro ejemplo de este tipo se da en la fibrosis renal. Pese al claramente establecido papel nocivo (Naesens 2011) e incluso causal (Baar, Brandt et al. 2017) de las células senescentes en esta patología, se ha observado cómo, en ratones mutantes para CDKN2A, el daño renal a consecuencia de una obstrucción de los uréteres se agrava en comparación con ratones normales (Wolstein, Lee et al. 2010).



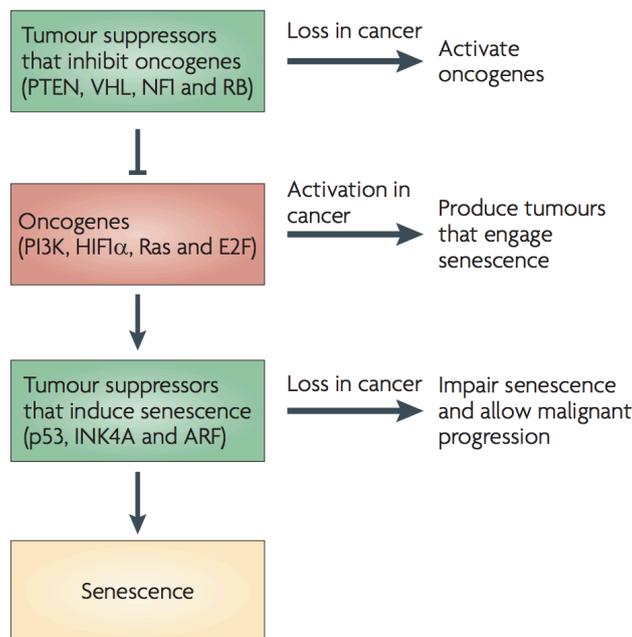
**Figura 18. Representación esquemática de los distintos roles de la senescencia in vivo.** Cuando la senescencia se da de forma eficiente resulta beneficiosa en determinados contextos como la supresión tumoral, la reparación de tejidos o la coordinación del desarrollo embrionario. Sin embargo, al cronificarse en organismos envejecidos, puede favorecer el envejecimiento e, incluso, promover la carcinogénesis.

Cabe mencionar también la recientemente descrita habilidad de las células senescentes para intervenir, por medio del SASP, en procesos novedosos como la desdiferenciación celular (Mosteiro, Pantoja et al. 2016), fenómeno de plasticidad que posee gran relevancia en la reparación un amplio número de tejidos (Tata, Mou et al. 2013). No obstante, la exposición incontrolada y persistente a factores del SASP ofrece el efecto opuesto, dificultando este tipo de eventos de soporte a la regeneración tisular (Ritschka, Storer et al. 2017).

Por tanto, como sucede en relación con el cáncer, la senescencia es capaz de influir tanto de manera positiva como negativa en la reparación de tejidos en función del estado general del organismo, favoreciendo la regeneración tisular en un contexto de homeostasis o promoviendo la aparición de patologías diversas en un entorno sistémico descompensado.

## Supresión tumoral

Otro de los efectos beneficiosos de la senescencia celular en un contexto de homeostasis de los distintos sistemas es la contraposición a la transformación tumoral (Collado and Serrano 2010). Todos los estímulos inductores clásicos de senescencia están relacionados con la iniciación o progresión tumoral y la evasión de la respuesta de supresión carcinogénica llevada a cabo por ésta es de hecho uno de los hallmarks establecidos acerca del cáncer (Hanahan and Weinberg 2011). Diversos estudios muestran cómo la senescencia celular está presente en lesiones premalignas como adenomas de pulmón, neoplasias intraductales de páncreas o nevus melanocíticos (Collado, Gil et al. 2005) y su presencia se pierde o disminuye en sus correspondientes estadios avanzados malignos (Collado, Blasco et al. 2007). Además, la asociación entre la supresión tumoral y la senescencia celular ha sido validada en diversos modelos murinos de cáncer como los ratones BRAF V600E, inductores de tumores pulmonares y melanomas (Dankort, Filenova et al. 2007), y los HRAS G12V, inductores de tumores mamarios (Sarkisian, Keister et al. 2007). En prácticamente todos los modelos de carcinogénesis, la delección genética de CDKN2A o p53 impide la inducción de senescencia y habilita la progresión de las lesiones premalignas a sus estadios avanzados (He and Sharpless 2017), constatando la causalidad presente en la evasión de la senescencia para la formación de carcinomas.



**Figura 19. La senescencia como barrera frente a la progresión tumoral.** Las células, al activar ciertas vías de señalización oncogénicas, promueven el establecimiento de senescencia para evitar la progresión del tumor a etapas más avanzadas del cáncer. Obtenido de (Collado and Serrano 2010).

Sin embargo, no todos los casos premalignos de senescencia dependen de la correcta función de p16INK4a, ARF o p53. Por ejemplo, lesiones pre-linfomagénicas producidas por la activación aberrante de Beta-catenina muestran una respuesta senescente estable incluso en ausencia de p53 (Xu, Yu et al. 2008). De manera similar, aunque la deficiencia en p16INK4a favorece la producción de melanomas causados por BRAF V600E, ello no sucede de forma completa puesto que algunos nevus senescentes continúan produciéndose (Dhomen, Reis-Filho et al. 2009). Todo ello indica que existen mecanismos redundantes para oponerse a la transformación tumoral más allá de los clásicos que han sido interrogados en este tipo de estudios, apuntalando la trascendencia de la senescencia celular en la resistencia al cáncer.

En este mismo sentido, otro hecho que cabe recalcar es la existencia de terapias anticancerígenas a través de la inducción forzada de senescencia celular en lesiones tumorales. Moléculas como el Palbociclib (Dosil, Mirantes et al. 2017), que ejerce un papel farmacológico que mimetiza a los inhibidores de ciclo celular clásicos de

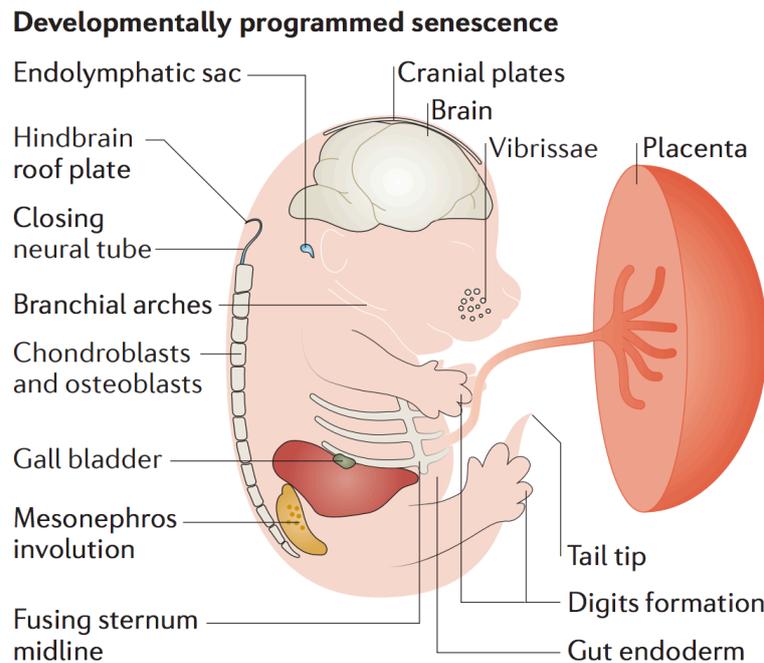
senescencia, o el inhibidor de MDM2 denominado Nutlin-3a (Borthakur, Duvvuri et al. 2015), han sido recientemente caracterizados como efectivos frente a la progresión de distintos tipos de tumores, siendo por ello aprobados por la FDA para ser objeto de ensayos clínicos (Dickson 2014). El uso de un inhibidor desarrollado recientemente contra la función de SHP2, una fosfatasa de tirosinas relacionada con la modulación de las vías de receptores tirosina quinasa, ha sido probado como efectivo contra la progresión de un tipo de tumores mamarios (Lan, Holland et al. 2015). Dicho inhibidor actúa induciendo senescencia en éste y otros tipos de carcinomas (Chen, LaMarche et al. 2016) aunque los mecanismos precisos que emplea para este cometido requieren de una descripción más detallada.

Por tanto, los mecanismos de senescencia asociada a la supresión tumoral in vivo son tan complejos y dependientes de tipo celular como redundantes. No obstante, la progresiva pérdida de función de los distintos supresores tumorales asociados a la inducción de senescencia desencadena la carcinogénesis y la evasión de los mecanismos de control frente a la aparición del cáncer (Rodier and Campisi 2011).

## Desarrollo embrionario

Pese a que la senescencia, como respuesta a distintos estresores, parecía estar restringida a contextos de daño celular, el hallazgo de ésta como parte activa en procesos de desarrollo embrionario ha sido clave para expandir el punto de vista desde el que era observada (Munoz-Espin and Serrano 2014). Este llamativo hecho fue observado por primera vez tras el análisis de la tinción de SAbetaGal en embriones de ratón a diferentes edades (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013). Se observaron zonas positivas para dicha tinción que comprendían estructuras transitorias de desarrollo como los túbulos mesonéfricos, el saco endolinfático, la cresta ectodérmica apical de las extremidades, las membranas interdigitales o el tubo neural. En estos casos, la presencia de senescencia fue corroborada con la detección de más marcadores como la ausencia de proliferación, y la expresión de inhibidores de ciclo celular (Storer, Mas et al. 2013). Cabe señalar que entre estos marcadores de senescencia no se pudo hallar ninguno relacionado con daño al DNA, indicando la posible comparecencia de este proceso de manera ajena a esta señalización DDR, necesaria para la secreción del SASP

inflamatorio. De hecho, al ser estudiados detalladamente los factores SASP implicados en este tipo de senescencia embrionaria, tanto TGFbeta como algunos FGFs fueron desvelados como cruciales para la coordinación del desarrollo por parte de las células senescentes, quedando apartados de este proceso factores como IL6 o IL8, hecho que concuerda con dicha ausencia de DDR (Davalos, Coppe et al. 2010).



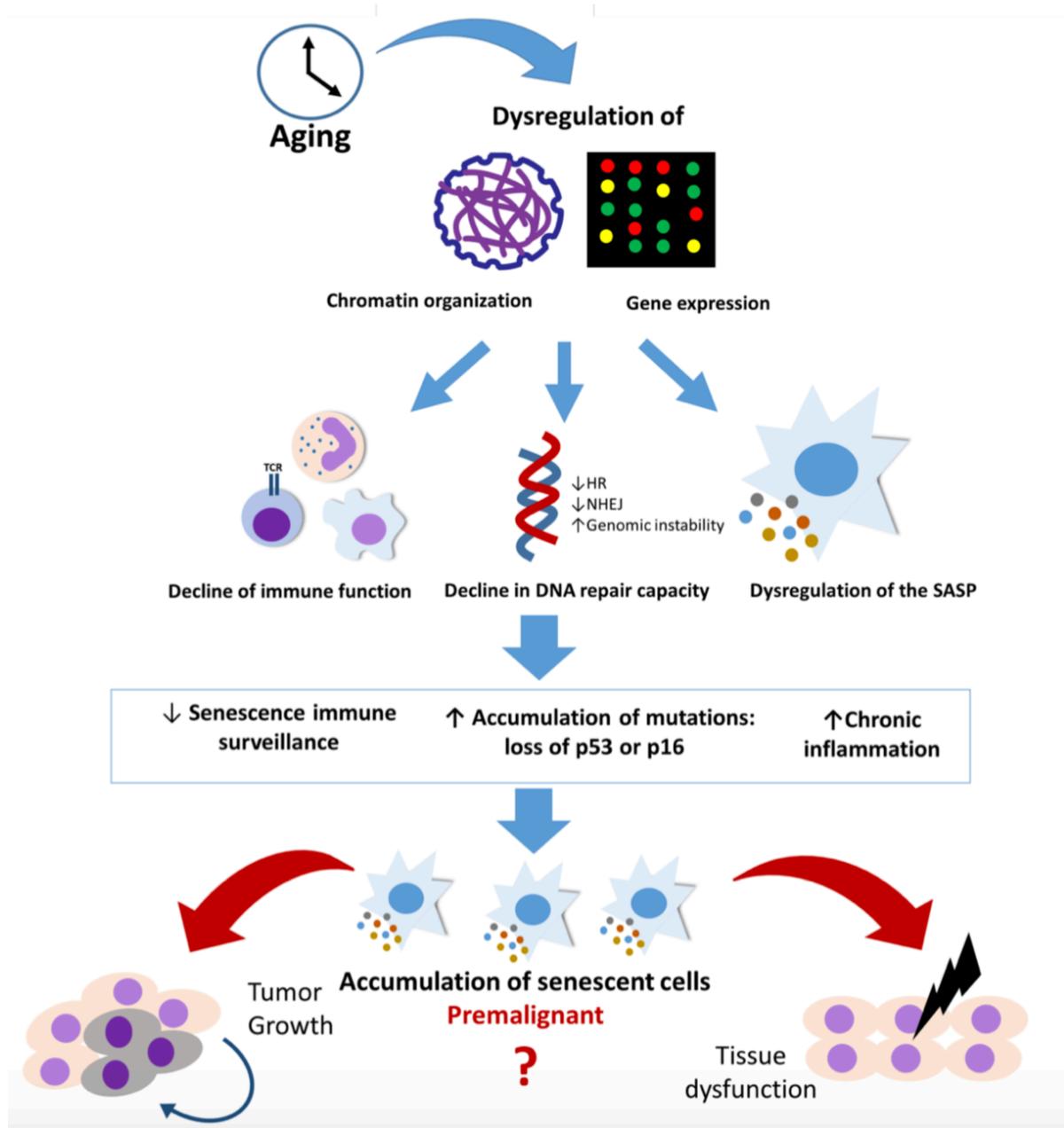
**Figura 20. La senescencia celular programada en el desarrollo embrionario.** En determinados procesos embrionarios de las estructuras señaladas en la figura se ha hallado presencia de células senescentes cuyo papel es, debido a la producción de factores paracrinos, el de coordinar la generación correcta de algunas partes del embrión. Obtenido de (Munoz-Espin and Serrano 2014).

En cuanto a las vías responsables de este tipo de senescencia, el inhibidor de ciclo p21 muestra un papel central pese a que se intuye cierto nivel de redundancia en su función con los otros inhibidores de ciclo, de manera similar a lo que sucede en la regeneración de heridas cutáneas (Demaria, Ohtani et al. 2014). Las vías WNT, Hedgehog y, destacadamente, TGFbeta, PI3K-FOXO y ERK modulan la inducción de p21 y, en menor medida, de p15 en este contexto de senescencia puesto que, tras la adición de inhibidores farmacológicos de éstas, dicho proceso embrionario muestra defectos presentes en el ratón mutante de p21.

En este caso, las células senescentes tienen una relevancia temporal y terminan siendo eliminadas de las estructuras embrionarias mediante la acción del sistema inmune, pese a la ausencia de detección de SASP inflamatorio en este contexto de senescencia. Sin embargo, cuando existen defectos en la inducción de senescencia en este tipo de estructuras, el organismo es capaz de compensar este tipo de carencias mediante la inducción de apoptosis, proceso ampliamente establecido como esencial para el desarrollo (Fuchs and Steller 2011). Además, la conexión entre senescencia y apoptosis es un campo de la ciencia emergente (Childs, Baker et al. 2014) y determinar la relación entre estos procesos en desarrollo resulta fundamental para una comprensión más completa del fenómeno más allá de la actual visión compensatoria que existe a este respecto.

## Soporte a la iniciación y progresión tumoral

El cáncer es, en la mayor parte de casos, una enfermedad asociada al envejecimiento (Balducci and Ershler 2005). La edad es el mayor factor de riesgo para la aparición del cáncer, aumentando de forma exponencial a partir de los 50 años en humanos. Evolutivamente, organismos como el humano han ido adaptándose favoreciendo procesos celulares que son beneficiosos en edades tempranas haciendo caso omiso del papel de éstos en un contexto de envejecimiento, dado que la presión selectiva, a lo largo de su historia biológica, no se ha llevado a cabo en edades tardías (Rodriguez, Marigorta et al. 2017). Un ejemplo de este tipo de procesos es la senescencia celular y su rol en cuanto al cáncer.



**Figura 21. La senescencia, cronificada, es capaz de favorecer la progresión tumoral.** En la imagen se muestran varios de los procesos que favorecen la disfunción de la respuesta senescente y que, por ello, pueden causar la aparición y la potenciación de tumores. Obtenido de (Loaiza and Demaria 2016).

Conforme el tiempo hace acopio de daños en los organismos, las células senescentes se acumulan y ejercen de elemento impulsor del envejecimiento (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013). Ello conlleva la secreción persistente de miembros del elenco de factores del SASP que son capaces de favorecer la aparición de neoplasias o de impulsar el carácter maligno de las que hayan podido surgir (Rodier and Campisi 2011, Loaiza and Demaria

2016). Concretamente, GROalpha (Yang, Rosen et al. 2006), IL6 e IL8 (Coppe, Patil et al. 2008), VEGF (Coppe, Kauser et al. 2006) o MMPs (Coppe, Desprez et al. 2010), producidos por las células senescentes, son capaces de potenciar rasgos de las células cancerosas como la señalización proliferativa sostenida, el establecimiento de inflamación pro-tumoral, la angiogénesis o la activación de procesos de invasión y metástasis, respectivamente (Hanahan and Weinberg 2011). De hecho, la co-inyección de células epiteliales y fibroblastos senescentes en ratones es capaz de producir tumores malignos, en contraste a lo que sucede cuando los fibroblastos inyectados son normales (Krtolica, Parrinello et al. 2001). Además, los fibroblastos senescentes son también capaces de acelerar la formación de tumores cuando son co-inyectados con células cancerosas (Bartholomew, Volonte et al. 2009). Sin embargo, los efectos pro-tumorales citados no dejan de ser aproximaciones experimentales simplistas en comparación a un contexto sistémico completo, puesto que se trata de xenotransplantes inyectados en ratones inmunodeficientes. Colectivamente, se necesita de relaciones de causalidad directa que establezcan de manera firme el papel promotor de tumores de la senescencia celular.

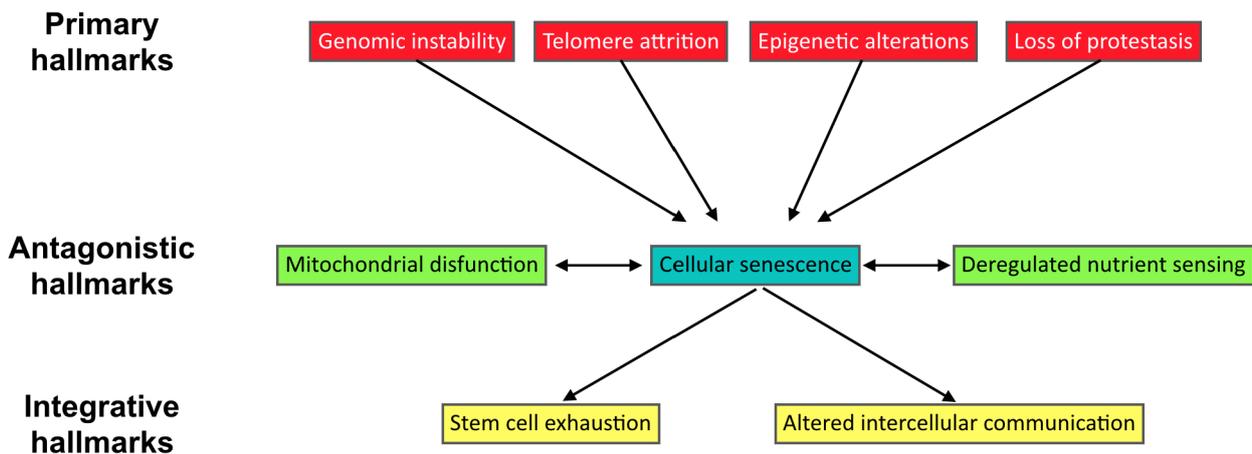
En este sentido, estudios muy recientes comienzan a evidenciar el este rol nocivo de la senescencia en el cáncer al observar un retardo en la aparición de tumores al eliminar las células senescentes en ratones envejecidos (Baker, Childs et al. 2016) y una disminución en la aparición de metástasis y recidivas tumorales tras la eliminación de células que a causa del tratamiento con algunos quimioterapéuticos clásicos han inducido senescencia como efecto secundario (Demaria, O'Leary et al. 2017). También, más allá de un efecto extrínseco causado por el SASP, y ahondando en la relación de la senescencia celular y el reprogramming (Mosteiro, Pantoja et al. 2016) o la desdiferenciación (Ritschka, Storer et al. 2017), ambos fenómenos relacionados con la adquisición de características de células madre, un trabajo reciente describe cómo la inducción de senescencia por tratamiento quimioterapéutico en las propias células tumorales promueve la aparición de programas transcripcionales de pluripotencia (Milanovic, Fan et al. 2018). La evasión posterior de los mecanismos que afianzan la senescencia celular en estas células, como la acción de p53 o la deposición de marcas epigenéticas represoras H3K9me3, incrementa la agresividad en comparación con los tumores que no han sido previamente partícipes del establecimiento de una respuesta senescente. Ello indica que la terapia inductora de senescencia en determinados tumores puede favorecer la reaparición de los mismos con un fenotipo de mayor desdiferenciación, al causar la implementación de

perfiles transcripcionales de pluripotencia que se hallan latentes hasta que se produce la evasión de los mecanismos de parada de ciclo celular (Milanovic, Yu et al. 2018).

## Envejecimiento

El envejecimiento se define como la pérdida progresiva de función de los diversos tejidos que componen el organismo a lo largo del tiempo (Flatt 2012). La investigación reciente sitúa a la senescencia como a una de las características clave del envejecimiento (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013), proponiéndola como una de las respuestas celulares conductoras de gran parte de los fenómenos que causan un declive en la función homeostática de los diversos órganos y sistemas. Como cabría esperar, la pérdida de la capacidad mitótica de las células senescentes ocasiona un progresivo agotamiento en cuanto al recambio celular necesario para la regeneración de los tejidos dañados. No obstante, la secreción de los componentes del SASP por las células senescentes modula su entorno tisular próximo, siendo éste un aspecto clave para la potenciación de los efectos nocivos de la acumulación de células senescentes en los diversos tejidos en que se ha descrito su presencia (Childs, Durik et al. 2015). Con el paso del tiempo y la acumulación progresiva de daño, el organismo franquea un cierto umbral a partir del cual la senescencia celular se convierte en un propulsor de la repentina aceleración con la que el envejecimiento se manifiesta (Rodriguez, Marigorta et al. 2017).

Las características del envejecimiento propuestas por el ya célebre artículo “Hallmarks of Aging” de López-Otín y sus colegas se estratifican en tres categorías: primarias, es decir, aquellas causas directas a nivel molecular de la aparición del daño celular que conduce al envejecimiento; antagonistas, aquellas respuestas que surgen a consecuencia de los daños primarios; e integrativas, que más concretamente resultan en la culminación a nivel fenotípico de los déficits tisulares que se manifiestan en el envejecimiento. Dentro de dichos grupos, la senescencia juega un papel central puesto que se encuentra en el estrato de las respuestas antagonistas. Además, la senescencia aparece como elemento de respuesta a todas las causas primarias descritas y está relacionada de manera íntima con los demás candidatos del grupo de “hallmarks” antagonistas.



**Figura 22. Imagen representativa de la relación de los distintos hallmarks del envejecimiento con la senescencia celular.** Basándose en la descripción realizada en la revisión que describe las características del envejecimiento, la senescencia celular ocupa un lugar central como respuesta que, cuando se halla descompensada, puede conducir el progresivo deterioro del organismo.

Concretamente, las células senescentes, como ha sido desglosado en el apartado de SASP, son capaces de influir sobre la señalización a nivel metabólico de las células del entorno a nivel de las vías de IGF o PI3K. Incluso a nivel de la producción de hormona del crecimiento por parte de la glándula pituitaria, la senescencia de esta última ejerce un incremento en su actividad secretora que desencadena profundos cambios a nivel de la señalización de IGF en tejidos como el adiposo (Chesnokova, Zhou et al. 2013). En este sentido, la presencia de SASP inflamatorio es capaz de entorpecer de manera indirecta la señalización de IGF (O'Connor, McCusker et al. 2008) a través de la interferencia llevada a cabo, entre otras citoquinas, por IL6 (Al-Shanti and Stewart 2012), reconocido marcador de envejecimiento sistémico (Maggio, Guralnik et al. 2006). De manera llamativa, la acumulación de células expresoras de p16INK4a en grasa y en páncreas se dispara en organismos envejecidos (Krishnamurthy, Ramsey et al. 2006). Otro hecho nada desdeñable, pese a la ausencia de datos que certifiquen la relación directa de ambos fenómenos, es la implicación de fármacos relacionados con vías metabólicas cruciales, como la rapamicina y la metformina, tanto en la ablación a nivel molecular del fenotipo secretor de las células senescentes (Soto-Gamez and Demaria 2017) como en el

incremento de la longevidad en diversos organismos (Blagosklonny 2017). Para finalizar la inmersión en el ámbito metabólico, con la posterior demostración de que la eliminación de células senescentes en edades avanzadas favorece la función del tejido adiposo en ratones (Baker, Childs et al. 2016) y diversos estudios previos que apuntan en la misma dirección (Baker, Perez-Terzic et al. 2008, Minamino, Orimo et al. 2009, Tchkonja, Morbeck et al. 2010), se adivina la relevancia de la relación íntima de la senescencia celular con el correcto funcionamiento del metabolismo, hecho necesario para la homeostasis de los organismos no envejecidos.

En cuanto a otros “hallmarks”, las células senescentes son capaces de influir sobre el agotamiento de las células madre mediante su propia extenuación replicativa (Wagner, Horn et al. 2008) o a través del SASP a nivel paracrino (Ritschka, Storer et al. 2017). Por ejemplo, el incremento de uno de los factores del SASP, FGF2, es capaz de agotar la capacidad regenerativa del tejido muscular (Chakkalakal, Jones et al. 2012). Por otro lado, PAI1, otro de los componentes reconocidos del SASP, es capaz de promover la degeneración tisular que acompaña al envejecimiento al inhibir la proteólisis de la matriz extracelular (Eren, Boe et al. 2014). Respecto a la función del sistema inmune en envejecimiento, la senescencia celular puede conducir a la cronificación de la acción del mismo a partir de la secreción permanente de mediadores inflamatorios presentes en el SASP (Maggio, Guralnik et al. 2006). Este hecho favorece la disfunción del propio sistema inmune así como la acumulación progresiva de daños sistémicos en un círculo vicioso en que las células de la defensa son cada vez menos capaces de hacerse cargo de ellos (Salminen, Kaarniranta et al. 2012).

Parece que el papel de la senescencia respecto al envejecimiento se deriva de una pérdida de coordinación sistémica tanto en su inducción como en su eliminación de los tejidos, siendo una cuestión que va más allá de su mera presencia o ausencia en el organismo (Childs, Gluscevic et al. 2017). Sistemas biológicos como las Naked Mole Rats (Zhao, Tyshkovskiy et al. 2018) o el ratón super p53 (Garcia-Cao, Garcia-Cao et al. 2002), pese a su potenciación en la activación de ciertos recursos celulares relacionados con la inducción de senescencia, no muestran, ni levemente siquiera, indicios de envejecimiento acelerado, sino más bien resistencia a enfermedades asociadas edades tardías como el cáncer. Además, la eliminación eficiente de las células senescentes por parte del sistema inmune es uno de los fenómenos que parecen perderse con el tiempo (Lujambio 2016), hecho que concuerda con la pérdida de eficacia en la actuación del

sistema inmune que muestran los organismos envejecidos (Montecino-Rodriguez, Berent-Maoz et al. 2013).

Cabe señalar que existe un paradigma perjudicial similar al de la senescencia presente en el envejecimiento: la senescencia inducida por quimioterapia (Childs, Durik et al. 2015). Salvando el gran número de discordancias entre ambos fenómenos, la quimioterapia general induce, además de daño genómico causante de senescencia en los tejidos sanos (Demaria, O'Leary et al. 2017), una disminución de la función del sistema inmune (Bracci, Schiavoni et al. 2014), siendo ambos aspectos sistémicos que se presentan en envejecimiento.

La presencia de senescencia celular en diversas patologías relacionadas con la edad está viéndose incrementada a medida que la investigación avanza en este campo. De hecho, ha sido hallada siendo partícipe de enfermedades como el glaucoma (Liton, Challa et al. 2005), la diabetes de tipo 2 (Krishnamurthy, Ramsey et al. 2006, Tavana, Puebla-Osorio et al. 2010), la fibrosis pulmonar (Schafer, White et al. 2017), el enfisema de este mismo tejido (Mikawa, Suzuki et al. 2018), la aterosclerosis (Childs, Baker et al. 2016), el Alzheimer (Bussian, Aziz et al. 2018) o la fibrosis/cirrosis hepática (Kim, Chen et al. 2013). Por ello, la descripción precisa de los complejos mecanismos que gobiernan la senescencia celular puede permitirnos establecer dianas terapéuticas nuevas contra un gran número de patologías de las que no se sospechaban intervenciones a través de la eliminación de células senescentes. De hecho, dichas intervenciones han sido ya probadas como eficaces in vivo mediante el uso de herramientas transgénicas (Baker, Childs et al. 2016), o fármacos denominados senolíticos, cuya principal diana de eliminación son las células senescentes presentes en los tejidos envejecidos. De entre los muchos descritos a día de hoy, existen algunos entre los que se encuentran un péptido sintético que impide la interacción de FOXO4 y p53 (Baar, Brandt et al. 2017), la combinación de Dasatinib y Quercetin (Xu, Pirtskhalava et al. 2018) que interfiere con la actividad de receptores tirosina quinasa y la vía PI3K-AKT (Zhu, Tchkonja et al. 2015), respectivamente, o inhibidores de proteínas antiapoptóticas necesarias para la supervivencia de células senescentes como el ABT-263 (Chang, Wang et al. 2016) o el ABT-767 (Yosef, Pilpel et al. 2016). Sin embargo, se requiere de una mayor profundización en el conocimiento de los requisitos moleculares necesarios para hacer de las células senescentes dianas de este tipo de tratamientos, además de una

caracterización más exhaustiva de los efectos o daños colaterales producidos por estas intervenciones farmacológicas.

Por otro lado, el incremento de la longevidad a causa de la atenuación de ciertas vías de señalización implicadas en senescencia, como en el caso de PI3K-AKT-mTOR, bien sea a nivel genético por la interrupción mutacional de ciertos elementos de la vía (Fontana, Partridge et al. 2010), ambiental mediante restricción calórica (Mercken, Crosby et al. 2013) o farmacológico a través de la administración de distintos inhibidores moleculares (Johnson, Rabinovitch et al. 2013), sugiere que cabe la posibilidad de extender la esperanza de vida por medio del entorpecimiento de otras vías también relacionadas con la senescencia celular. No obstante, todavía se ha de escudriñar de manera precisa y con mayor detalle la intervención de la senescencia en tal enlentecimiento de la aparición de la vejez tisular en aproximaciones como, por ejemplo, la restricción calórica (Fontana, Nehme et al. 2018), como por primera vez ha sido ya advertido en colon (Fontana, Mitchell et al. 2018). Concretamente, dicha necesidad científica se deriva de que las vías de señalización mentadas, tanto las ya demostradas (Blagosklonny 2017) como las posibles candidatas (Ito, Hirao et al. 2006), resultan también cruciales para un amplio abanico de procesos celulares ajenos a la senescencia celular (Soto-Gamez and Demaria 2017). Si bien, este tipo de intromisiones leves en el funcionamiento de ciertas vías pueden significar efectos beneficiosos en cuanto al declive sistémico a largo plazo, mientras que no tienen por qué comprometer funciones necesarias para los procesos habituales del organismo, como ya ha sido demostrado para PI3K (Ortega-Molina, Lopez-Guadamillas et al. 2015), NFkB (Tilstra, Robinson et al. 2012), p38 (Ito, Hirao et al. 2006) o AMPK (Martin-Montalvo, Mercken et al. 2013), pese a que en este último caso se trata de una activación de la vía y no de una atenuación. Sin embargo, la influencia directa de este tipo de tratamientos sobre la acumulación de células senescentes en los tejidos envejecidos está todavía lejos de encontrarse suficientemente explorada.



# Objetivos



Objetivo 1. Analizar el papel de la tirosina 53 de Spry1 en en otros contextos de senescencia más allá de los previamente descritos.

1.1 Análisis del papel de Spry1 en la senescencia asociada al envejecimiento.

1.2 Análisis del papel de Spry1 en la senescencia asociada a la regeneración de heridas.

Objetivo 2. Caracterización del rol de Spry1 en la senescencia en distintos modelos celulares como los fibroblastos dérmicos de ratón o las células IMR90.

2.1 Valoración de la inducción de la senescencia en fibroblastos provenientes de ratones con la mutación Y53A.

2.2 Caracterización de las vías de senescencia celular ejecutadas por Sprouty en células IMR90.

2.3 Determinación de la influencia mecánica de Spry1 sobre la senescencia celular mediante análisis transcriptómico.



# Materiales y Métodos



# ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

## Consideraciones previas

Los métodos experimentales utilizados con los animales de laboratorio que se detallan a continuación se han regido siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

- Ley 5/1995, de 21 de junio, de la Generalidad de Cataluña, de protección de los animales utilizados para experimentación y para otras finalidades científicas.

- Decreto 214/1997, de 30 de julio, que desarrolla la citada ley.

- Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

- Directiva ECC 63/2010, del 22 de septiembre, del Parlamento Europeo, sobre la protección de animales utilizados con fines científicos.

Todos los procedimientos en los que se utilizaron ratones, se realizaron bajo la supervisión del personal pertinente de nuestra institución, respetando todas las disposiciones legales y éticas vigentes para la manipulación de animales de experimentación. Además, el presente trabajo ha sido aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Lleida.

Los ratones fueron alojados en instalaciones barrera, siguiendo procedimientos libres de patógenos en las salas de trabajo. Los animales se mantuvieron con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, a una temperatura de 22°C y acceso ad libitum a agua y comida.

## Ratones knockout para Spry1

Los ratones knockout para Sprouty1 (Basson, Akbulut et al. 2005) utilizados en este trabajo fueron cedidos amablemente por el Dr. M. Albert Basson (Kings College, Londres). La generación de estos ratones se llevó a cabo mediante la tecnología Cre/lox, presentando deletada toda la secuencia codificante del alelo de Spry1. Los experimentos se llevaron a cabo con ratones que presentaban un fondo genético 129/

SVJ, C57BL/6 o bien mixto (129/SVJ; C57BL/6). El fondo genético se eligió en función del fondo genético del otro modelo murino con que los estuviéramos comparando.

## Ratones Flpe

Estos ratones expresan recombinasa Flpe desde el locus Rosa26. Fueron generados en el laboratorio de la Dra. Susan M. Dymecki y adquiridos de Jackson Laboratories (Gt(ROSA)26Sortm1(FLP1)Dym).

## Generación de los ratones knockin Spry1 Y53A

Los ratones knockin por la Tirosina 53 de Spry1 se generaron en nuestro laboratorio con la colaboración del Servicio de Transgénicos de la Universidad de Lleida y del Dr. Joaquim Egea. En un primer momento obtuvimos la línea Spry1 Y53ANeo, derivada del proceso de selección de clones con recombinación homóloga del alelo knockin y consistente en la presencia cromosómica de la mutación Y53A acompañada de una cassette de resistencia a Neomicina. Para eliminar dicha cassette se cruzaron los ratones Spry1 Y53ANeo/+ con ratones de la cepa Flpe y las crías que habían sufrido la escisión de dicha cassette se cruzaron con ratones C57BL/6 para segregar el mentado alelo. Por otro lado, los resultados que se obtuvieron con los clones 4AD4 y 6DA1 fueron idénticos, pero la mayoría de experimentos se han realizado con la línea proveniente del clon 4AD4.

## Genotipado de ratones

Los ratones se sexan y se destetan a los 21 días, momento en el que se procede a su genotipado. Se obtiene una biopsia de la cola de los ratones y después se digiere con un tampón de genotipado que contiene 100mm Tris pH 8.5; 200mm NaCl, 5mm EDTA y 0.2% SDS y proteinasa K a 1.5 mg/mL (Sigma Aldrich). La digestión se lleva a cabo a 55°C durante 16horas en agitación y se precipita el DNA con etanol frío. Finalmente el

DNA se resuspende en H2O MilliQ y se procede a realizar las reacciones de PCR para cada gen.

La delección del alelo de Sprouty1 es confirmada mediante el programa de genotipado por PCR que consta de 33 ciclos de 30" a 94°C, 30" a 57°C y 45" a 72°C, con un ciclo final de 7 min a 72°C. Los primers utilizados son:

P1 (primer WT): 5'-CTCAATAGGAGTGGACTGTGAAACTGC-3'

P2 (primer común): 5'-GGGAAAACCGTGTTCTAAGGAGTAGC-3'

P3 (primer KO): 5'-GTTCTTTGTGGCAGACACTCTTCATTC-3'

El genotipado del alelo Flpe es confirmado mediante el programa de PCR siguiente: 42 ciclos de 1' a 94°C, 2' a 58.8°C y 1' a 72°C, con un ciclo final de 10 min a 72°C. Los primers utilizados son:

P1 (primer Fwd): 5'-CACTGATATTGTAAGTAGTTTGC-3'

P2 (primer Rev): 5'-CTAGTGCGAAGTAGTGATCAGG-3'

El genotipado del alelo Spry1 Y53ANeo y Spry1 Y53A es confirmado mediante el programa de PCR siguiente: 40 ciclos de 30" a 94°C, 30" a 60°C y 45" a 72°C, con un ciclo final de 7 min a 72°C. Los primers utilizados son:

P1 (primer Y53ANeo): 5'-CTACCGGTGGATGTGGAATGTGT-3'

P2 (primer común): 5'-TATCAGCCAAGGGTTTCACTACGAG-3'

P3 (primer WT/Y53A no Neo): 5'-TCTAAGAGCACCTCAGAAAGCCAGA-3'

## Producción de heridas cutáneas

Para valorar la capacidad de cicatrización cutánea, dos heridas fueron producidas por animal con un punch de biopsia de 6mm. Para ello, la espalda de cada ratón fue depilada y desinfectada con etanol 70% previamente. Durante todo el procedimiento, los ratones se encontraban anestesiados con 3% de isoflurano. Además, como medida analgésica,

los ratones fueron inyectados el día de la producción de la herida y el siguiente con 0.05mg/kg con buprenorfina por vía subcutánea. Para la medición de las heridas, las imágenes fueron escaladas con la ayuda del software ImageJ, permitiendo calcular el porcentaje de herida abierta respecto al tamaño medido el día de la producción de la misma.

## Inducción de senescencia con doxorrubicina

Las diferentes inducciones de senescencia producida por quimioterapia se realizaron como ya había sido previamente descrito (Demaria, O'Leary et al. 2017), mediante la inyección intraperitoneal de una dosis de 10mg/kg de doxorrubicina, seguida de los distintos tratamientos, administrados también por vía intraperitoneal, que han acompañado a dicha inducción (tratamiento con vehículo, tratamiento con SB203580 5mg/kg).

## Ensayo luciferasa ratón p16-3MR

Los ratones, una vez inyectados intraperitonealmente con 15ug de Xenolight RediJect Coelentarazine h (Perkin Elmer), fueron anestesiados con 150ul de ketamina/xilacina, cuyo efecto dura unos 40-45 minutos. 25 minutos más tarde, los ratones fueron introducidos, con el fin de detectar la bioluminiscencia emitida por los animales, en un PhotonImager (Biospace Lab), realizando exposiciones de 10 minutos.

## Extracción de suero

Las extracciones de sangre de los ratones envejecidos se realizaron con el ratón anestesiado mediante punción en la vena facial. La sangre obtenida se centrifugaron durante 10 minutos a 12000rpm. El suero resultante se transfirió a un nuevo tubo y se mantuvo congelado a -80°C.

## CULTIVOS CELULARES

### Cultivo de la línea celular HEK 293T

Las células HEK 293T son una línea celular humana de riñón embrionario, es un buen modelo para la sobreexpresión de proteínas intracelulares, extracelulares, secretadas o de membrana. Es una variante de la línea celular humana del epitelio renal 293, transformada con el gen E1A de adenovirus, que expresa el antígeno T de SV40. El mantenimiento de esta línea celular se realiza tripsinizando las células y luego se centrifugan a 1000rpm durante 3 minutos y se dividen las células 1:10 o 1:15, ya que el tiempo de duplicación es muy rápido. Las células se mantienen en DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO Invitrogen) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino inactivado, 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA, GIBCO), 1% de Piruvato de sodio (GIBCO) y 100µg/ml de Penicilina/Streptomycin (GIBCO) a 37°C en un atmósfera controlada del 5% de CO<sub>2</sub>.

### Cultivo de las células IMR90

La línea IMR90 es una línea celular de fibroblastos diploide humana derivada de tejido pulmonar de un feto de 16 semanas de una hembra caucásica. Se trata de un tipo celular genéticamente estable y, por ello, tiene una esperanza de vida limitada a causa de su entrada en senescencia celular tras un cierto número de rondas de división. Estas células se mantienen en MEM (Modified Eagle Medium, GIBCO Invitrogen) + 2mM de Glutamina + 1% Aminoácidos no esenciales + 1% Piruvato de sodio + 10% de Suero Fetal Bovino + 0.5% Penicilina/Estreptomycin. Las células se dividen 1:2 casi llegadas a la confluencia y se incuban en una atmósfera controlada del 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### Cultivo primario de fibroblastos dérmicos de ratón

Los ratones de entre 0 y 3 días de edad se sacrifican mediante decapitación tras haber estado en hielo durante unos 5 minutos y se lavan con etanol 70%. A continuación se

corta la cola con unas tijeras para proceder a la extracción del DNA y el posterior genotipado de cada ratón. Con unas agujas se clava el cuerpo del ratón en una placa de silicona para las extremidades con la parte ventral hacia la placa y, con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras, se disecciona la piel de la parte posterior. Seguidamente se coloca la piel bien estirada en una placa de 35 mm vacía, quedando la capa dérmica en la parte de abajo. Se añaden unos 4ml de una solución 0.25% de tripsina (REF:15090-46, GIBCO) en HBSS (REF:14175-053, GIBCO) a la placa y se incuba a 4°C durante toda la noche. Es importante que las pieles floten en la solución de tripsina. El día siguiente se quita la piel de la tripsina y se coloca en una placa de petri vacía, se estira y con la ayuda de unas pinzas se separa la epidermis de la dermis empezando desde uno de los extremos de la piel. La dermis se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación, en una solución 0.5mg/ml de Colagenasa IV en HBSS. Después se homogeneiza y se disgrega a través de un strainer de 70µm con la ayuda de un émbolo de jeringa. Este homogeneizado se recoge en un tubo de 15ml donde se añaden 8ml de medio de cultivo (MEM + 10% FBS + 1% L-glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina). Se centrifuga 5 minutos a 1000 rpm, el pellet de células se resuspende en medio de cultivo, se planta en una p100 y se deja en el incubador a 37°C y con un 5% CO<sub>2</sub> hasta que las células lleguen a un 90% de confluencia y se puedan dividir.

## PRODUCCIÓN DE LENTIVIRUS

### Construcciones plasmídicas: generación de vectores lentivirales de sobreexpresión de proteínas

En el laboratorio hemos generado varias construcciones lentivirales para sobreexpresar los distintos genes utilizados en los experimentos reportados en este estudio. Las mutaciones que hemos utilizado son las siguientes: RasV12, Spry1, Spry2, Spry4, Spry1 Y53A, Spry1 R62/R70A y Spry1 R250D. La técnica utilizada para generar estas mutaciones se conoce como Megaprimer.

Tras generar las diversas mutaciones, con el fin de obtener expresiones homogéneas, decidimos utilizar el mismo vector lentiviral para todas ellas, denominado FUSPA. El vector FUSPA es un vector lentiviral de sobreexpresión que contiene el promotor de la ubiquitina C seguido de un clonaje site único (Ascl), además de un cassette de selección de resistencia a puromicina. Todas las construcciones se generaron de forma que contuvieran un tag HA en su extremo N-terminal. El sistema Megaprimer consiste en dos amplificaciones por PCR separadas con primers mutagénicos que contienen una región de solapamiento donde se encuentra la mutación, seguido de otra PCR adicional que acaba fusionando los dos fragmentos obtenidos.

Los primers utilizados para generar las mutaciones son los siguientes:

Y53A:

Mutagenic Fwd CCATCAGAGGCAGCAATGAAGCCACAGAGGGACCTTCGGTAGC

Mutagenic Rev GCTACCGAAGGTCCCTCTGTGGCTTCATTGCTGCCTCTGATGG.

R62/R70A:

R62A Mutagenic Fwd GTAGCGAGAGCACCTGCTCCT,

R62A Mutagenic Rev AGGAGCAGGTGCTCTCGCTAC

R70A Mutagenic Fwd ACTGC ACCAGCACCCGAAAAG

R70A Mutagenic Rev CTTTTCGGGTCTTGGTGCACT

R250D:

Mutagenic Fwd TGCTGCTCCGATTACCTGTGC

Mutagenic Rev GCACAGGTAATCGGAGCAGCA

Los primers comunes utilizados por todos los mutantes de Spry1 son el

BamHI-Ascl-HA-mSpry1 Fwd:

AACGGATCCGGCGCGCCATGTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGATTCCCCAA  
GTCAGCATGGC

BamHI-Ascl-mSpry1 Rev:

ATCGGATCCGGCGCGCCTCATGACAGCTTGCCCTGAGC

El primer protocolo de PCR es el siguiente: 1 ciclo de 94°C durante 10 minutos, 25 ciclos de 95°C 20 segundos, 59°C 1 minuto y 68°C 2 minutos y, finalmente un ciclo de 72°C durante 10 minutos. El protocolo de la reacción de PCR que une los dos fragmentos mutagénicos es diferente con 1 ciclo de 94°C durante 10 minutos, 36 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C 30 segundos terminando con un ciclo de 72°C de 10 minutos. Una vez realizadas estas PCRs, se corren en un gel de agarosa del 1% y se extrae banda con el kit MinElute gel Extraction Kit (QIAGEN). Los dos fragmentos obtenidos de cada mutante se utilizan como molde y se realiza otra PCR utilizando los primeros comunes, que unirán las dos secuencias en una que contendrá la mutación deseada. Se vuelve a pasar por un gel de agarosa 1%, se extrae banda y se realiza la digestión del fragmento y del vector FUSPA con *Ascl* (10U/ml, Biolabs) en EDTA y buffer de digestión. La defosforilación del vector y las ligaciones se llevaron a cabo con el Rapid DNA Dephosphorylation and Ligation Kit de Roche. Las comprobaciones se realizaron con *EcoRI* (10U/ml, Fermentas) y *BstXI* (10U/ml, Roche).

Para la introducción de los vectores clonados en bacterias *Stbl3* utiliza un método físico de transformación mediante choque térmico. Se incuban entre 1-5µl de los productos de ligación con 50µl de bacterias competentes durante 20 minutos en hielo. Se lleva a cabo un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se deja en hielo durante 2 minutos más. A continuación, se añaden 250µl de medio SOC y se incuba durante una hora a 37°C. El cultivo resultante se planta en placas con antibiótico (LB + Ampicilina) para seleccionar las bacterias que hayan incorporado el vector ya que este contiene la resistencia al antibiótico que le confiere la presencia de dicha construcción plasmídica.

## Transformación bacteriana

Para la introducción de los vectores clonados en bacterias (*Stbl3*, BL21) se utiliza un método físico de transformación mediante choque térmico. 1-5µl de los productos de ligación se incuban durante 20 minutos en hielo con 50µl de bacterias competentes. Se realiza un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se deja en hielo durante 2 minutos más. A continuación, se añaden 250µl de medio SOC y se incuba una hora a 37°C. El cultivo resultante se plaquea en placas con antibiótico (LB + Ampicilina) para

seleccionar las bacterias que hayan incorporado el vector debido a que éste contiene resistencia a antibiótico.

## Transducción lentiviral

Los vectores lentivirales permiten la integración de DNA plasmídico en el genoma de las células que infectan, por tanto presentan la ventaja de conseguir una expresión mantenida a lo largo del tiempo y que ésta se transmita a la descendencia. Con el fin de realizar dicha infección, las células utilizadas fueron plantadas a una confluencia del 60-70% e incubadas hasta el día siguiente con el sobrenadante que contiene las partículas víricas.

## Transfección y producción de lentivirus en la línea celular HEK293T

El método de transfección utilizado para la línea celular 293T es el del fosfato cálcico. Se fundamenta en la formación de precipitados insolubles de sales de calcio que atrapan el DNA y lo depositan en las superficies de las células, lo que las induce a endocitar dichos precipitados, liberando así el material genético en el interior celular. Para realizar esta técnica se usan dos soluciones. La primera contiene el DNA plasmídico, agua y  $\text{CaCl}_2$  250mM mientras que la segunda es un buffer llamado BBS a pH 7 (concentrado a 2X), que se deposita gota a gota sobre la primera solución. El pH del buffer BBS es un factor crítico en el éxito del proceso de transfección.

Se transfecta un total de 30µg de DNA por placa de p100 con 4 millones de células, correspondiente con los tres vectores plasmídicos que se utilizan para la producción viral en proporción 1:1:1. El primero de los vectores es el que contiene la secuencia de DNA a transferir a las células diana, es decir, el material genético que se pretende integrar. El segundo es el vector que contiene todas las proteínas necesarias para el empaquetamiento del virus (psPAX2). Finalmente, el tercer vector contiene todas las secuencias que codifican para la envoltura del virus (PMD2G).

En nuestro caso, el material genético (RasV12, Spry1, Spry2, Spry4 y los distintos mutantes de Spry1) a integrar se halla en vectores lentivirales como FUSPA.

Un día después de la transfección se cambia el medio de las células con medio completo y se dejan incubando durante 2-3 días más con el fin de que las 293T tengan tiempo de producir las partículas víricas y secretarlas al medio de cultivo. A continuación se recogen los sobrenadantes de las placas donde se encuentran las partículas víricas, se filtran con filtros de 0,45µm y se aplican directamente sobre las células que se quieren infectar.

## ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

### Recuento celular mediante el sistema 3T3

Por lo que respecta a los fibroblastos dérmicos, éstos fueron sometidos a un sistema 3T3 (3-day transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells), es decir, primero se plantaron 800.000 células en p100s y cada tres días se replantan a la misma densidad.

### Ensayo de incorporación de Bromodeoxyuridina

La Bromodeoxyuridina (BrdU) es un nucleótido sintético análogo a la timidina que se usa para medir la incorporación de DNA que realiza una célula. Se añade la BrdU en el medio de cultivo a 4µg/ml y pasado el tiempo de incorporación de ésta, que varía en función de la línea celular, en el caso de las IMR90 y de los fibroblastos dérmicos se fijan a las 24 horas con 4% de paraformaldehído (PFA) frío durante 20 minutos, se lava con PBS y se añade HCl 2M durante 30 minutos a 37°C, para que el DNA se desnaturalice y el anticuerpo contra BrdU se pueda unir. Transcurrida la media hora se añade Tetraborato Sódico 0,1M durante 2 minutos para neutralizar el pH. Después se añade la solución de bloqueo (PBS + 5% HS + 5% FBS + 0,2% glicina + 0,1 Tritón) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se añade el anticuerpo anti BrdU (Dako) 1:100 durante toda la noche, se lava y se incuba con el secundario conjugado a un fluorocromo (Dylight, Jackson) y 0,5µg/ml de Hoechst durante 1 hora a temperatura ambiente.

## Cristal violeta

Para realizar dichos ensayos, las células ya senescentes se plantan a un 50% de confluencia y se cultivan durante una semana. Tras este periodo en el que las diferencias de proliferación culminan en la representación gráfica del efecto de las diferentes condiciones sobre la inducción de senescencia, las células se lavan dos veces con PBS y se fijan durante 15 minutos en una solución de 4% de PFA a temperatura ambiente, se lavan de nuevo con PBS dos veces y se incuban con una solución de 0.1% de cristal violeta durante 30 minutos. Tras esto, los pocillos de la placa se lavan con dos veces con agua milliQ para eliminar el exceso de cristal violeta y se deja secar.

## PCR EN TIEMPO REAL: RT-qPCR

### Extracción de RNA

La extracción del RNA se realiza mediante Trizol, utilizando tanto células como tejidos, previamente disgregados con bolas de metal en el propio reactivo. Después de pasar 10 veces por aguja de 20G, se extrae mediante la adición de cloroformo la fase acuosa que contiene el RNA, se precipita con isopropanol y se resuspende en agua RNase-free. Se cuantifica la concentración de los RNAs obtenidos con el NanoDrop® ND-1000 y posteriormente los extractos se almacenan a -80°C.

### Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se retrotranscriben entre 500ng y 1µg de RNA utilizando el protocolo descrito del kit Taqman® (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción de retrotranscripción son: 2min a 90°C (sólo el RNA), 10min a 25°C, 60min a 42°C y 5min a 95°C. Una vez sintetizado el cDNA se puede utilizar directamente para la técnica de RT-qPCR.

## RT-qPCR

La técnica de qPCR en tiempo real utiliza un par de primers específicos para cada gen a analizar, además de mix SYBR green. La amplificación resultante de la PCR contiene la presencia de un fluorocromo (normalmente FAM) que el termociclador ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) lee y cuantifica. El programa de PCR varía en función de la mix utilizada. El gen de la Actina beta, ACTB, tanto humano como de ratón, fue utilizado como control de expresión de las muestras analizadas.

Una vez finalizado el protocolo de PCR, los resultados nos muestran a qué ciclo de PCR comienza el crecimiento exponencial de síntesis de la muestra analizada, es decir la Ct (Cycle Threshold). Por lo tanto, cuanto más pequeña sea la Ct de un gen analizado más cantidad de mRNA se ha amplificado y por tanto más niveles de expresión de este gen hay en la muestra. La cantidad relativa de mRNA de cada gen se calcula de la siguiente manera:  $\text{deltaCt} = \text{Ct del gen diana} - \text{Ct del gen ACTB}$ . Después se calcula la  $\text{delta}(\text{deltaCt}) = \text{deltaCt muestra} - \text{deltaCt control}$ , donde el control serán los niveles relativos iguales a 1. A partir de estos cálculos los niveles relativos de mRNA en comparación al control es  $2^{(\text{delta}(\text{deltaCt}))}$ . Con estos valores se calcula el valor promedio de cada muestra por triplicado y los errores estándar.

Los primers utilizados para la detección de la expresión de cada gen fueron los mostrados en la tabla 1.

Primer ID	Sequence 5' -> 3'	Primer ID	Sequence 5' -> 3'
Spry1 F	CTCTGCGGGCTAAGGAGC	IL6 F	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC
Spry1 R	ACGCCGGCTGATCTTGC	IL6 R	GTCAGGGGTGGTTATTGCAT
Cdkn1a F	TTGCCAGCAGAATAAAAGGTG	ACTB F	GCACAGAGCCTCGCCTT
Cdkn1a R	TTTGCTCCTGTGCGGAAC	ACTB R	GTTGTGACGACGAGCG
Actb F	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	CDKN1A F	AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC
Actb R	ATGGAGGGGAATACAGCCC	CDKN1A R	CATGGGTTCTGACGGACAT
Il6 F	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC	TGFB1 F	CTTCCAGCCGAGGTCCTT
Il6 R	TGATGCACTTGCAAAAACA	TGFB1 R	CCCTGGACACCAACTATTGC
p19Arf F	CGTGAACATGTTGTTGAGGC	p16INK4a F	GTTACGGTCGGAGGCCG
p19Arf R	GCAGAAGAGCTGCTACGTGA	p16INK4a R	GTGAGAGTGCGGGGGTC
p16Ink4a F	CCCAACGCCCCGAAC	CDKN2B F	CAGGGTCTGCGCAGTTG
p16Ink4a R	GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA	CDKN2B R	GAGTCAACCGTTTCGGGA
Tgfb2 F	ATAAAATCGACATGCCGTCC	IL1a F	ACTGCCCAAGATGAAGACCA
Tgfb2 R	TTGTTGAGACATCAAAGCGG	IL1a R	CCGTGAGTTTCCAGAAGAA
Tgfb1 F	AGCTGGTGAAACGGAAGCG	IL8 F	TCCTGATTTCTGCAGCTCTGT
Tgfb1 R	GCGAGCCTTAGTTTGACAGG	IL8 R	AAATTTGGGGTGAAAGGTT
Il1a F	AGCGCTCAAGGAGAAGACC	PAI1 F	ACAACAGGAGGAGAAACCCA
Il1a R	CCAGAAGAAAATGAGGTCCG	PAI1 R	AGCTCCTTGTACAGATGCCG
Cxcl1 F	CCCACTCAAGAATGGTCGC	FGF2 F	GGAGAAGAGCGACCCTCAC
Cxcl1 R	TCTCCGTTACTTGGGGACAC	FGF2 R	AGCCAGGTAACGGTTAGCAC
Fgf2 F	AGAAGAGCGACCCACACG	HES1 F	TCAACACGACACCGGATAAAC
Fgf2 R	TTCATAGCAAGGTACCGGTTG	HES1 R	GCCGCGAGCTATCTTTCTCA
Pdgfa F	TAACACCAGCAGCGTCAAGT	PUMA F	GACCTCAACGCACAGTACGAG
Pdgfa R	TCAATTTTGGCTTCTTCTGA	PUMA R	AGGAGTCCCATGATGAGATTGT
Vim F	TCCACTTTCCGTTCAAGGTC	NOTCH1 F	CAATGTGGATGCCGAGTTGTG
Vim R	AGAGAGAGGAAGCCGAAAGC	NOTCH1 R	CAGCACCTTGCGGTCTCGTA
Cdh2 F	CGTCCACCTTGAATCTGCT	BCL2L2 F	GATGGTGGCTACCTGGAGA
Cdh2 R	AAGGACAGCCCCTTCTCAAT	BCL2L2 R	AGAGCTGTGAACTCCGCCA
Cdkn2b F	GATCCCAACGCCCTGAAC		
Cdkn2b R	TGGTAAGGGTGGCAGGGT		
Cdkn1b F	GTGGACCAAATGCCTGACTC		
Cdkn1b R	TTCTTCTGTTCTGTTGGCCC		
Igfbp7 F	CATCACCAGGTGAGCAAG		
Igfbp7 R	CTCAAGAACACCTTGGCACC		
Hey2 F	TGAAGATGCTCCAGGCTACA		
Hey2 R	TCTGTCAAGCACTCTCGGAA		

**Tabla 1. Lista de primers utilizados para la RT-qPCR.** Las dos tablas muestran las secuencias utilizadas para la amplificación en qPCRs de genes de ratón (izquierda) y de humano (derecha).

# INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

## Western Blot

La extracción de proteína se debe realizar de forma rápida y eficiente para evitar degradaciones, mantener fosforilaciones y para que el extracto proteico represente de manera fidedigna el estado original de las proteínas en la muestra.

Para extraer proteína de células en monocapa éstas se lavan con PBS frío antes de procesar la muestra. En el caso de la extracción proteica de los diversos órganos y tejidos analizados, primero se extrae el órgano del ratón se limpia cuidadosamente y se congela rápidamente en nitrógeno líquido, después con la ayuda de bolas metálicas se tritura inmerso en el buffer de extracción proteica.

En cuanto a los buffers de extracción o lisis proteica varían en función de la finalidad y la aplicación que queramos otorgar a ese extracto. Nosotros básicamente utilizamos dos buffers diferentes: uno que consiste en una solución desnaturalizante y otro que contiene una solución que mantiene la estructura de las proteínas (no desnaturalizante, cuyo detergente es NP-40). En el primer caso se utiliza un tampón de extracción que contiene Tris-HCl 62.5mM (pH 6,8) con 2% de SDS. En el segundo caso se utiliza un buffer que contiene 1% de NP-40, 150mM NaCl, 50mM Tris pH8, 1mM EDTA, 1mM EGTA, complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Una vez obtenidos los extractos de proteína, estos son resueltos mediante electroforesis en geles de poli-acrilamida con SDS. Dichos geles se utilizan para separar extractos proteicos complejos según su peso molecular. Se preparan a partir de la solución Acryl/BIS TM, que contiene un 39% de acrilamida con un 1% de bis-acrilamida. La reacción de polimerización se realiza con 0,1% de TEMED (Sigma) como iniciador de la reacción y con persulfato de amonio (Sigma S208) al 0,05% como catalizador. Los geles están formados básicamente por dos partes; la parte superior (o gel apilador) donde se cargan las muestras y se utiliza un porcentaje bajo de acrilamida (3-5%) y la parte inferior (o gel separador) donde el porcentaje de acrilamida dependerá del peso molecular de las proteínas que queremos separar. Las muestras ya cuantificadas, mediante el kit de Lowry (Bio-Rad), se preparan añadiendo tampón de carga 5x, compuesto por 10% SDS, 250

mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 720nM de  $\beta$ -mercaptoetanol y azul de bromofenol. La electroforesis y la migración de las proteínas se realiza a voltaje constante (150 V) con un tampón de migración que contiene 25mM Tris, 1,44% glicina y 0,1% SDS.

Una vez las proteínas están separadas se realiza el electro-transferencia de éstas a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), gracias a una solución de transferencia que contiene 25 mM Tris, 192 mM glicina a pH 8,3 y se transfiere a voltaje constante (90-100V) durante 1 hora. Una vez finaliza la transferencia, la membrana se incuba con solución de bloqueo que contiene TBST (20 mM Tris a pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) con 5% de albúmina de suero bovino (BSA) durante una hora a temperatura ambiente, para minimizar y reducir las hibridaciones inespecíficas.

A continuación se incuba la membrana con el anticuerpo primario indicado en cada experimento (Tabla 2) en una solución de TBST con 3% de BSA y 0,02% de Azida sódica, durante toda la noche a 4°C.

Después, la membrana se lava 3 veces (3x10 minutos) con TBST y se incuba con el anticuerpo secundario (1:10000) en una solución de TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se lava 3 veces (3x 10 minutos) con TBST.

El anticuerpo secundario está conjugado a una peroxidasa (HRP), y para detectarla utilizamos unos reactivos que asocian la catálisis del agua oxigenada a la oxidación del luminol, dando lugar a un incremento de la quimioluminiscencia. Los reactivos utilizados para revelar la señal son EZ-ECL (Biological Industries) o ECL TM Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) si tenemos mucha o poca señal quimioluminiscente respectivamente. La membrana se analiza con el VersaDoc Imaging system 4000 (BioRad Laboratories).

Antibody	Dilution	Company	Cat#/ID
Spry1 (D9V6P)	1:1000	Cell Signaling	13013
Spry1 (D9V6I)	1:1000	Cell Signaling	12993
Phospho-Akt (Ser473)	1:1000	Cell Signaling	4060
Spry2	1:1000	Sigma-Aldrich	S1444
Beta-Actin	1:3000	Santa Cruz Biotechnology	sc-1616
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	1:2000	Biologend	675502
Phospho-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)	1:1000	Biologend	903501
HA	1:1000	Roche	11867423001 (3F10)
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	1:1000	Cell Signaling	9205
Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)	1:1000	Cell Signaling	2531
p53 (DO-1)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-126
Phospho-p53 (Ser15)	1:1000	Cell Signaling	9284
Phospho-Chk1 (Ser345)	1:1000	Cell Signaling	2348
Phospho-Mnk1 (Thr197/202)	1:1000	Cell Signaling	2111
Phospho-MAPKAPK2	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-293140
Phospho-PKC zeta/lambda (Thr410/403)	1:1000	Cell Signaling	9378
p21	1:500	Millipore	05-345

Antibody	Dilution	Company	Cat#/ID
Rabbit IgG-HRP	1:10000	Jackson	111-035-003
Mouse IgG-HRP	1:10000	Jackson	115-035-003
Goat IgG-HRP	1:10000	Jackson	705-035-147

**Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados en Western Blot.** La tabla muestra los diferentes anticuerpos primarios (arriba) y secundarios (abajo) utilizados para la técnica de Western Blot. Además, en dicha tabla se indica la dilución utilizada, la compañía de origen y el número o referencia que identifica cada anticuerpo.

## Histología y técnicas de inmunodetección

Los órganos de los ratones se extraen del animal e inmediatamente se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, en función de la técnica histológica que queremos llevar a cabo, se pueden seguir protocolos diferentes. Para protocolos de Inmunohistoquímica, los tejidos se incluyen en parafina y posteriormente se hacen secciones de 5 $\mu$ m con un micrótopo para hacer tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE) con el fin de estudiar la histología de cada tejido o

tinciones contra antígenos específicos para el análisis de marcadores proteicos. En cambio, para realizar protocolos de Inmunofluorescencia, los tejidos fijados se sumergen en una solución de PBS con 20% de sacarosa toda la noche a 4°C para crioproteger la pieza extraída. Posteriormente, se incluye el tejido en OCT para congelar el material a -80°C y poder hacer secciones de 10-12µm con un criostato.

En cuanto a la inmunohistoquímica, antes de comenzar el proceso, los cortes de 5µm de parafina se secan en una estufa a 65°C durante 1h, luego se realiza un pretratamiento de desparafinación y rehidratación del tejido. Posteriormente se sumergen los portaobjetos en un buffer que contiene 50x Tris/EDTA a pH 9 a 95°C durante 20 minutos, utilizando un aparato de pretratamiento PTLINK (Dako), a fin de recuperar los antígenos enmascarados durante la preparación de los tejidos para la tinción (epitope retrieval). Antes de la tinción, los cortes de parafina se incuban con 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para bloquear la peroxidasa endógena y reducir el fondo cuando utilizamos el cromógeno. Después se hacen tres lavados con PBS y ya podemos aplicar el anticuerpo primario durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se hacen tres lavados con PBS y se aplica el anticuerpo secundario. Si se utiliza directamente el anticuerpo secundario unido a la peroxidasa (HRP) se incuba durante 30 minutos, en cambio si se utiliza un sistema de amplificación de la señal, se incuba primero el anticuerpo unido a biotina durante 30 minutos, después se hacen tres lavados con PBS y se incuba el tejido con Streptavidina unida a peroxidasa (HRP) durante 15 minutos, todo a temperatura ambiente. Finalmente el fin de visualizar la reacción se aplica el cromógeno de diaminobenzidina (DAB) y se contra-tiñe con Hematoxilina para marcar los núcleos de las células del tejido analizado.

En lo relativo a la inmunofluorescencia, la hemos realizado tanto en células en cultivo fijadas como con cortes congelados de criostato. En primer lugar se hacen tres lavados con PBS y en el caso de la detección de p65 y phospho-H2AX se incuba con metanol 100% frío durante 10 minutos, con el fin de mejorar la detección nuclear.

Antes de aplicar el anticuerpo primario, hay que incubar las células o el corte del tejido con solución de bloqueo, que contiene PBS con 5% HS y 0.2% de Tritón X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente. En el caso de la caspasa-3 activada, la solución de bloqueo está compuesta de 2% BSA, 2% HS y 0.1% Tritón X-100 en PBS. Durante el proceso de bloqueo se dan dos procesos, por un lado el Tritón permeabiliza las membranas de las células, lo que permitirá el acceso de los anticuerpos y la unión a sus

antígenos específicos y por la otra, gracias al suero de caballo (HS) se bloquean los sitios de unión inespecíficos.

El anticuerpo primario requerido (Tabla 3) se incubaba toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS se incubaba con el anticuerpo secundario (Tabla 3) unido al fluorocromo acompañado de DAPI durante 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar se hacen tres lavados de 10 minutos con PBS y, una vez montadas, ya se pueden observar y analizar las muestras al microscopio óptico invertido de epifluorescencia Olympus 1X70 o bien al microscopio confocal Olympus FV-1000.

Antibody	Dilution	Company	Cat#/ID
Phospho-H2AX (Ser139)	1:100	Biolegend	613402
BrdU	1:100	Dako	M0744
p65	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-372
Cleaved Caspase-3	1:100	Cell Signaling	9661

Antibody	Dilution	Company	Cat#/ID
Mouse IgG Dylight488	1:500	Jackson	715-485-150
Rabbit IgG Dylight488	1:500	Jackson	711-485-152
Mouse IgG Dylight594	1:500	Jackson	715-515-150
Rabbit IgG Dylight594	1:500	Jackson	711-515-152
Rat IgG Dylight594	1:500	Jackson	712-515-150

**Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.** Las tablas mostradas indican los anticuerpos primarios (arriba) y secundarios (abajo) utilizados en esta serie de procedimientos.

### Actividad Beta-galactosidasa asociada a la senescencia

Para analizar la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia celular utilizamos tanto células en cultivo como secciones de tejido en OCT fijadas con un buffer de PBS con 0.5% de glutaraldehído o PFA al 4%, respectivamente. En primer lugar, tanto en el caso de las células en cultivo como en las secciones de tejido se llevó a cabo una incubación de 10 minutos en un buffer que contiene PBS con 2Mm de MgCl<sub>2</sub> y

seguidamente se incuban a 37°C con la solución de tinción, compuesta por 1mg/ml X-Gal (Sigma), 5mM K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> y 2mM MgCl<sub>2</sub> en un buffer de PBS a pH 6. El tiempo de incubación varía en función del tipo celular analizado, de ahí que los tiempos pueden oscilar entre las 2 y las 16 horas. El pH de la reacción es muy crítico ya que la actividad β-galactosidasa de los lisosomas sólo es activa a dicho pH levemente ácido. Para poder comparar las muestras analizadas, el ensayo se llevó a cabo con todas las muestras simultáneamente.

## ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

### Obtención de las muestras

Las muestras, triplicados obtenidos de animales diferentes de los genotipos indicados a día 14 post-extracción, en el inicio de la senescencia por tanto, fueron extraídas, con el fin de preservar el RNA resultante en condiciones óptimas, mediante RNAeasy mini kit (Qiagen) una vez pelleteadas las células de cada condición.

### Análisis de los datos mediante Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Siguiendo las directrices del tutorial proporcionado por los desarrolladores de la aplicación GSEA, los datos obtenidos en el microarray no fueron filtrados y los valores de expresión utilizados en la aplicación no se introdujeron en escala logarítmica en base 2 (Subramanian, Tamayo et al. 2005). Todos los gene sets mostrados en este trabajo tienen los valores estadísticos pertinentes para ser considerados como significativamente asociados a una de las condiciones ( $P < 0.05$ ;  $FDR < 0.25$ ).

### Heatmaps de expresión de genes seleccionados

Los datos de expresión de los genes mostrados en diversos heatmaps fueron obtenidos del microarray, siendo introducidos en este caso en la escala logarítmica en base 2 proporcionada por el propio experimento.

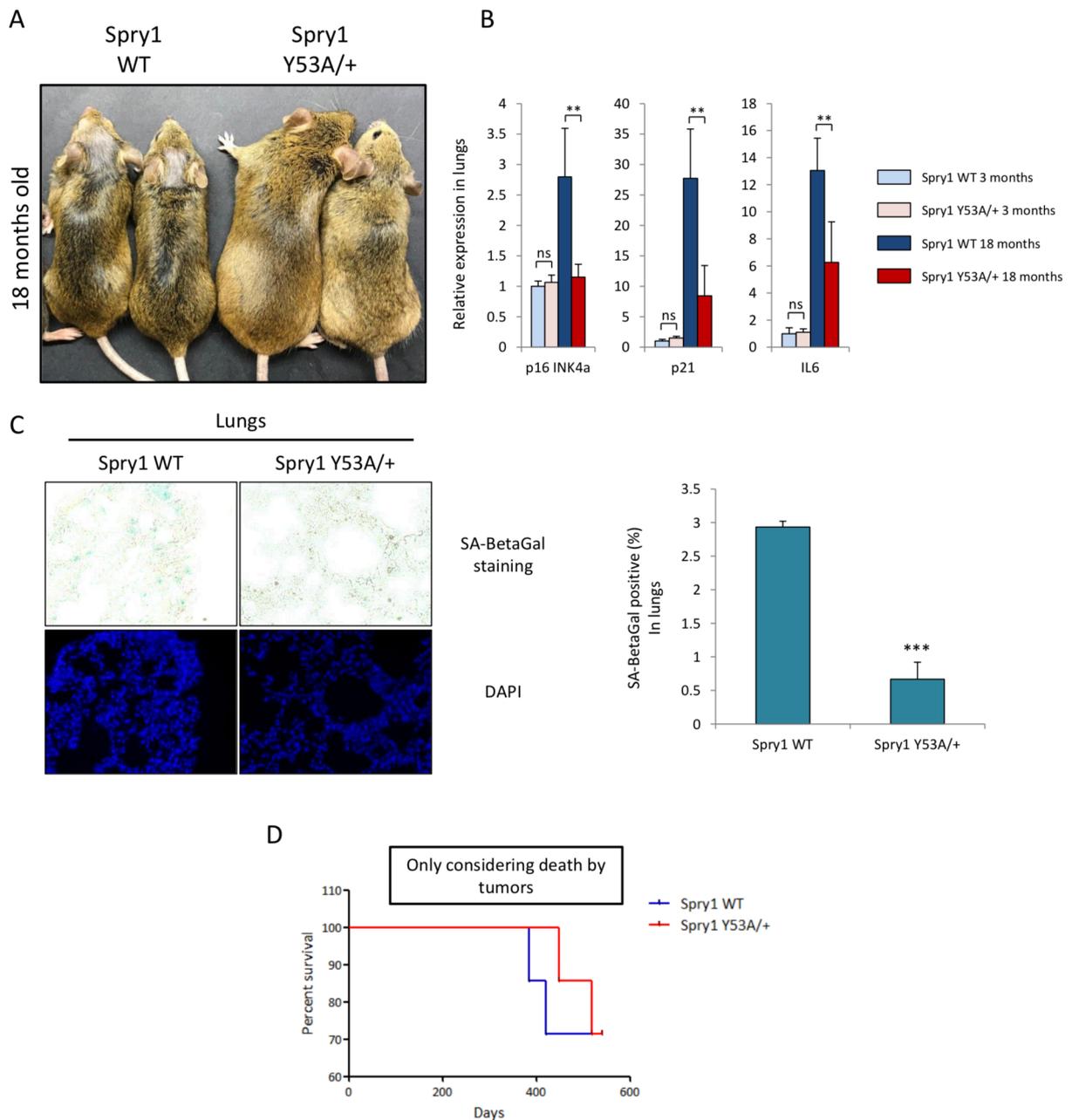


# Resultados



## La mutación Y53A desvela la relevancia de Spry1 en la senescencia celular relacionada con el envejecimiento

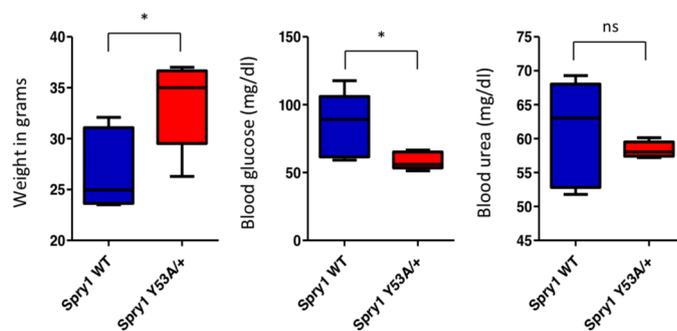
Más allá de los ámbitos de senescencia necesitados de la función de Spry1 previamente observados en nuestro grupo, el cáncer (Macia, Gallel et al. 2012) y el desarrollo embrionario, decidimos valorar la relevancia de Spry1 en senescencia analizando otros contextos donde ésta resulta nociva para el organismo, como en el caso del envejecimiento (McHugh and Gil 2017) o en el de la senescencia inducida por tratamiento con quimioterapia (Demaria, O'Leary et al. 2017). Para ello, dejamos envejecer 5 ratones Spry1 WT y 5 ratones Spry1 Y53A/+, estando estos últimos siempre carentes de los defectos del desarrollo que en cierto porcentaje presentan, durante 18 meses, edad a la que los efectos de la senescencia asociada al envejecimiento son suficientemente mensurables (Childs, Durik et al. 2015). Cuando comparamos ambos genotipos, a simple vista se pueden observar varios de los signos de la aparición del envejecimiento (Figura 23A) como caquexia o aparición de zonas de menor densidad o blanqueamiento de pelo (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013) solamente observadas en el genotipo Spry1 WT. Para cerciorarnos de la relación de la senescencia celular con las diferencias mostradas entre ambos genotipos, comparamos la expresión de varios genes ya descritos como marcadores de senescencia (Figura 23B) como p16 INK4a, p21 o IL6 en tejidos como el pulmón (Baker, Wijshake et al. 2011) entre ratones de ambos genotipos a 3 y a 18 meses de edad. Mientras que la expresión de los tres marcadores no es diferente entre genotipos a los 3 meses en el tejido pulmonar, al situarnos en los 18 meses de edad se pueden observar diferencias significativas en los genes interrogados, existiendo una disminución de la inducción de todos ellos en los ratones Y53A/+. Además, el marcador beta-galactosidasa asociada a la senescencia (Figura 23C) apareció en menor medida en los pulmones de los ratones Y53A/+ al compararlos con los ratones Spry1 WT. Por otro lado, los defectos en la inducción de la senescencia asociada al envejecimiento natural de los ratones Y53A/+ no parece promover la aparición de tumores en los animales que albergan una copia de la mutación (Figura 23D). De hecho, en ambos genotipos, solamente 2 animales de 7 fueron sacrificados a causa del surgimiento de neoplasias, proporciones que se acercan a las de la incidencia natural de tumores en ratones de laboratorio (Pompei, Polkanov et al. 2001).



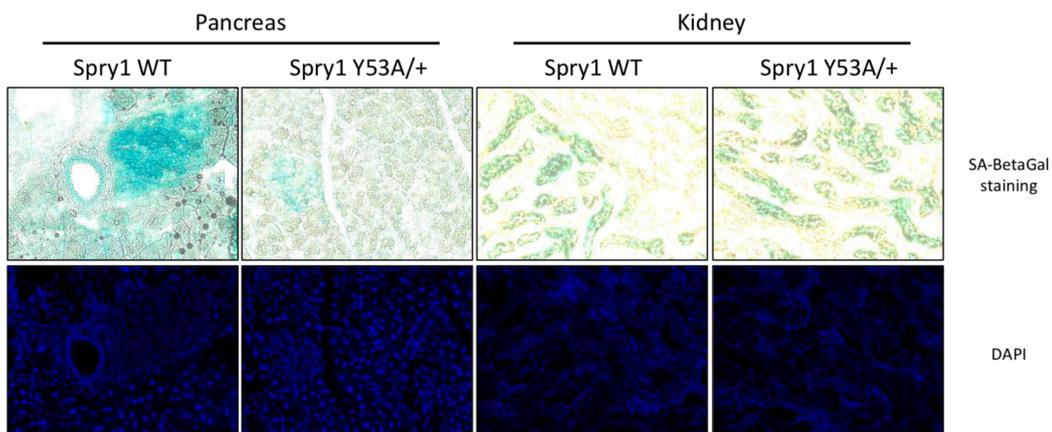
**Figura 23. La mutación de la tirosina 53 de Spry1 entorpece la inducción de senescencia celular en un contexto de envejecimiento.** En la figura se muestra una imagen (A) representativa (n=5) donde se observan las diferencias en cuanto al aspecto de los ratones WT y los mutantes de Spry1 en referencia a la caquexia y la presencia de blanqueamiento de pelo. El análisis por RT-qPCR de la expresión de los marcadores de senescencia mostrados (B) muestra las diferencias en la expresión de p16INK4a, p21 e IL6 en pulmón. La presencia de marcador beta-galactosidasa asociada a la senescencia fue medida y cuantificada en los pulmones de los ratones envejecidos (C) así como la aparición espontánea de tumores valorada y representada en forma de gráfico (D).

Algunas variables asociadas al envejecimiento como el peso o los niveles de glucosa y urea en sangre fueron medidas (Figura 24A), arrojando valores asociados al envejecimiento, como son la disminución del peso y el aumento de glucosa en sangre, en los ratones WT. En cambio, la presencia de urea plasmática no resultó significativamente distinta entre los dos genotipos estudiados. Ello encaja con el hecho de que, al observar la tinción beta-galactosidasa asociada a la senescencia en distintos tejidos de los animales envejecidos (Figura 24B), encontramos órganos cuyo nivel de marcaje resultaba similar entre los ratones *Spry1* WT y *Spry1* Y53A/+, como sucede por ejemplo en el tejido renal, cuyo deterioro resultante de la acumulación de células senescentes con la edad es responsable del aumento de los niveles de urea en sangre (Baker, Childs et al. 2016).

A

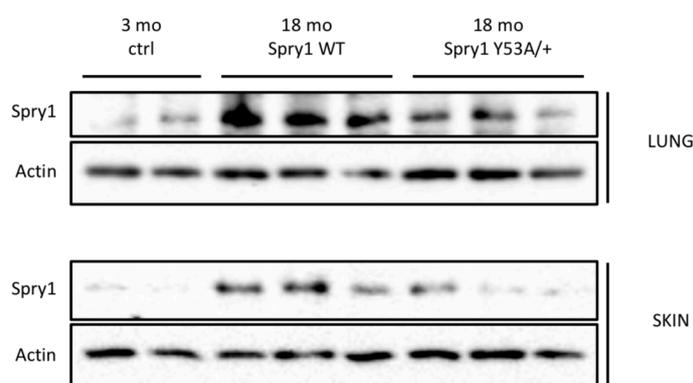


B



**Figura 24. El papel de *Spry1* en la inducción de senescencia en un contexto de envejecimiento es específico de ciertos tejidos.** Algunos marcadores sistémicos del envejecimiento como la reducción de peso y el nivel de glucosa o de urea en sangre fueron analizados y agrupados por genotipo (A). Panel de imágenes representativo de las diferencias en la tinción beta-galactosidasa asociada a la senescencia en dos tejidos relacionados con los marcadores valorados en sangre como el páncreas y el riñón (B).

Además, mediante Western blot, pudimos advertir un aumento claro de los niveles de Spry1 en tejidos de ratones envejecidos como el pulmón o la piel (Figura 25). No obstante, el aumento de los niveles de Spry1 es claramente menor en los ratones mutantes Y53A, mostrando un cierto papel de la tirosina en la estabilización, ya sea de manera directa o indirecta, de los niveles de Spry1. Cabe señalar que, pese a la presencia de un alelo no mutado en los ratones con la mutación Y53A, el efecto de inducción de Spry1 no se da, sugiriendo por tanto un papel de la tirosina 53 que va más allá de la mera estabilización de la propia proteína en este caso, pudiendo la mutación tanto interferir con el incremento de la forma WT como con el establecimiento de una respuesta senescente que promueva el aumento de sus niveles.

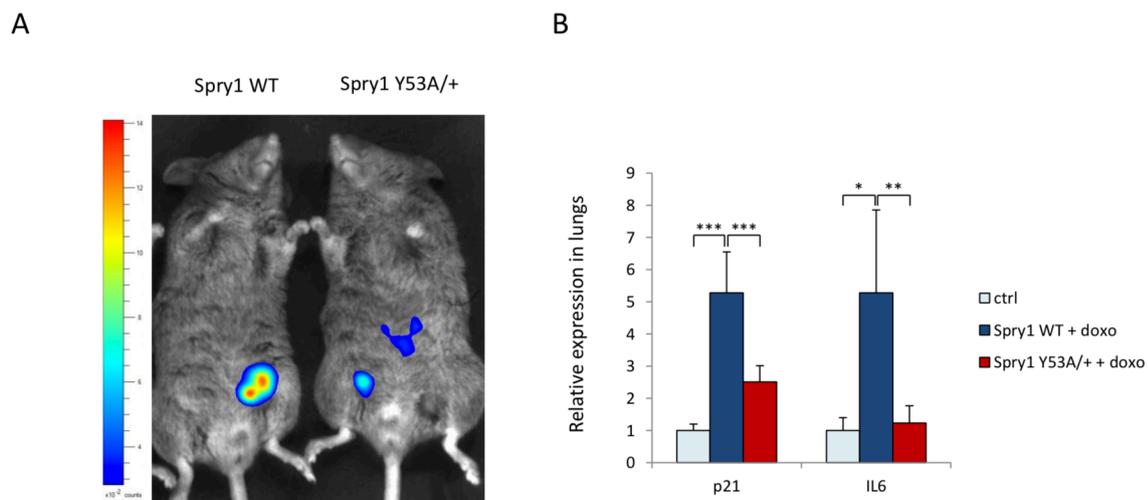


**Figura 25.** Los niveles de proteína Spry1 aumentan en tejidos de animales envejecidos como el pulmón y la piel, mostrando un mayor aumento en los que no albergan la mutación Y53A. Los Western Blots mostrados muestran los niveles de Spry1 comparados entre genotipos y edades (A).

Para constatar la relevancia de la tirosina 53 de Spry1 en la senescencia asociada al envejecimiento utilizamos un modelo de senescencia inducida por quimioterapia. Como bien es sabido, la quimioterapia clásica, en este caso la doxorubicina, conlleva en la célula la producción de daño al DNA (Demaria, O'Leary et al. 2017), conduciendo tanto a la apoptosis como a la senescencia de las células cancerosas y, como efecto colateral, también de las sanas. Por otro lado, el acúmulo de daño al DNA es una de las principales causas del envejecimiento (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013) así como de la senescencia celular (d'Adda di Fagagna 2008). Además, tanto en los tratamientos con quimioterapia (Bracci, Schiavoni et al. 2014) como en el envejecimiento (Salminen, Kaarniranta et al. 2012) la función adecuada del sistema inmune se encuentra comprometida. Por tanto, la senescencia inducida por quimioterapia ha sido reseñada como un modelo que guarda

grandes similitudes con la senescencia de los organismos envejecidos (Childs, Durik et al. 2015).

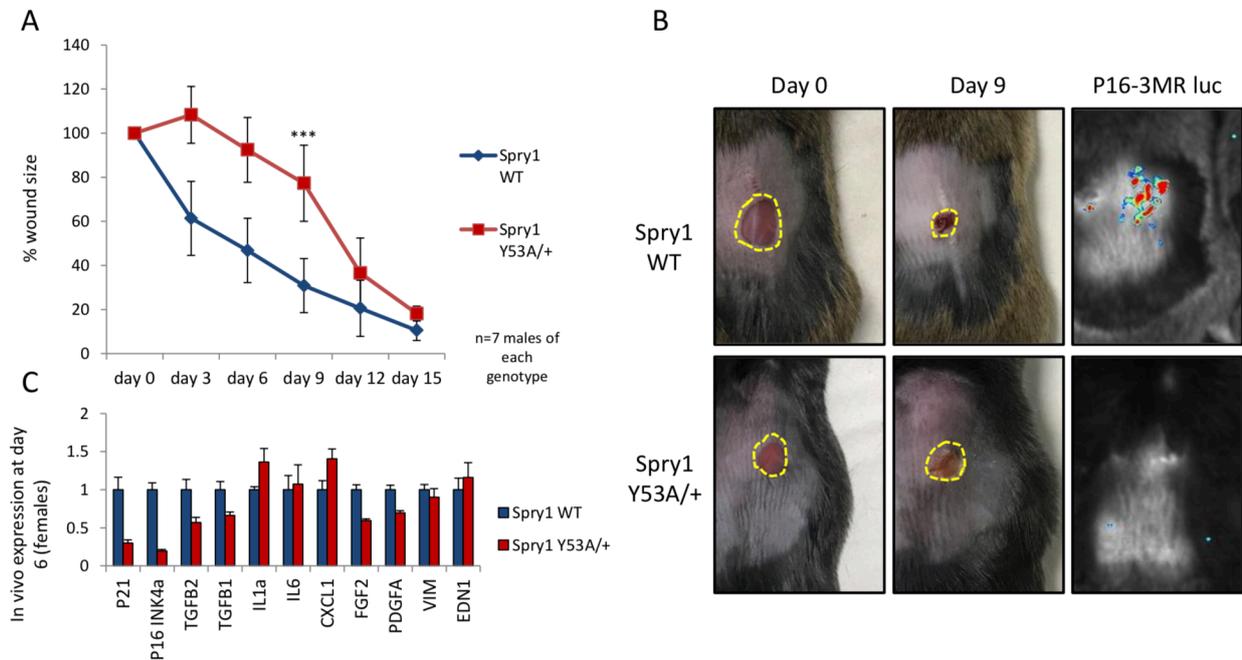
En nuestro caso, utilizamos un modelo bien documentado de producción de senescencia por tratamiento único con doxorubicina 10mg/kg (Demaria, O'Leary et al. 2017) para comparar, a los diez días post-administración del fármaco, la senescencia en ratones Spry1 WT y Spry1 Y53A/+. Para evaluar la inducción de senescencia, en primer lugar, hicimos uso del ratón p16-3MR. Al realizar la comparación entre los ratones mutantes de la tirosina y los ratones Spry1 WT, pudimos observar una clara disminución en la actividad luciferasa bajo el control de p16 INK4a (Figura 26A). Por otro lado, la expresión de p21 e IL6 en los pulmones de los ratones Y53A/+ se induce en mucha menor medida que en el caso de los Spry1 WT (Figura 26B). Ello, de nuevo, respalda el concepto de la trascendencia de Spry1 en otro modelo de senescencia nociva relacionado con la acumulación de lesiones en el DNA, como las que se producen tanto con la quimioterapia convencional como con el paso del tiempo (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013).



**Figura 26. La senescencia inducida por tratamiento con quimioterapia, relacionada con el envejecimiento, también requiere de la integridad de la tirosina 53 de Spry1.** La figura muestra, en primer lugar, la inducción de actividad luciferasa representativa (n=6 por condición) dependiente de la expresión del promotor de p16 en el ratón transgénico 3MR (A). Además, en pulmón, la expresión de p21 e IL6 fue valorada por medio de RT-qPCR (B).

## El efecto beneficioso de la senescencia en un contexto de reparación de heridas cutáneas también requiere de la integridad de Spry1

Como ya ha sido extensamente desarrollado en la introducción, la senescencia celular, más allá de un simple fenómeno que sucede a las células en cultivo, es un proceso que sucede in vivo con contrastadas funciones perjudiciales en situaciones como las estudiadas en el anterior apartado. Sin embargo, cuando la respuesta senescente se desarrolla de manera eficaz ampara procesos esenciales para el organismo como la regeneración de heridas (Krizhanovsky, Yon et al. 2008), el desarrollo embrionario (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013) o la contraposición a la transformación tumoral de los tejidos (Collado, Gil et al. 2005). Para comprobar si la acción de Spry1 es también relevante en estos modelos beneficiosos de senescencia in vivo, como ya sucede con el desarrollo embrionario, decidimos, en primer lugar, evaluar la capacidad de inducción de dicha respuesta en un modelo recientemente descrito, la regeneración de heridas cutáneas (Demaria, Ohtani et al. 2014). Tras la producción de esta clase de lesiones en la parte dorsal del ratón, observamos la cinética de cierre de dichas heridas, en cada genotipo (n=7 por genotipo), relativizando cada una de ellas a su tamaño inicial (en tanto por ciento) en los días indicados. En el estudio primigenio de la relación de la senescencia con este tipo de proceso curativo, las diferencias en machos son máximas a día 9 post-herida, dado que en ese momento se produce el pico de cantidad de células presentes en la zona afectada. Ello concuerda con los resultados obtenidos en nuestro caso ya que, siendo máximas las diferencias de tamaño de herida entre WT e Y53A/+ a día 9 (Figuras 27A y 27B), observamos también una reducción en la expresión de marcadores de senescencia p21, p16 INK4a, TGFB1, TGFB2, FGF2, FGF7 y PDGFA (Figura 27C), así como la presencia de actividad luciferasa bajo el control del promotor de p16INK4a debido al uso del ratón p16-3MR (Figura 27B).



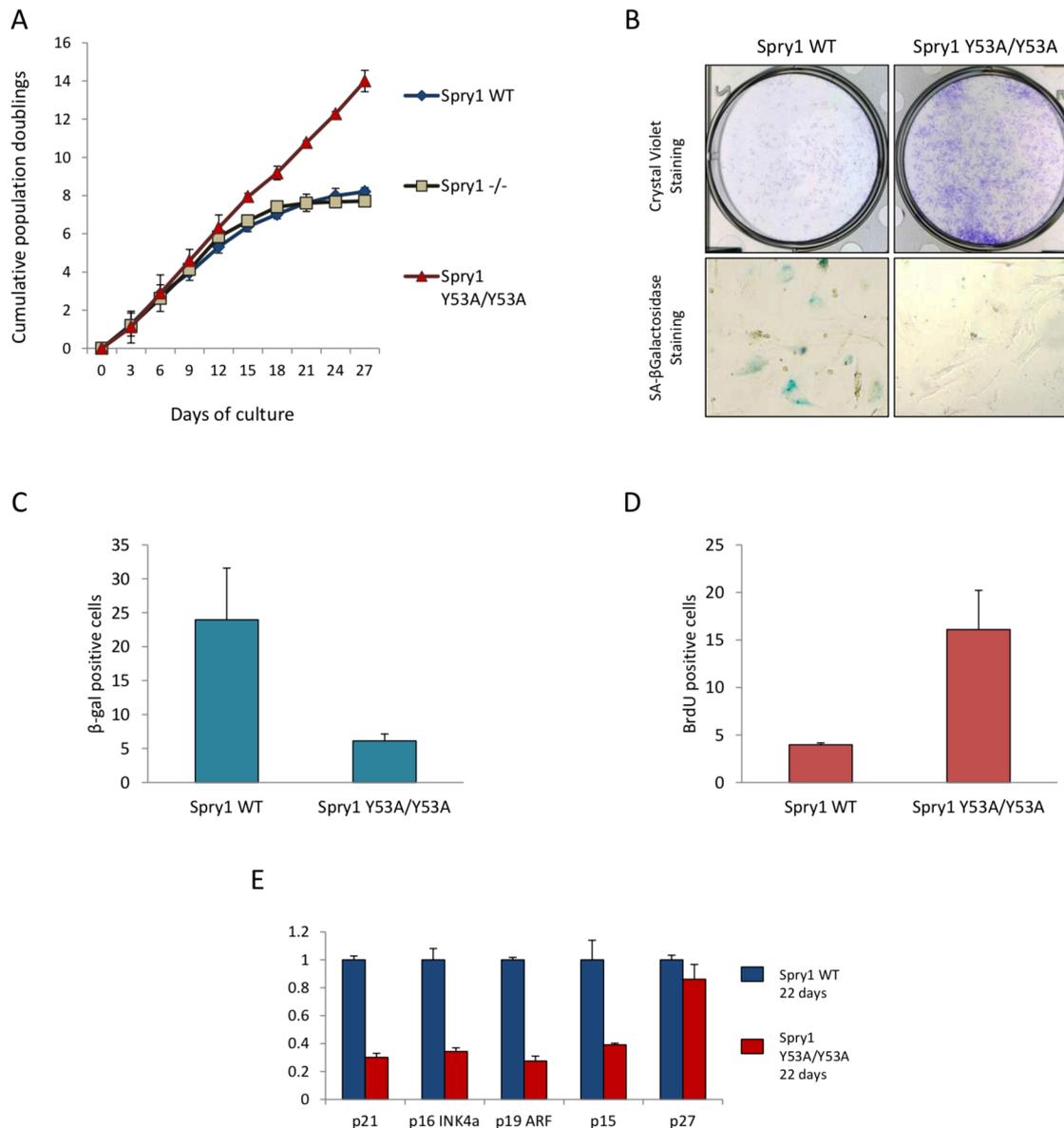
**Figura 27. Spry1 favorece la correcta inducción de senescencia en un contexto in vivo de regeneración de lesiones cutáneas.** Para el análisis de la integridad de la senescencia en la regeneración de heridas de la piel (n=7 por genotipo), en primer lugar, se determinó la dinámica de cierre de las heridas producidas con un punch de 6mm en los distintos genotipos (A). El cuadro representativo (B) muestra, a día de inducción máxima de senescencia en este modelo, la diferencia entre respecto al tamaño de las heridas así como a la expresión de luciferasa del ratón 3MR. En ese mismo día, mediante RT-qPCR, diversos genes implicados en senescencia fueron analizados (C).

Los fibroblastos dérmicos obtenidos de ratones *Spry1* Y53A/Y53A evitan el establecimiento de senescencia celular prematura causada por estrés

Con la intención de estudiar el papel de la mutación Y53A en un modelo de senescencia que nos permitiera un estudio más minucioso del papel de *Spry1* en este proceso celular, decidimos obtener, de ratones recién nacidos, cultivos primarios de fibroblastos dérmicos, relevantes en uno de los modelos in vivo de senescencia en que hemos desvelado un papel esencial de *Spry1*, la regeneración de heridas cutáneas (Jun and Lau 2010).

En primer lugar, utilizando dichos fibroblastos evaluamos la capacidad de inducción de senescencia de las células provenientes de ratones *Spry1* Y53A/Y53A. Siguiendo un estricto esquema de cultivo 3T3 en el que 300.000 células de cada condición son plantadas cada tres días consecutivamente, advertimos cómo, mientras las células de ratones *Spry1* WT o *-/-* agotan progresivamente su capacidad de crecimiento a partir del día 14-15, las células *Spry1* Y53A/Y53A evitan este freno proliferativo (Figura 28A). Comprobamos si esta parada del crecimiento celular encaja con el establecimiento de senescencia celular realizando ensayos beta-galactosidasa a pH 6.0 (Figuras 28B y 28C), obteniendo claras diferencias entre la tinción que muestran las células *Spry1* WT comparadas con las Y53A/Y53A a tiempo final (día 22 post-extracción). En este mismo sentido, los fibroblastos *Spry1* WT redujeron casi por completo la incorporación de BrdU, a diferencia de los Y53A/Y53A (Figura 28D). En cuanto a la expresión de inhibidores de ciclo como p16 INK4a, p19 ARF, p21, p15INK4b o p27, observamos una inducción sumamente acusada cuando comparamos entre el día 2 post-extracción y el día 22 (datos no mostrados), siendo además claramente diferencial entre los días 22 de las células *Spry1* WT y las Y53A/Y53A en todos los casos excepto en el de p27 (Figura 28E). Sorprende que el establecimiento de la parada proliferativa se produzca a tal velocidad en ausencia de estímulo de senescencia aparente, dado que difícilmente podría tratarse de un acortamiento telomérico crítico en un lapso de tiempo tan corto como son menos de treinta días en cultivo. De hecho, teniendo en cuenta el contraste entre el conocido mayor tamaño de los telómeros de ratón en comparación con los humanos y la menor capacidad proliferativa de las células murinas respecto a las humanas en cultivo, parece más razonable considerar que las condiciones artificiales de cultivo celular, en las que las células se encuentran a un artificial 21% de oxígeno atmosférico frente al 3% en el que habitan en el organismo, causan un estrés oxidativo al que los fibroblastos de ratón son

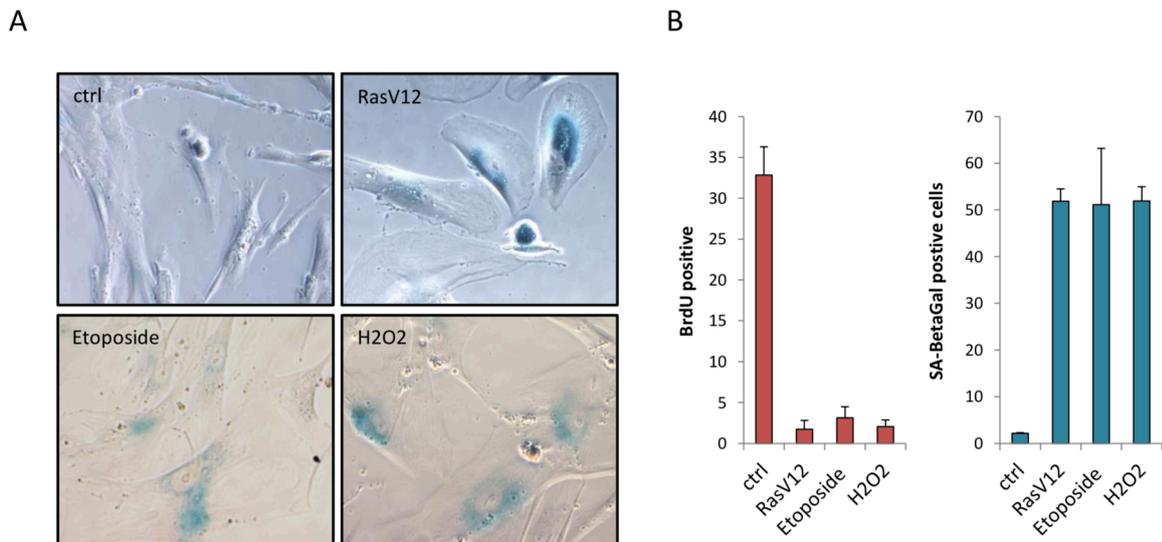
sumamente sensibles y por el que inducen un tipo de senescencia prematura, como ha sido ya demostrado (Parrinello, Samper et al. 2003).



**Figura 28.** Los fibroblastos dérmicos obtenidos de ratones recién nacidos *Spry1* Y53A/Y53A, en contraste con los *Spry1* WT y *Spry1* KO, escapan a la senescencia prematura inducida por estrés. Mediante el esquema 3T3, las diferencias en el agotamiento proliferativo de los fibroblastos dérmicos fueron valoradas (A). Además, la presencia de senescencia celular fue confirmada mediante los ensayos clonogénicos, la tinción Beta-galactosidasa asociada a la senescencia (B y C) y la incorporación de BrdU (D). La expresión de los inhibidores de ciclo p21, p16INK4a, p19ARF, p15 y p27 en cada genotipo fue interrogada por medio de RT-qPCR (E).

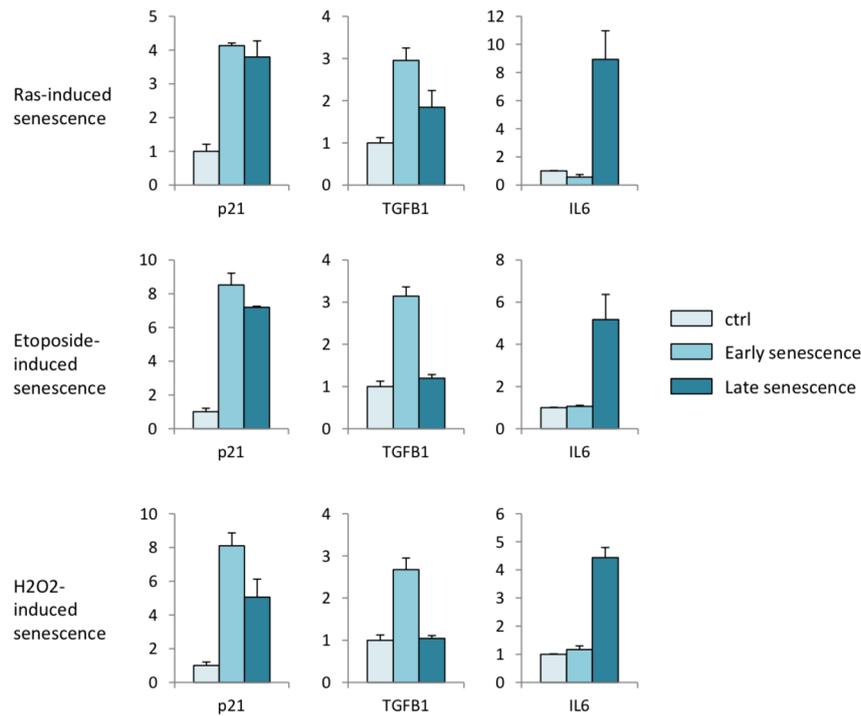
Las proteínas Spry son inducidas a consecuencia de todos los estímulos clásicos desencadenantes de senescencia celular.

Debido a los factores que condicionan el estudio de la senescencia en cultivos derivados de células de ratón relatados en el anterior apartado, y como prueba de un papel más universal de las proteínas de la familia Spry en senescencia, decidimos utilizar uno de los modelos canónicos para el estudio de la senescencia celular en células humanas, los fibroblastos de pulmón embrionario IMR90 (Nichols, Murphy et al. 1977). Con el fin de caracterizar la función de los diferentes Spry en los distintos tipos de senescencia in vitro, utilizamos diversos métodos reiteradamente descritos para la inducción de senescencia celular en este tipo celular. En nuestro trabajo, dichos estímulos inductores de senescencia fueron la introducción lentiviral de un alelo constitutivamente activo de Ras (RasV12) y los tratamientos con etopósido y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), con el fin de producir en las células senescencia inducida por oncogenes, por daño al DNA y por estrés oxidativo, respectivamente. Pese a utilizar métodos ya previamente descritos para la inducción de los tipos de senescencia nombrados, realizamos las comprobaciones pertinentes para asegurarnos de que estaban conduciendo a las células al estado senescente deseado para nuestros posteriores estudios. Ello fue realizado mediante la tinción de las células con el marcador beta galactosidasa asociada a la senescencia, así como a través de la valoración de la capacidad proliferativa de las células cuantificando el número de éstas capaces de incorporar BrdU en cada una de las condiciones. Como se puede observar en la figura 29, las células tratadas con los diversos inductores, 12 días después de los estímulos, disminuyeron su proliferación de manera significativa y manifestaron una tinción claramente incrementada del marcador beta galactosidasa a pH 6.0 (Figuras 29A y 29B), indicando que las diversas aproximaciones para establecer senescencia funcionaron del modo adecuado.



**Figura 29. Inducciones de senescencia en las células IMR90 con los estresores clásicos y sus comprobaciones pertinentes.** Las células inducidas a estado senescente con distintos estresores fueron comprobadas mediante presencia de beta galactosidasa asociada a senescencia (A y B) y la parada proliferativa medida por la incorporación de BrdU (B).

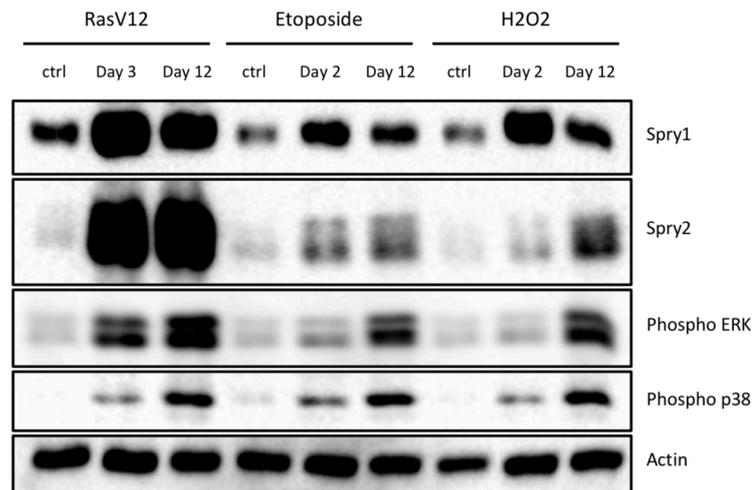
Llegados a este punto, pretendimos comprobar los niveles de proteína de los dos miembros de la familia Spry que pueden ser valorados de manera fiable por Western Blot, Spry1 y Spry2. Dado que la senescencia se ha descrito recientemente como un fenómeno dinámico (Hoare, Ito et al. 2016), también pusimos interés en el posible papel de las proteínas Spry en una etapa temprana de esta respuesta celular (día 2-3 post-estímulo), más allá de la valoración simplista que aporta la observación de este fenómeno a tiempo final. Para asegurarnos de la correcta elección de este intervalo de respuesta correspondiente a la senescencia temprana, valoramos por RT-qPCR la inducción de varios marcadores. Uno, exclusivo de este periodo inicial, TGFB1, adecuadamente expresado en mayor medida en todos los tipos de senescencia interrogados. Otro, excluido de esta etapa, IL6, todavía no expresado en ninguna de las condiciones tempranas (Figura 30). Adicionalmente, comprobamos la expresión de p21, expresado en ambas fases de la respuesta senescente debido a su rápida inducción por p53 (Herbig, Jobling et al. 2004).



**Figura 30. Comprobación por qPCR de la separación de las distintas fases de la senescencia celular en IMR90.** La expresión de los marcadores presentes en las distintas etapas de la senescencia, p21, TGFβ1 e IL6, fueron comprobados por RT-qPCR tras la producción de los estímulos estresores especificados en la fase inicial (días 2-3) así como en la final (día 12).

Por tanto, tras cerciorarnos de la correcta separación de ambas fases de la senescencia en nuestro modelo experimental, nos dispusimos a desvelar los niveles de Spry1 y Spry2 en dichas condiciones. De manera sumamente relevante, tanto Spry1 como Spry2 son inducidos en todos los tipos de senescencia estudiados (Figura 31). No obstante, parece que el aumento de los niveles de Spry1 se da de una manera más semejante en respuesta a todos los daños utilizados mientras que Spry2 se induce en mayor medida cuando el estímulo es la forma oncogénica de Ras, encajando con el papel clásico descrito de Sprouty como elementos de respuesta a la activación de la vía ERK. De hecho, se observa cómo la evolución en el aumento de la señalización ERK en los otros dos tipos de senescencia es mucho más pausada que en el caso de RasV12, encajando además con los niveles de Spry2. Otra de las vías mostradas en este panel es p38, reiteradamente descrita como elemento clave de la senescencia celular en todos los tipos de senescencia utilizados en nuestro estudio. Cabe señalar que, reforzando la

separación de las dos fases de la senescencia hechas en nuestro trabajo, el incremento de la activación de p38 a medida que avanzan los días en las células senescentes ha sido previamente demostrado (Freund, Patil et al. 2011), encajando con la mayor activación obtenida en nuestro caso en los días 12 respecto de los días 2-3 de cada condición.

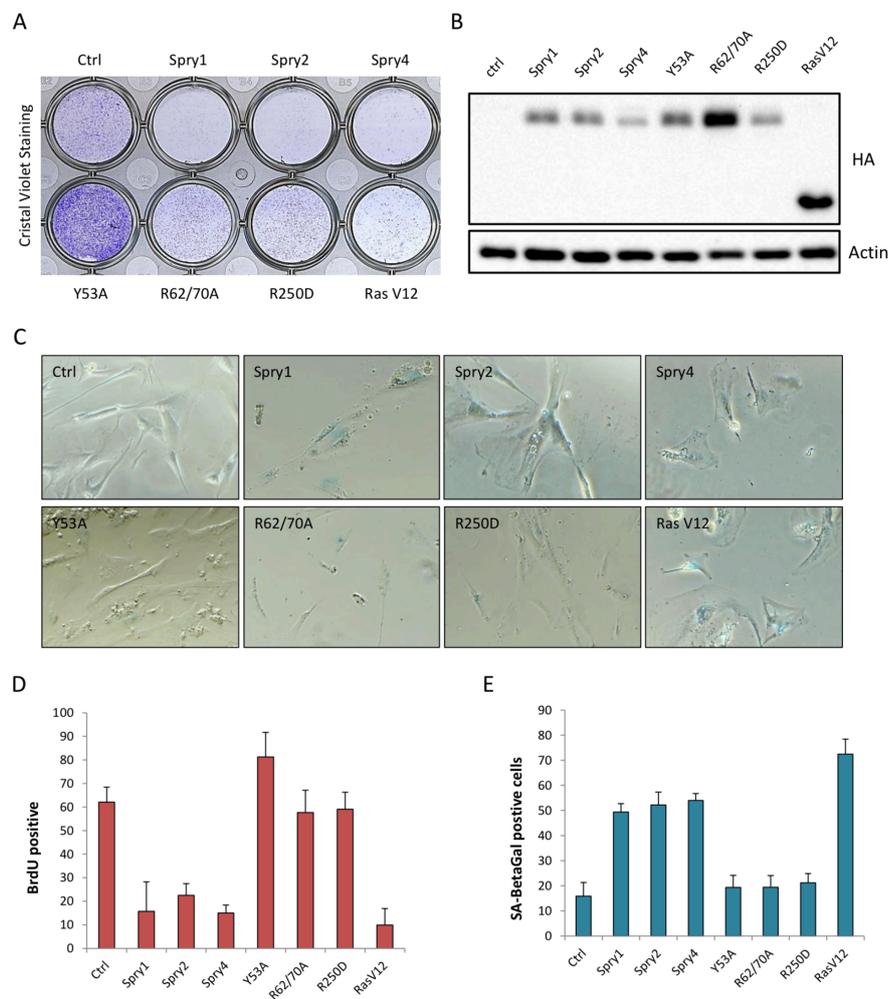


**Figura 31. Spry1 y Spry2 se inducen ya en la etapa temprana de la senescencia y, además, se mantienen aumentados en la tardía.** Separando la senescencia por los distintos estresores en las fases comprobadas en la anterior figura, los niveles de Spry1, Spry2, phospho-ERK y phospho-p38 fueron valorados por Western Blot.

La expresión ectópica de Spry en IMR90 es suficiente para inducir senescencia celular.

Por otro lado, quisimos comprobar si la sola expresión de Spry es capaz de inducir senescencia en las células IMR90. De manera relevante, dicha expresión de los distintos miembros de Spry es capaz de inducir una parada proliferativa de las células (Figura 32A), así como de producir el aumento de la tinción beta galactosidasa asociada a senescencia (Figuras 32C y 32D) además una reducción de la incorporación de BrdU a niveles del control positivo RasV12 (Figura 32E). También, en nuestro estudio utilizamos algunos mutantes de ciertas regiones relevantes de Spry1 ya comentadas en la introducción. Tanto la mutación de la tirosina N-terminal Y53A (ya estudiada en nuestro ratón knockin y, también, descrita como residuo de interacción con c-Cbl), la doble

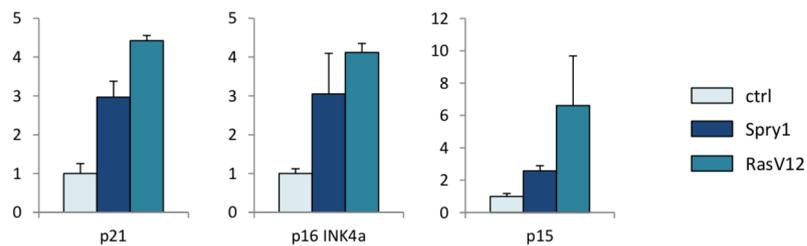
sustitución de las argininas 62 y 70 (residuos necesarios para la unión a CIN85) o la forma mutante R250D (residuo de unión a caveolina) eliminan la capacidad de Spry1 para conducir a la célula a un estado senescente. Es necesario señalar que, en el caso del doble mutante R62/70A, la transducción lentiviral de los mutantes simples fue incapaz de eliminar la capacidad de establecer senescencia, poniendo así de manifiesto la necesidad de eliminar ambos residuos para abolir tal función de Spry1. Por tanto, todos los residuos mutados mostrados son relevantes para el papel que Spry1 juega en la senescencia celular. Además, la expresión correcta de todas las construcciones ectópicas introducidas en las células fueron comprobadas mediante Western Blot (Figura 32B), asegurando así que la ausencia de inducción de senescencia por parte de las formas mutantes no se debe a un defecto en su expresión o en su estabilidad proteica en la célula.



**Figura 32. La expresión de los distintos Sprys establece senescencia en células IMR90.** Valorada mediante ensayo clonogénico (A) Beta-galactosidasa asociada a senescencia (C y E) y BrdU (D), la senescencia fue comprobada en los Sprys y en mutantes de ciertos residuos de Spry1 relevantes para su función.

## La expresión ectópica de Spry1 induce un tipo senescencia celular que carece de SASP inflamatorio

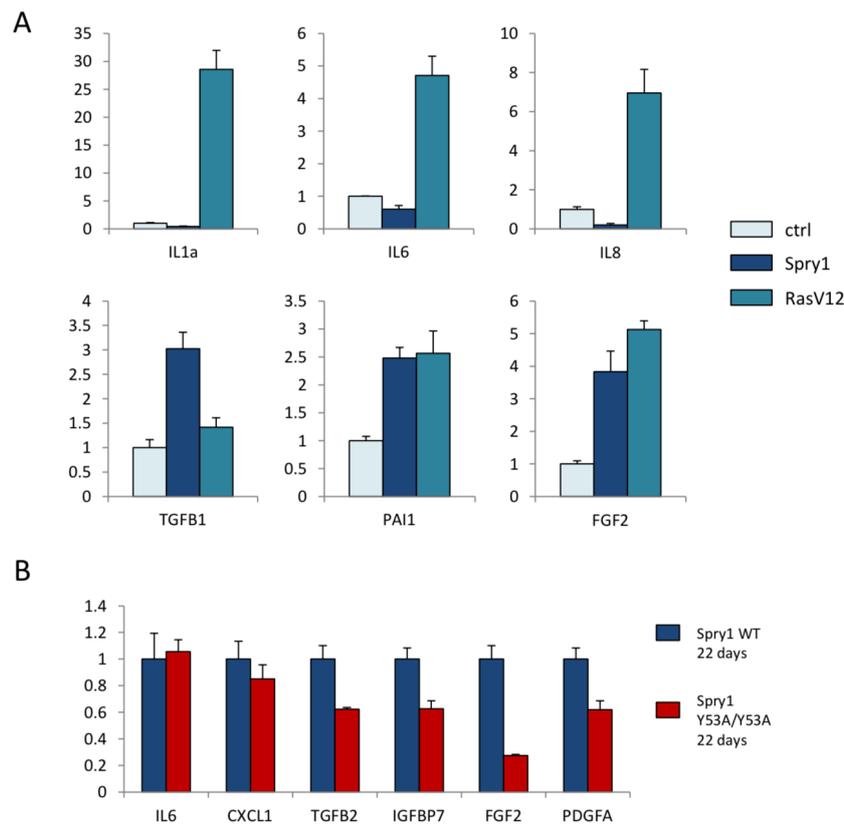
Al valorar por qPCR la expresión de los inhibidores de ciclo inducidos de manera habitual y característica por las células senescentes, p21, p16INK4a y p15, pudimos comprobar el aumento transcripcional claro, principalmente de los dos primeros, a niveles similares a los encontrados en el control positivo de las células senescentes con RasV12 (Figura 33).



**Figura 33. Expresión de los inhibidores de ciclo clásicos de senescencia medida mediante qPCR en células con sobreexpresión de Spry1 causante de senescencia celular.** Mediante RT-qPCR, los niveles de expresión de inhibidores de ciclo típicos de las células senescentes como p21, p16INK4a y p15 fueron valorados en células sobreexpresoras de Spry1 plenamente senescentes a día 21 post-infección.

Sin embargo, las células senescentes no solo poseen entre sus rasgos reconocidos la inhibición del ciclo celular debida al aumento de inhibidores de los diversos complejos Cdk-Ciclina sino que, además, son capaces de producir un amplio abanico de factores que secretan al medio para comunicarse con su entorno con fines tan diversos como escasamente escrutados (Freund, Orjalo et al. 2010). Cuando analizamos elementos reconocidos del SASP como TGFB1, PAI1 o FGF2, nos encontramos con que el establecimiento de senescencia derivado de la expresión de Spry1 incrementa los niveles de la mayoría de ellos a un nivel similar al manifestado por las células senescentes a causa de RasV12 (Figura 34A). Sin embargo, sorprendentemente, cuando analizamos la expresión de 3 de los elementos más representativos del SASP controlado por NFkB (Davalos, Coppe et al. 2010), IL1a, IL6 e IL8, advertimos cómo dichos mediadores inflamatorios se encontraban ausentes en el repertorio de miembros del SASP inducidos por la sobreexpresión de Spry1. Además, en el caso de los fibroblastos de la piel obtenidos de los ratones, observamos que la expresión de dichos factores inflamatorios

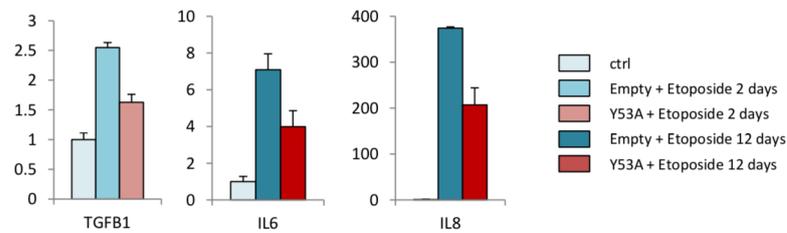
no evidencia diferencias entre genotipos (Figura 34B), en contraste con el defecto en la inducción de TGFB2, PDGFA o FGF2 mostrado por parte de las células Spry1 Y53A/Y53A, hecho que concuerda tanto con lo hallado en las células IMR90 sobreexpresoras de Spry1 como con lo descrito para la senescencia presente en la regeneración cutánea, cuya correcta articulación depende principalmente de elementos ajenos al SASP inflamatorio (Demaria, Ohtani et al. 2014).



**Figura 34.** El SASP modulado por Spry1 en IMR90 y en fibroblastos dérmicos de ratón no incluye los mediadores inflamatorios IL1a, IL6 e IL8. La expresión de distintos miembros del SASP fue valorada en IMR90 sobreexpresoras de Spry1 (A) así como en fibroblastos dérmicos de ratón (B) por RT-qPCR.

No obstante, cuando analizamos la presencia de la mutación Y53A en un modelo más canónico de senescencia como son las células IMR90 y producimos senescencia celular con etopósido, tanto el SASP restringido a la etapa inicial de la senescencia, representado por TGFB1, como el característico de la etapa final, compuesto principalmente por IL6 e IL8, se ven afectados por la mutación de la tirosina N-terminal de

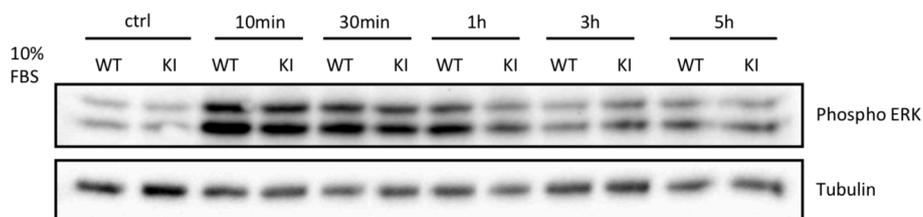
Spry1 (Figura 35). Ello indica que, en función del estímulo, que puede variar según el contexto en el que concurre la respuesta senescente, la proteína Spry1, a través de la integridad de su tirosina 53, es capaz de modular distintos tipos de SASP, reforzando un papel todavía más general de esta familia de proteínas en los distintos tipos de respuesta senescente.



**Figura 35. El SASP inicial y el SASP tardío en células IMR90 se ven afectados tras la inducción de senescencia con etopósido.** La expresión de distintos miembros del SASP fue valorada en IMR90 sobreexpresoras del alelo Y53A tratadas con etopósido durante los días señalados.

La senescencia inducida por Spry1 no es debida a la inhibición de la vía ERK y activa p38

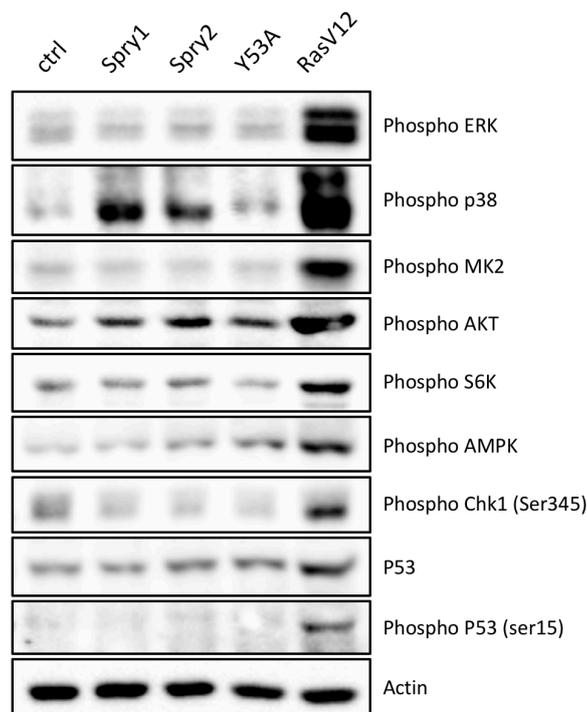
Al utilizar los fibroblastos de ratón y valorar el papel clásico de Spry como elementos de inhibición de la vía ERK tras la activación de diversos RTKs, en este caso mediante la estimulación con suero, advertimos que en ningún caso obtuvimos diferencias en experimentos de curso temporal del estímulo (Figura 36). En este caso, tras deprivar 3h con medio sin suero, valoramos el estado de activación de ERK a lo largo de los tiempos mostrados.



**Figura 36. Curso temporal de fibroblastos dérmicos de ratón en el que observamos la ausencia de diferencias en la inhibición de la vía ERK entre genotipos.** A lo largo de los tiempos señalados en el panel de Western Blot, la activación de vía ERK por estimulación con suero fue analizada agrupada en los distintos genotipos de los que provenían los fibroblastos dérmicos.

Por ello, con el fin de determinar las vías de señalización responsables de la participación de Sprouty en la senescencia, interrogamos por Western Blot en células IMR90 varias de las vías previamente descritas como esenciales para las células senescentes. Además, de nuevo, quisimos comprobar si, como en nuestros anteriores trabajos, la inducción de senescencia controlada por Spry1 no es causada por su acción clásica sobre la vía ERK. En el panel de Western Blot mostrado se puede observar cómo, a excepción de p38, ni ERK ni ninguna de las otras vías comprobadas se vio inducida por la expresión de Spry1 en IMR90 (Figura 37). Entrando en un mayor nivel de detalle, resulta relevante apuntar que dos de las vías descritas como clave para la producción del SASP inflamatorio, Akt-mTOR (Laberge, Sun et al. 2015) y la señalización de respuesta al daño al DNA (Rodier, Coppe et al. 2009), no se ven activadas por la expresión de Spry1, explicando la ausencia del SASP inflamatorio en la senescencia inducida por la sobreexpresión de este miembro de Sprouty. La vía AMPK, señalada recientemente como vector molecular de un tipo particular de senescencia causada por la disfunción mitocondrial (Wiley, Velarde et al. 2016), también carente de SASP inflamatorio, no se encuentra alterada por Spry1 en este caso, por lo que no parece ser responsable del fenotipo que observamos en nuestros experimentos. De hecho, la única vía que encontramos activada, la vía p38, ha sido reiteradamente descrita como esencial tanto para la parada de ciclo celular (Xiu, Kim et al. 2003, Passos, Nelson et al. 2010, Xu, Li et al. 2014) como para la producción de SASP inflamatorio (Freund, Patil et al. 2011). No obstante, en relación a esto último, la reducción de la activación de p38 debida a sobreexpresión de su elemento inmediatamente superior en la vía, MKK3/6, a un nivel similar al observado en células senescentes tras ser irradiadas muestra la necesidad de la comparecencia conjunta de

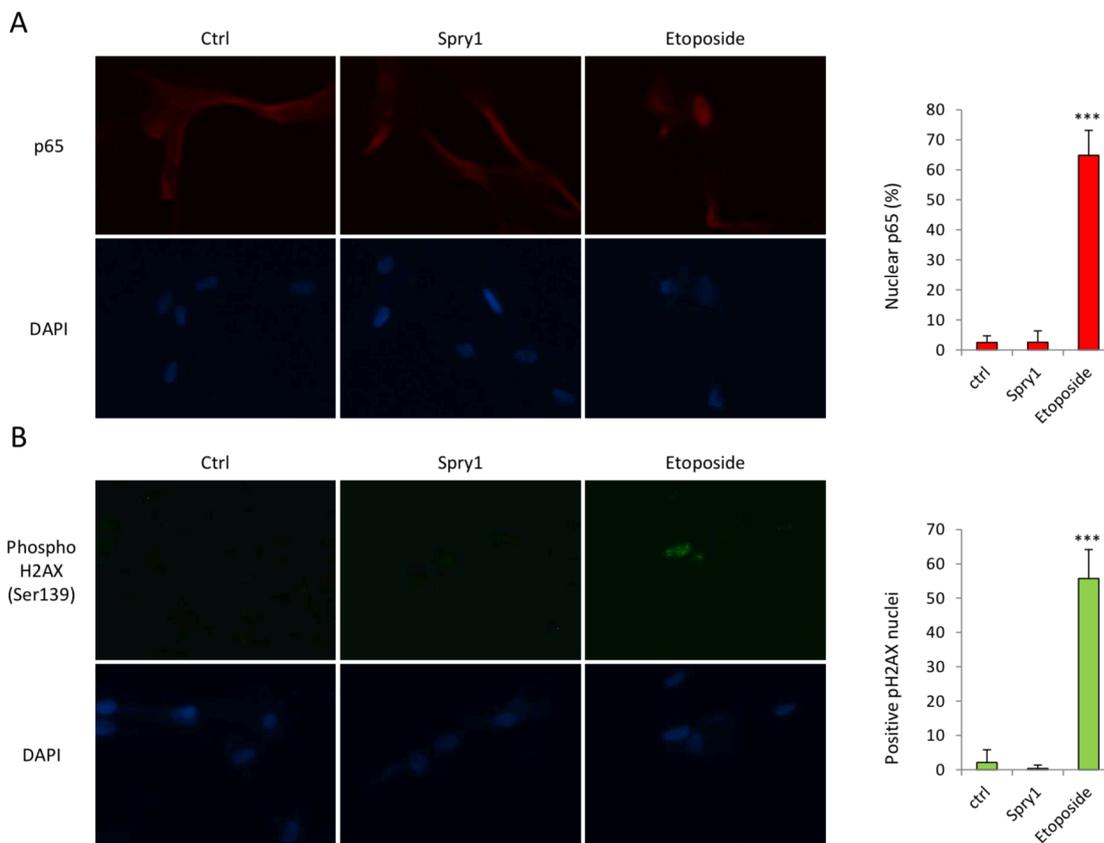
esta vía con la de respuesta a daño al DNA para la producción efectiva de IL6. Por tanto, la ausencia de SASP inflamatorio pese a la activación de p38 por Spry1 es perfectamente explicable por el motivo expuesto, dado que la vía de respuesta a daño al DNA no se encuentra activada en este particular tipo de senescencia. También resultaría llamativo el hecho de la falta de activación de una diana directa de p38, MK2, de no ser por un reciente estudio que señala la dependencia que esta proteína tiene de mTOR, 4EBP1 en concreto, para la adecuada inducción de MK2 y, en consecuencia, del SASP inflamatorio (Herranz, Gallage et al. 2015). En el panel mostrado se puede observar también el comportamiento similar de la senescencia inducida por Spry2, así como la falta de activación de la vía p38 por parte de Y53A.



**Figura 37. Screening por Western Blot de la activación de las principales vías de señalización relacionadas con la senescencia en células IMR90.** En el panel de Western Blot mostrado en la figura se puede analizar comparativamente la activación de ciertas vías en las distintas sobreexpresiones de Spry respecto de la que se da en el control positivo de senescencia por RasV12.

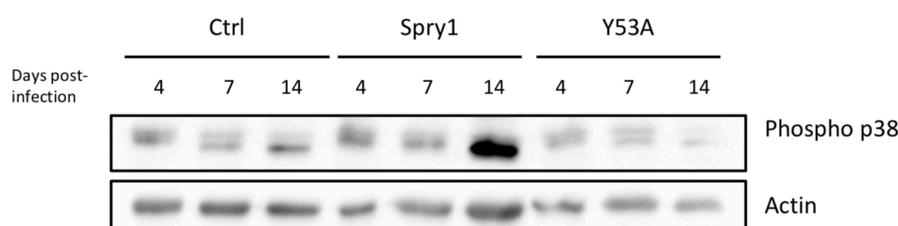
Por otro lado, también valoramos mediante inmunofluorescencia la activación tanto de la vía NFkB, a través de la presencia nuclear de su subunidad transcripcionalmente activa p65/RelA, como la fosforilación de la serina 139 de la histona H2AX, esencial para desencadenar la respuesta de daño al DNA en la célula. En el panel de imágenes de las

distintas inmunofluorescencias, p65 y phospho H2AX, podemos observar la introducción de p65/RelA en los núcleos de células senescentes por tratamiento con etopósido, mientras que aquellas que desarrollan senescencia a causa de Spry1 mantienen la localización citoplasmática mostrada por las células control (Figura 38A). En este mismo sentido, una de las señalizaciones clave para la activación de NFκB y la posterior secreción del SASP inflamatorio en senescencia, la respuesta de daño al DNA (Rodier, Coppe et al. 2009), se presenta de nuevo inactiva al no observarse foci de histona H2AX fosforilada, contrastando con lo que sucede de manera habitual en las células senescentes, en nuestro caso las tratadas con etopósido (Figura 38B), y que se ha propuesto repetidamente como refuerzo de dicha respuesta celular (Salama, Sadaie et al. 2014).



**Figura 38.** La vías de daño al DNA y NFκB, íntimamente relacionadas entre sí en senescencia, no se encuentran inducidas en la senescencia inducida por sobreexpresión de Spry1. La valoración de la activación de p65 (A) e histona H2Ax fosforilada (B) fue realizada mediante inmunofluorescencia en la senescencia inducida por Spry1. Las imágenes mostradas son representativas de 4 experimentos independientes, cuya cuantificación se halla dispuesta en los gráficos contiguos.

Cabe mencionar que la activación de p38 por la sobreexpresión de Spry1 sucede con una dinámica muy lenta, siendo percibida a día 14 post-infección (Figura 39), hecho que da una idea de que la acción de Spry1 sobre la vía p38 se trate de un proceso lento que poco tenga que ver con una activación aguda. Sin embargo, dado que la inducción de la vía p38 en células que entran en senescencia por métodos clásicos está ya presente al menos 7-8 días antes de la fase final de la senescencia, todos los análisis realizados a raíz de la activación de p38 por Spry1 están realizados a día 22 post-infección, lo que da margen a un posible establecimiento definitivo de la senescencia por Spry1.



**Figura 39.** La dinámica de activación de la vía p38 por Spry1 en IMR90 muestra como ésta se trata de una inducción lenta. El Western Blot de phospho p38 durante los días indicados en las sobreexpresiones señaladas evidencia una inducción de dicha vía lenta pero diferencial en el caso de Spry1.

## La mutación de la tirosina 53 de Spry1 entorpece la activación de p38 en distintas fases de la senescencia celular

Con el fin de comprobar si la presencia en la célula de un alelo dominante negativo de Spry1 es capaz de interferir con la activación de la vía p38 en la senescencia celular, nos servimos del análisis de la dinámica de activación de dicha vía tanto en el modelo celular de las IMR90 como en los fibroblastos dérmicos de ratón. Como otros ya habían descrito (Freund, Patil et al. 2011) y nosotros hemos confirmado, la inducción de la vía p38, crucial para la senescencia celular (Xu, Li et al. 2014), aumenta de manera progresiva a lo largo de la respuesta senescente. Por tanto, en nuestros experimentos, decidimos

valorar la capacidad de Spry1 de influir sobre la activación de p38 en ambas fases de la senescencia, la inicial y la final.

Para evaluar adecuadamente el efecto de la presencia de la proteína mutante Y53A en ambas fases de la senescencia, en este caso de la inducida por el daño al DNA que produce el etopósido, nos dispusimos a analizar la expresión de p21 en la fase inicial y p16INK4a en la final, además de, mediante Western Blot, los niveles de p38 activo, Spry2 y el tag HA como control de la presencia de la forma mutante en el experimento.

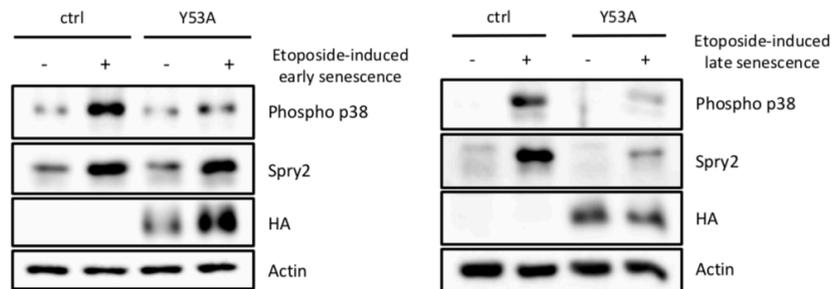
Si nos centramos en primer lugar en lo observado en la fase temprana, podemos observar cómo la presencia de la mutación Y53A es capaz de disminuir la expresión a nivel de mRNA de p21 (Figura 40B). En cuanto al Western Blot, Spry1 Y53A se encuentra correctamente expresado y es capaz de entorpecer la señalización de p38 derivada de la inducción de senescencia por etopósido, mientras que los niveles de Spry2 se inducen de manera similar pese a la presencia del alelo Y53A (Figura 40A).

Si nuestro foco se orienta hacia el estudio de lo que sucede en la etapa tardía de la senescencia, a día 12 post-tratamiento, la qPCR nos muestra una manifiesta menor expresión de p16 INK4a siempre que el alelo Y53A se encuentra presente (Figura 40B). Además, en esta fase, mediante Western Blot pudimos también advertir una inducción todavía más deficiente de la vía p38, así como diferencias en la inducción final de Spry2 (Figura 40A), siendo este último un hecho que no sucedía en el caso de la etapa inicial de la respuesta senescente.

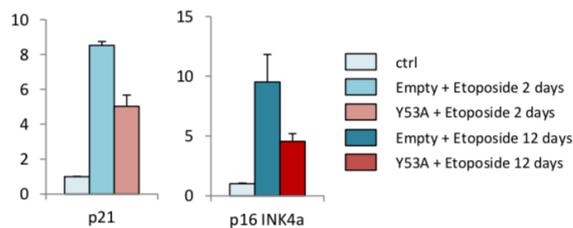
Asimismo, teniendo en cuenta los experimentos 3T3 mostrados en la figura 28, observamos que el primero de los días en que las células reducían su capacidad de división era siempre alrededor del día 14 post-extracción. Como ha sido descrito ya desde el descubrimiento de la senescencia inducida por oncogenes (Serrano, Lin et al. 1997), la parada proliferativa es un fenómeno que se da prontamente en la senescencia, en contraste, por ejemplo, con el desarrollo del SASP inflamatorio en la mayoría de modelos celulares utilizados (Salama, Sadaie et al. 2014). Por tanto, para estudiar de nuevo las características de la evasión de la senescencia producida por la presencia de la mutación Y53A, escogimos como punto inicial de la respuesta el día 14 y el día 22 como punto final. Al analizar por Western Blot la dinámica de activación de la vía p38 a través de los días 3, 14 y 22 post-extracción, advertimos cómo la presencia de la mutación interfiere con la activación de la vía p38 tanto en el día 14 como en el día 22

(Figura 40C), siendo este último punto temporal aquel en el que, de nuevo, las diferencias resultan más pronunciadas, como también sucede en las IMR90, separadas de nuevo en las dos fases, esta vez comprobadas por la expresión de p21, presente ya al inicio, y p16INK4a, restringida a la fase tardía (Stein, Drullinger et al. 1999). De nuevo, la vía ERK distó mucho de ser inhibida por la acción de Spry1 en un contexto de senescencia (Macia, Gallel et al. 2012), viéndose incluso ligeramente más activada en el punto final de las células Spry1 WT. En definitiva, existe gran coherencia entre el papel en la senescencia llevado a cabo por Spry1 en el modelo celular de las IMR90 y en el modelo de fibroblastos dérmicos de ratón en cuanto al control de la vía p38.

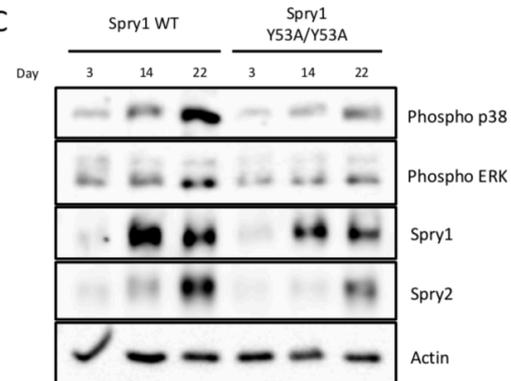
A



B



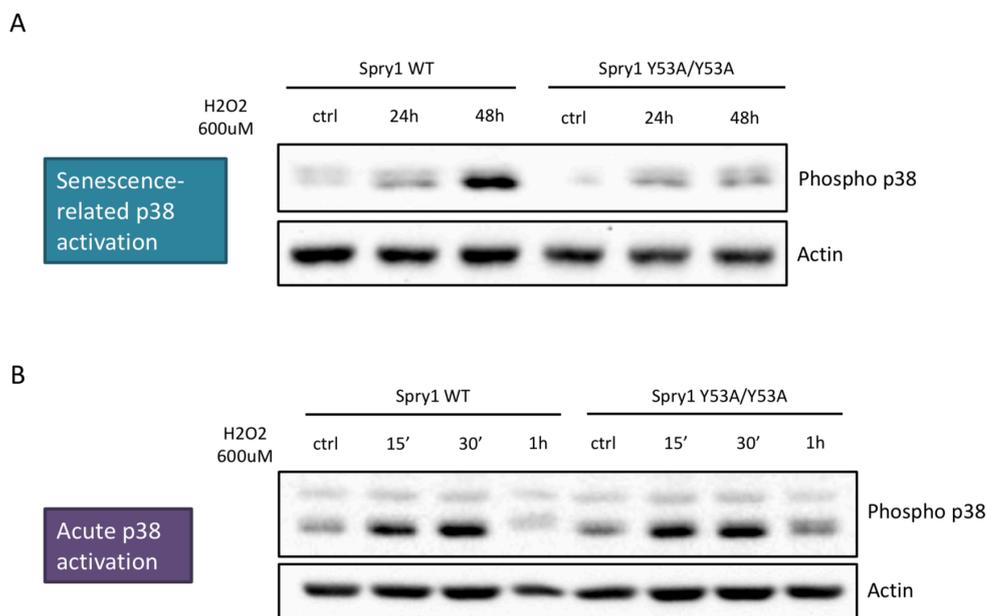
C



**Figura 40. La presencia del alelo dominante negativo Y53A entorpece la activación de la vía p38 tanto en la fase temprana como en la fase final de la senescencia celular en fibroblastos dérmicos de ratón y en fibroblastos humanos IMR90.** El defecto en la inducción de la vía p38 fue valorado mediante Western Blot en los fibroblastos dérmicos de ratón (A) y en las células IMR90 (B y C) a lo largo de las distintas etapas de la senescencia.

## La tirosina 53 de Spry1 sólo es requerida para la activación de p38 en un contexto de senescencia y no para su inducción aguda

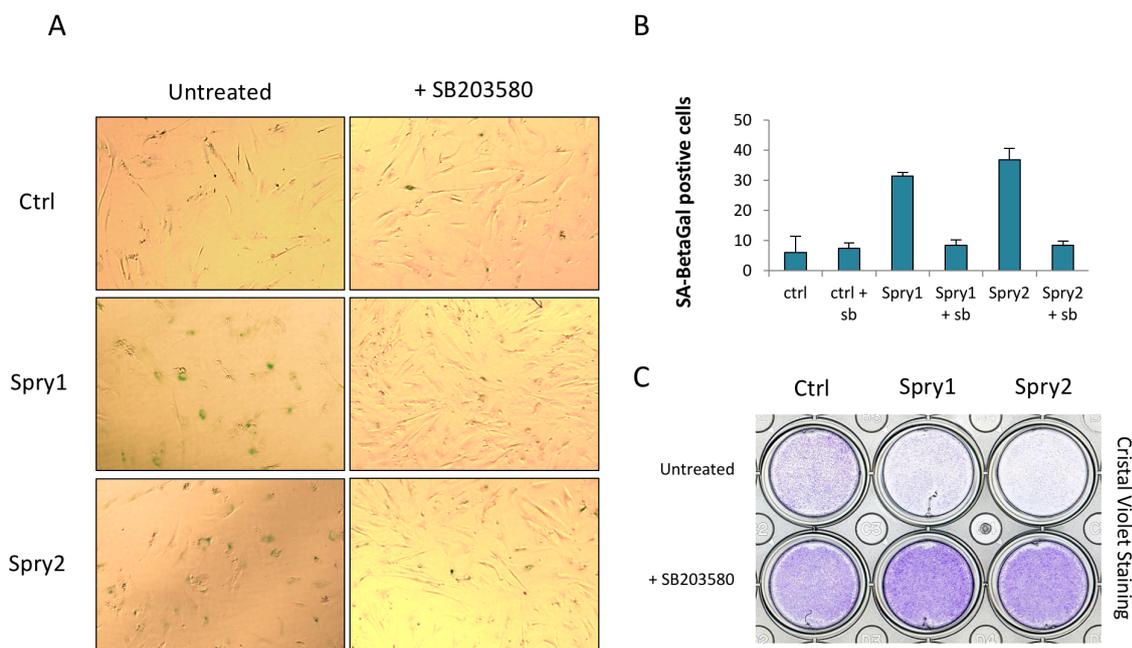
Con el fin de ahondar en el entendimiento acerca de la implicación de la tirosina 53 de Spry1 en la activación de p38, decidimos estimular los fibroblastos dérmicos poco tiempo después de extraídos con peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno es uno de los estímulos canónicos que producen en la vía p38 tanto su activación aguda (Gutierrez-Uzquiza, Arechederra et al. 2012) como su activación persistente, resultando esta última en la progresiva inducción de senescencia (Iwasa, Han et al. 2003). Mediante Western Blot pudimos confirmar que, de nuevo, la activación crónica de la vía p38 relacionada con la inducción de senescencia es defectuosa en ausencia de la tirosina 53 (Figura 41A). No obstante, sugiriendo un comportamiento diferente de Spry1 en función de las necesidades de la célula en cuanto a establecer senescencia, probablemente determinadas por el nivel y la duración del estrés, la activación aguda de p38 no se ve afectada por la mutación Y53A (Figura 41B). Por tanto, al parecer, la función de la tirosina 53 sólo es necesaria para la potenciación prolongada de la vía p38 y no para su respuesta aguda al estrés oxidativo.



**Figura 41. La tirosina 53 de Spry1 sólo es requerida para la activación crónica de p38 relacionada con la inducción de senescencia y no para su inducción aguda.** Las diferencias entre la influencia de Spry1 en la inducción de p38 de manera persistente durante tiempos prolongados, relacionada con la senescencia (A), y de manera aguda a tiempos cortos (B) fue valorada en fibroblastos dérmicos de ratón mediante Western Blot tras los estímulos indicados con peróxido de hidrógeno.

## La vía p38 es esencial para la inducción de senescencia por parte de Spry1 y Spry2 en IMR90

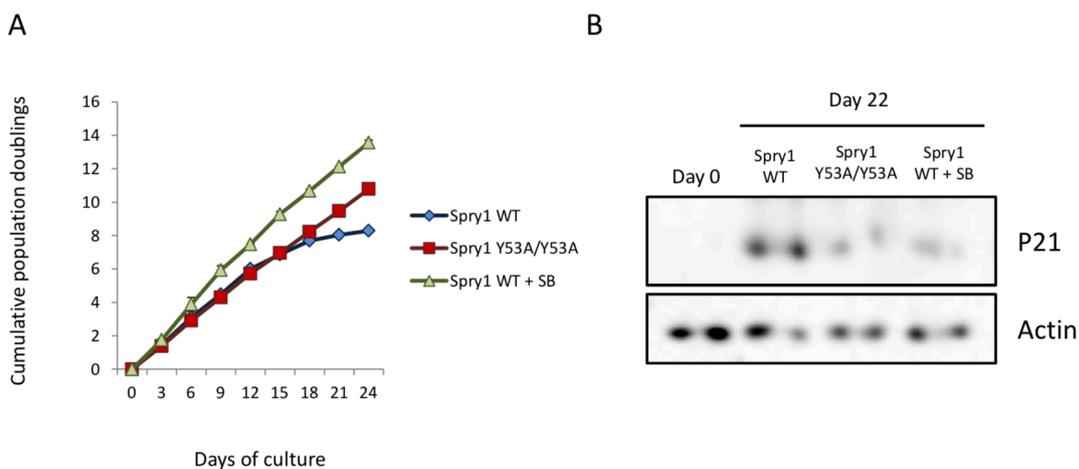
Posteriormente, decidimos comprobar si la mayor parte de la capacidad de inducción de senescencia por parte de Sprouty pasa por la potenciación de la vía p38. De nuevo, mediante la expresión ectópica de los miembros de Spry en IMR90, analizamos la capacidad de establecer senescencia a través de cada uno de los miembros de esta familia de proteínas tras la adición de uno de los más reconocidos inhibidores de la actividad de p38, SB203580. Cabe señalar que se trata de un inhibidor farmacológico que no impide la fosforilación activadora de p38, sino que interrumpe la actividad catalítica de dicha forma activada sobre sus dianas moleculares. Tanto en el caso de Spry1 como en el de Spry2, el tratamiento continuado con inhibidor de p38 es capaz de abolir la capacidad de estas dos proteínas para implementar la respuesta senescente en las células (Figuras 42A, 42B y 42C).



**Figura 42.** La actividad Beta-galactosidasa asociada a senescencia muestra cómo la vía p38 es esencial para la inducción de senescencia por la expresión de Spry1 y Spry2 en células IMR90. Para comprobar el papel primordial de la vía p38 en la senescencia inducida por Spry1 y Spry2, tratamos las células sobreexpresoras de todos los Sprys y analizamos la actividad Beta-galactosidasa asociada a la senescencia (A y B) así como la capacidad de proliferación de las distintas condiciones mediante cristal violeta (C).

La activación de la vía p38 por parte de Sprouty es esencial para la inducción de senescencia en los distintos contextos analizados previamente

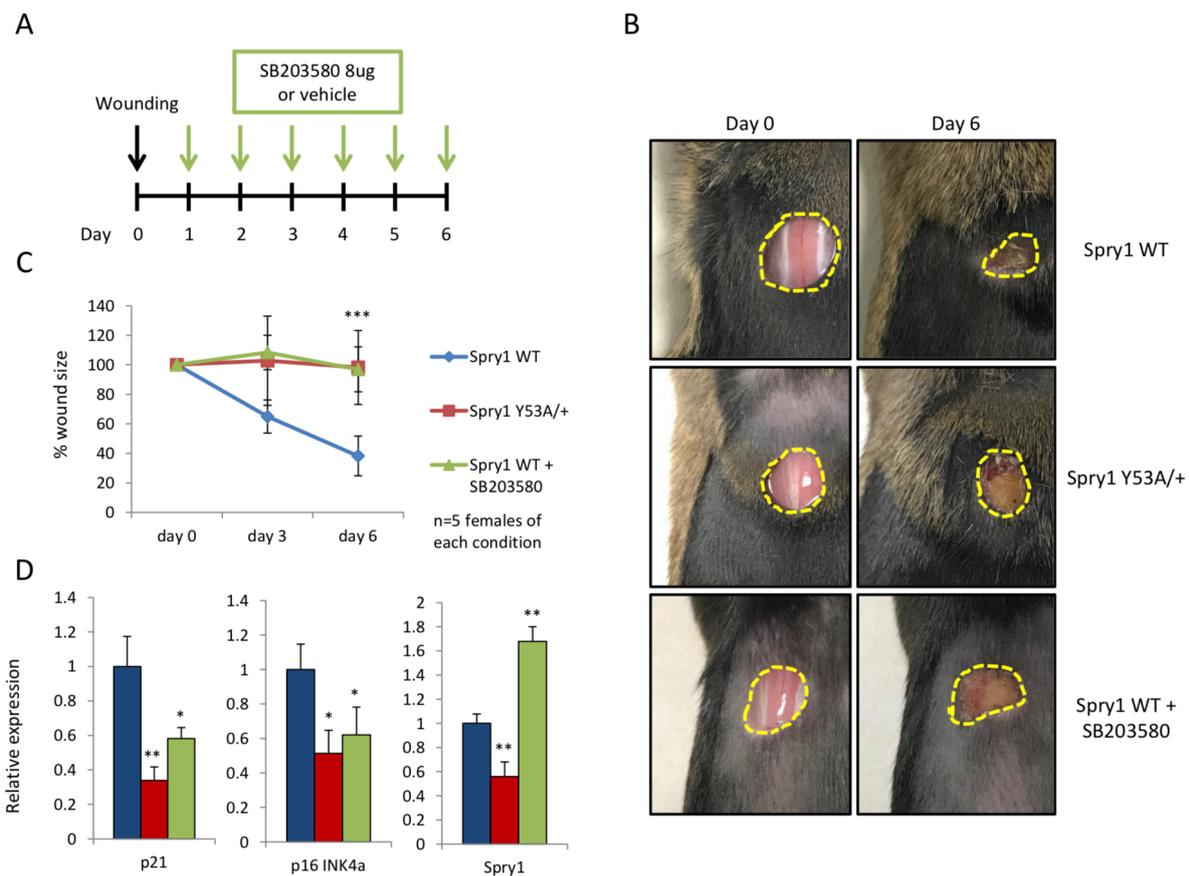
A continuación, nos dispusimos a valorar la importancia de la activación de la vía p38 en los distintos contextos de senescencia en los que habíamos desvelado la relevancia de la función de Spry. En primer lugar, la senescencia prematura exhibida por los fibroblastos de la dermis utilizados depende de la función de p38 para su correcto establecimiento. Ello fue observado cuando, al tratar estas células con el inhibidor de p38 SB203580, la parada proliferativa que se da en las células WT no se produce en presencia de dicho fármaco, a semejanza de lo que sucede en los fibroblastos Y53A/Y53A (Figura 43A). A día 22, los niveles de p21 por Western Blot se ven disminuidos cuando las células WT han sido tratadas de manera continua con inhibidor SB203580, siendo enormemente similares a los mostrados por los fibroblastos Y53A/Y53A (Figura 43B).



**Figura 43. La senescencia prematura de los fibroblastos dérmicos de ratón requiere de la activación de la vía p38.** Gráfico que muestra la proliferación de las distintas condiciones estudiadas en un esquema 3T3 (A) y la expresión a tiempo final del inhibidor de ciclo p21 (B).

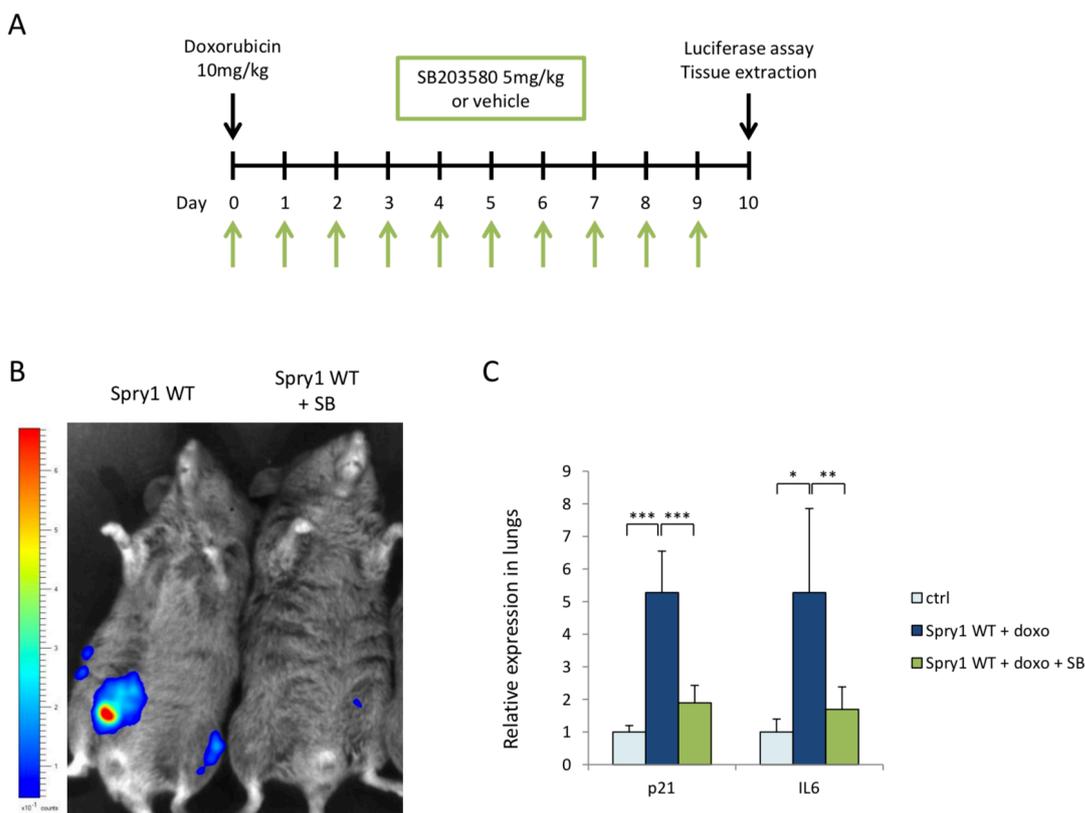
En cuanto a los ámbitos de senescencia in vivo, el primero de los procesos en que valoramos la función del eje Spry1-p38 fue la cicatrización cutánea. Para ello, decidimos realizar el mismo experimento con el que demostramos la relevancia de Spry1 en dicho proceso pero, además, comparando con ratones a los que se trata de manera tópica con 8ug de SB203580 durante 5 días seguidos a partir del día siguiente a la producción de

las heridas de 6mm (Figura 44A). El tratamiento tópico de las heridas se realizó diluyendo 8ug de SB203580 en 50 ul de acetona, método previamente probado como efectivo para la administración de este mismo fármaco en piel de ratón (Kim, Kundu et al. 2005). A día 6 post-herida, cuando las diferencias son máximas en hembras debido a la presencia de células senescentes, tanto los ratones mutantes Y53A como los tratados con inhibidor de p38 muestran una disminución marcada en el ritmo de cierre de las heridas de su zona dorsal (Figuras 44B y 44C), reforzando de nuevo la idea del requerimiento de la vía p38 para la función de Spry1 en este contexto de senescencia. Además, a día 6, la expresión de los marcadores p21 y p16INK4a se ven reducidos a causa del tratamiento con el inhibidor de p38 (Figura 44D). De manera llamativa, la adición de este inhibidor parece aumentar los niveles de expresión de Spry1 en comparación con la condición control.



**Figura 44. La senescencia en un contexto de reparación de heridas cutáneas requiere de la acción del eje Spry1-p38.** Siguiendo el esquema experimental para la adición de inhibidor SB203580 en las heridas producidas (A), comprobamos el efecto de la ablación de la vía p38 sobre la dinámica de cierre de las heridas cutáneas (B y C) así como la expresión de marcadores de senescencia por RT-qPCR a día 6 (D).

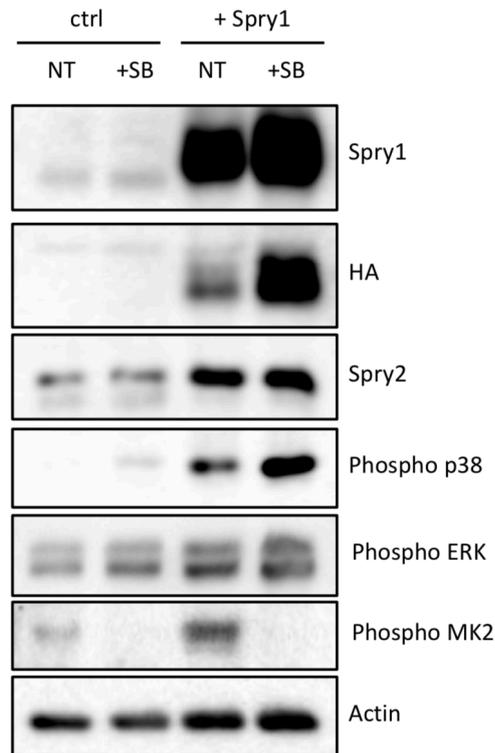
Por otra parte, decidimos valorar la inducción de senescencia por quimioterapia de manera simultánea a la interferencia con la actividad de la vía p38 mediante el uso del inhibidor SB203580. Basándonos en estudios previos (Ito, Hirao et al. 2006, Tan, Yu et al. 2014), establecimos como pertinente el tratamiento con inhibidor de p38 a 5mg/kg/día intraperitonealmente durante 9 días desde el mismo momento en que el tratamiento con doxorubicina se le administra a cada animal (Figura 45A). A día 10, fueron realizadas tanto la obtención de las imágenes de la actividad luciferasa como la extracción de RNA mensajero de los pulmones. De manera similar a lo que sucede en los ratones que albergan la mutación Y53A de Spry1, la actividad luciferasa asociada a la expresión de p16INK4a (Figura 45B) y la expresión de p21 e IL6 en pulmón (Figura 45C) se ven claramente disminuidas en presencia del tratamiento con p38, subrayando, de nuevo, el papel relevante de la activación de p38 por parte de Spry1.



**Figura 45. La senescencia inducida por tratamiento con quimioterapia necesita de la activación de p38 que lleva a cabo Spry1.** Siguiendo el esquema experimental para los distintos tratamientos llevados a cabo en estos ensayos (A), comprobamos mediante la actividad luciferasa asociada a expresión de p16INK4a (B) y mediante expresión de marcadores como p21 e IL6 en pulmón (C) el efecto de la inhibición de p38 en este contexto de senescencia.

El tratamiento con inhibidor de p38 no disminuye los niveles de Spry1, sino que además revela la contención que realiza la vía p38 sobre su inducción

Con el fin de examinar si la adición de este inhibidor no impedía la inducción de senescencia por Sprouty por un efecto directo sobre la estabilidad de la proteína en la célula y no por la acción específica sobre la función de p38, decidimos analizar por Western Blot los niveles de Spry1 así como de otras proteínas. Para ello, en primer lugar, analizamos los niveles de proteína en la sobreexpresión de Spry1 en IMR90 en presencia del inhibidor SB203580. En el mentado panel de Western Blot, analizando las condiciones de células control y células senescentes por la expresión ectópica de Spry1 con y sin el fármaco, observamos, en primer lugar, que los niveles de esta proteína en las células de esta particular senescencia, tanto la endógena como la exógena, no sólo no se ven disminuidos por la adición de inhibidor, sino que además aumentan en gran medida, sugiriendo un cierto control de los niveles de Spry1 por parte de la forma fosforilada de p38 (Figura 46). Principalmente, ello nos indica que la acción del inhibidor no afecta a la estabilidad de Spry1 y, por tanto, sus efectos sobre la senescencia inducida por su expresión ectópica no pueden ser atribuidos a un efecto indeseado sobre esta proteína. Ello también indica la participación de ambos elementos moleculares, Spry1 y p38, en la misma vía de señalización en senescencia puesto que el incremento de Spry1 al impedir la acción de p38 señala que dicha vía ejerce un control que se observa en señalización celular dentro de elementos de la misma vía en un determinado proceso (Ambrosino, Mace et al. 2003). La inhibición de p38 también afectó a sus propios niveles de fosforilación, aumentándolos en semejanza a lo sucedido con los niveles totales de Spry1. Asimismo, los niveles de Spry2 se incrementan en la senescencia producida por Spry1, hecho que insinúa la cooperación que ambas proteínas de esta familia pueden estar realizando para la activación de p38 en senescencia. Dicho fenómeno de cooperación entre los Sprys ha sido repetidamente descrito, incluso, en un contexto de senescencia celular programada ligada al desarrollo, descrita por nuestro grupo y citada en la introducción.

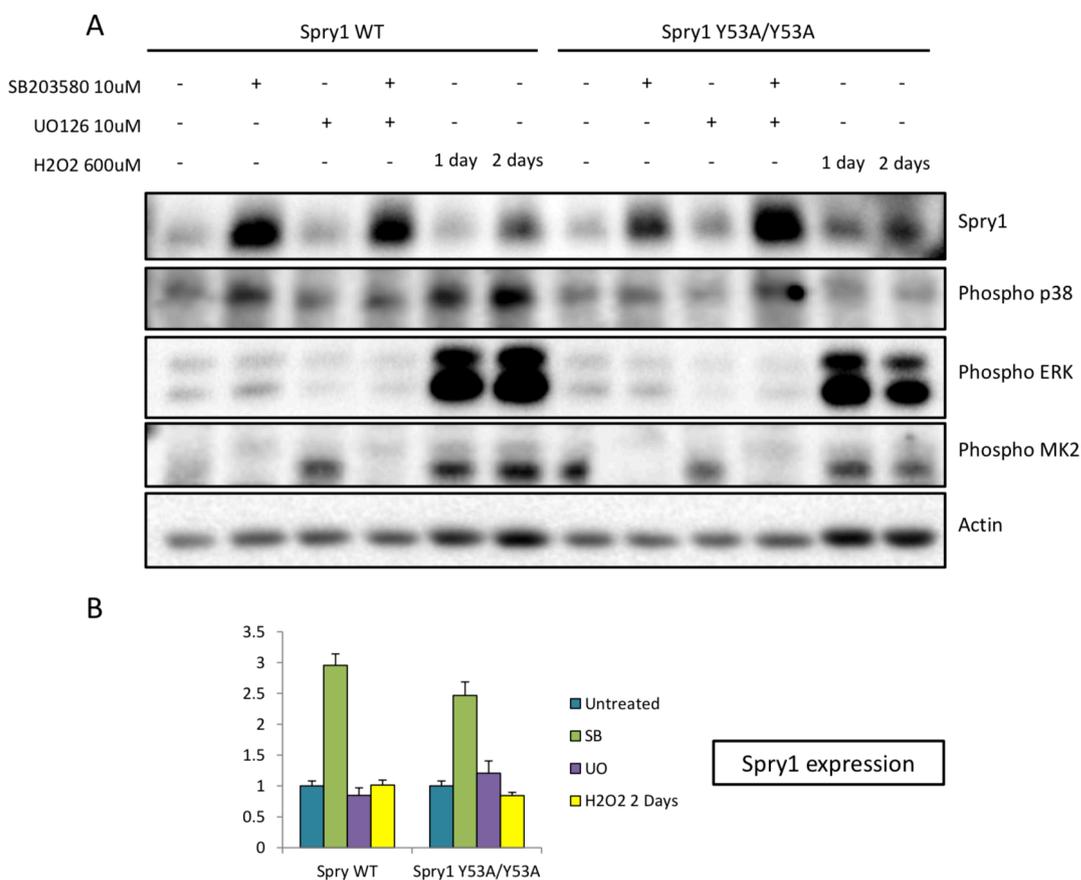


**Figura 46. La presencia del inhibidor de p38 SB203580 no solo no entorpece la presencia de Spry1 en células IMR90 sino que, además, aumenta sus niveles.** En el Western blot se muestran las distintas proteínas interrogadas en este experimento, fundamentalmente Spry1 y HA, en las condiciones señaladas.

La vía p38 reprime los niveles de Spry1 en la fase inicial de la senescencia pero no en la final

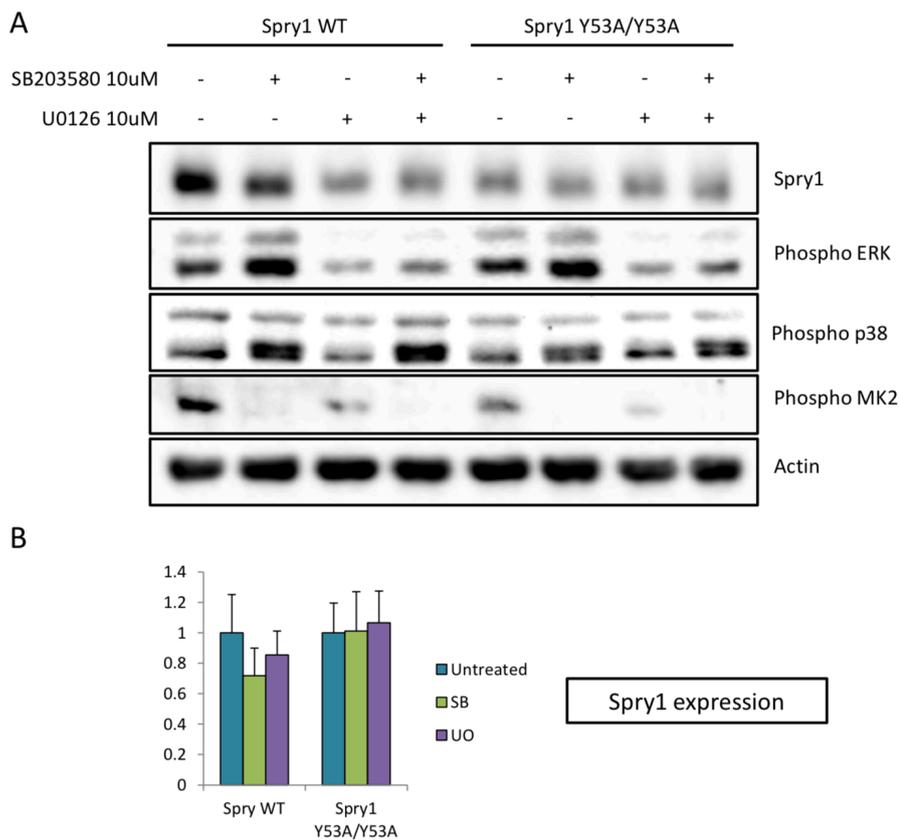
Para valorar el control inhibitorio por parte de la vía p38 sobre Spry1 en las distintas fases de la senescencia decidimos utilizar nuestro modelo de fibroblastos dérmicos de ratón. En dicho paradigma, al inhibir la vía p38 en la fase temprana de la respuesta senescente, pudimos observar por Western Blot el aumento evidente de los niveles de Spry1, con independencia de la presencia de la tirosina 53 (Figura 47A). Dicho aumento se corresponde también con un incremento en la expresión de Spry1 en presencia de SB203580 durante 3 días (Figura 47B), aunque puede no ser el único mecanismo de represión de los niveles de Spry1 por parte de p38 puesto que, además del efecto observado en la figura 46 sobre los niveles del Spry1 exógeno no sujeto a regulación transcripcional, existen proteínas que regulan directamente los niveles de los Sprys de

manera independiente al estado de la tirosina N-terminal como la ubiquitin ligasa SIAH2, dependiente de la vía p38 según ha sido descrito (Nadeau, Toher et al. 2007). Por otro lado, ni la inhibición de la vía ERK a través del tratamiento durante 3 días con U0126, ni la potenciación de esta misma vía debido al tratamiento con peróxido de hidrógeno, parecen influir transcripcionalmente sobre los niveles de Spry1 (Figuras 47A y 47B), separando de nuevo la regulación de este miembro de la familia de Spry del estado de la vía ERK en células que inician la respuesta senescente. Por tanto, resulta evidente que la célula parece compensar la activación de p38 derivada de la estabilización de Spry1 intentando contener los niveles de esta proteína, al menos en la etapa inicial de la senescencia.



**Figura 47. La célula contiene la inducción de Spry1 en la etapa inicial de la senescencia a través de la vía p38.** Dicha contención fue comprobada tras el tratamiento con los distintos fármacos o estímulos indicados mediante Western Blot (A) y RT-qPCR (B) en fibroblastos dérmicos de ratón durante la etapa temprana de la senescencia.

Al utilizar fibroblastos ya emplazados en el día 22 post-extracción, plenamente senescentes, el tratamiento durante 3 días con los citados inhibidores, concretamente el de la vía p38, produjo un efecto bien distinto. En este caso, la presencia del inhibidor SB203580 no aumenta los niveles de Spry1 en absoluto, tanto mediante la observación por Western Blot como por qPCR (Figuras 48A y 48B). Más bien, si posee algún efecto, es el contrario al manifestado en la fase inicial de la senescencia, puesto que de algún modo parece bajar los niveles de Spry1, siendo además la tirosina 53 de Spry1 relevante para este hecho. En cuanto a la vía ERK, de nuevo, no podemos observar efecto alguno sobre los niveles de Spry1, en concordancia con la independencia manifestada por esta proteína de la influencia de la vía ERK mostrada al principio de la senescencia. Por ello, podemos concluir que la represión inicial que la vía p38 ejerce sobre Spry1 no sucede en la etapa tardía de la respuesta senescente, indicando una más que posible variación en la regulación de Spry1 en ambas etapas de la senescencia.



**Figura 48. La contención de los niveles de Spry1 por parte de p38 no sucede en la etapa final de la senescencia celular.** Dicha contención, de nuevo, fue analizada tras el tratamiento con los distintos fármacos indicados mediante Western Blot (A) y RT-qPCR (B) en fibroblastos dérmicos de ratón durante la etapa final de la senescencia.

## La proteína Spry1 se acumula por estrés oxidativo y sus niveles son contenidos por la vía p38

Para corroborar los resultados obtenidos en los fibroblastos de piel y, además, encontrar los posibles estímulos que, contrarios a la acción de p38 en la senescencia inicial, promueven el aumento de los niveles de Sprouty, decidimos interrogar todos los tipos de senescencia utilizados en nuestros experimentos con las células IMR90. Dado que originariamente los componentes de la familia Spry fueron descritos como elementos de respuesta inhibitoria a la señalización ERK, pese a que ya hemos demostrado que no ejercen como represores de esta vía durante la senescencia celular, nuestro siguiente objetivo fue el de comprobar si el estímulo causante de la inducción de estas proteínas en dicho proceso es la activación de la vía ERK. Esta vía, en un marco celular de senescencia, es activada tanto por Ras (Pearson, Robinson et al. 2001) como por daño al DNA (Khalil, Morgan et al. 2011) o estrés oxidativo (Kim, Song et al. 2003). Otro dato reseñable es el que indica que la activación de la vía p38 está promovida por la inducción de ERK en OIS, pese a que el nexo molecular entre ambas señalizaciones no está todavía claro. Por tanto, determinar si los miembros de Sprouty pueden enlazar ambas vías tanto por su reconocida respuesta a la vía ERK como por la novedosa activación de la vía p38 que favorecen en senescencia, descrita por nosotros en este estudio, se convirtió en un objetivo ineludible. Para ello, utilizando los fibroblastos humanos IMR90, distintos estímulos de senescencia y diferentes inhibidores, analizamos los niveles de Spry1, Spry2, p38 fosforilado, MK2 fosforilado como control de la acción de SB203580 y ERK fosforilado, interrogados todos ellos en la fase inicial de la senescencia (día 2-3).

En el primero de los paneles, el de la senescencia inducida por RasV12, como ya habíamos demostrado en la figura 31, observamos Spry1 y Spry2 aumentados, así como ERK y p38 activados (Figura 49). El único efecto de la adición del inhibidor de la vía p38, como también habíamos observado en la figura 47, fue el aumento de los niveles de Spry1, indicando una vez más el control que p38 ejerce sobre Spry1, al menos en esta fase de la senescencia. Al añadir U0126, reconocido inhibidor de la quinasa que activa ERK, la quinasa MEK, los niveles de Spry1, Spry2, ERK y p38 disminuyen de manera llamativa en comparación con las células senescentes sin tratar, indicando que gran parte de las alarmas moleculares que accionan la senescencia por Ras pasan por la activación de ERK. Uno de los mediadores candidatos a ser responsables de la conexión entre ERK

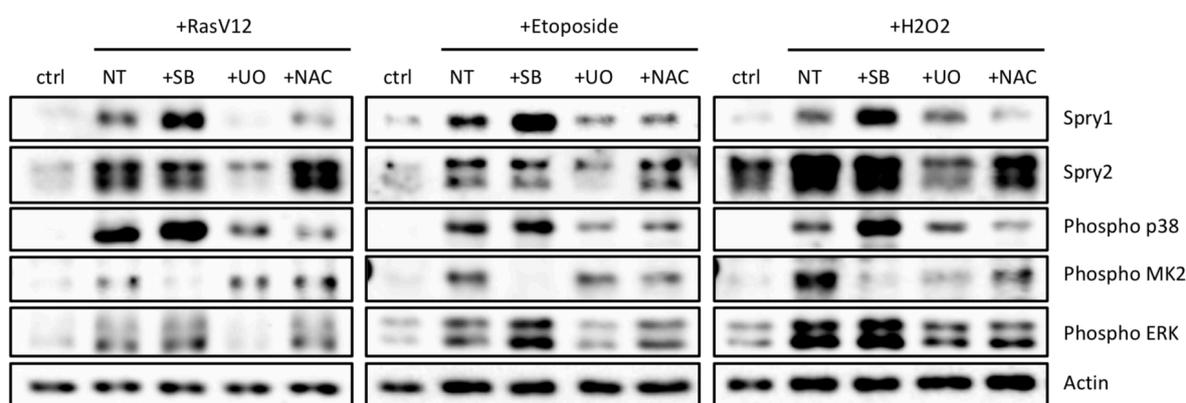
y p38 es el estrés oxidativo (Xu, Li et al. 2014). Por ello, además de los inhibidores de p38 y ERK, utilizamos la N-acetil-cisteína (NAC), molécula capaz de mitigar el estrés oxidativo de la célula. Curiosamente, al utilizar este elemento tamponador de radicales libres, los niveles de Spry1 disminuyen, mientras que los de Spry2 se mantienen intactos. También, en concordancia con lo previamente citado, los niveles de activación de p38 se reducen a causa de la disminución del estrés oxidativo producido por la activación oncogénica de Ras.

Al focalizar sobre la inducción con etopósido, advertimos que, tras el tratamiento con SB203580, los niveles de Spry1 vuelven a aumentar mientras que los de Spry2 no, reforzando lo interpretado en la OIS a este respecto (Figura 49). En cuanto a la adición de U0126, los niveles de Spry1 y Spry2 disminuyen. También, sorprendentemente, se puede observar cómo, al parecer, la activación de p38 en la senescencia inducida por daño al DNA se ve afectada por la disminución de la vía ERK con el inhibidor U0126, sugiriendo la contribución de esta vía más allá de una activación directa de p38 a causa del daño cromosómico. La vía ERK, de manera lógica, desciende a niveles del control. En el caso del NAC, de nuevo los niveles de Spry1 se ven afectados mientras que los de Spry2 se mantienen intactos.

En el caso del estímulo directo con peróxido de hidrógeno, uno de los agentes principales de estrés oxidativo en la célula, observamos que la presencia de SB203580 vuelve a aumentar los niveles de Spry1 y no de Spry2 (Figura 49). Sin embargo, en este caso, advertimos un incremento en la propia activación de p38 por el tratamiento con el inhibidor. De manera sumamente llamativa, al observar la condición en la que está presente U0126, los niveles de Spry1 no se reducen esta vez mientras que los de Spry2 lo hacen de nuevo. Ello indica que, pese a inhibición de la vía ERK, Spry1 se sigue induciendo en respuesta al estrés oxidativo, a diferencia de lo que sucede con Spry2. De hecho, un estudio señala la coordinación de centros Fe-S, moléculas capaces de sensar el estado redox celular, por parte de la estructura de Sprouty (Wu, Alexander et al. 2005), hecho que podría estar siendo aprovechado por Spry1 en este contexto celular. Además, la activación de p38, habitualmente vinculada con el estrés oxidativo, no se ve afectada en este caso por la presencia de U0126. De manera coherente, la presencia de NAC disminuye los niveles de Spry1 en este tipo de senescencia, mientras que los de Spry2, de nuevo, quedan intactos pese a que la vía ERK esté menos activada en este caso.

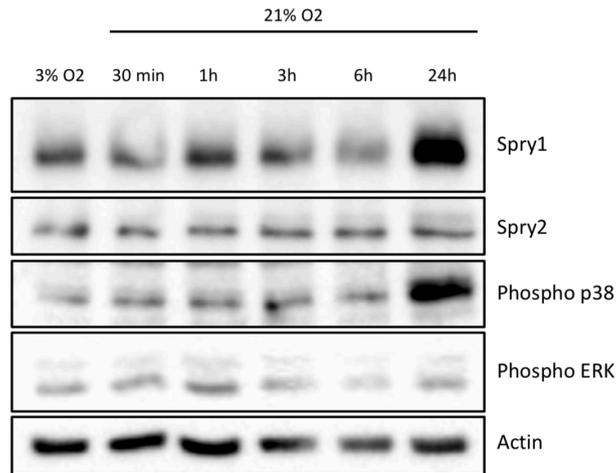
Asimismo, la vía p38 aparece menos activada por la menor presencia de radicales oxidantes en la condición con NAC.

En definitiva, una vez analizados todos los escenarios mostrados, advertimos la diferente respuesta por parte de Spry1 y Spry2 a los diferentes estímulos de senescencia. Por un lado, Spry1 parece depender principalmente de la presencia de estrés oxidativo para su inducción. Sin embargo, en el caso de Spry2, sus niveles aparentan responder al estado de la vía ERK.



**Figura 49. Spry1 se induce a causa del estrés oxidativo mientras que el incremento de Spry2 depende íntegramente de la vía ERK.** El panel de Western Blot muestra, en la etapa temprana en IMR90 de las distintas inducciones de senescencia indicadas, el efecto de cada uno de los tratamientos sobre Spry1, Spry2, p38 y ERK.

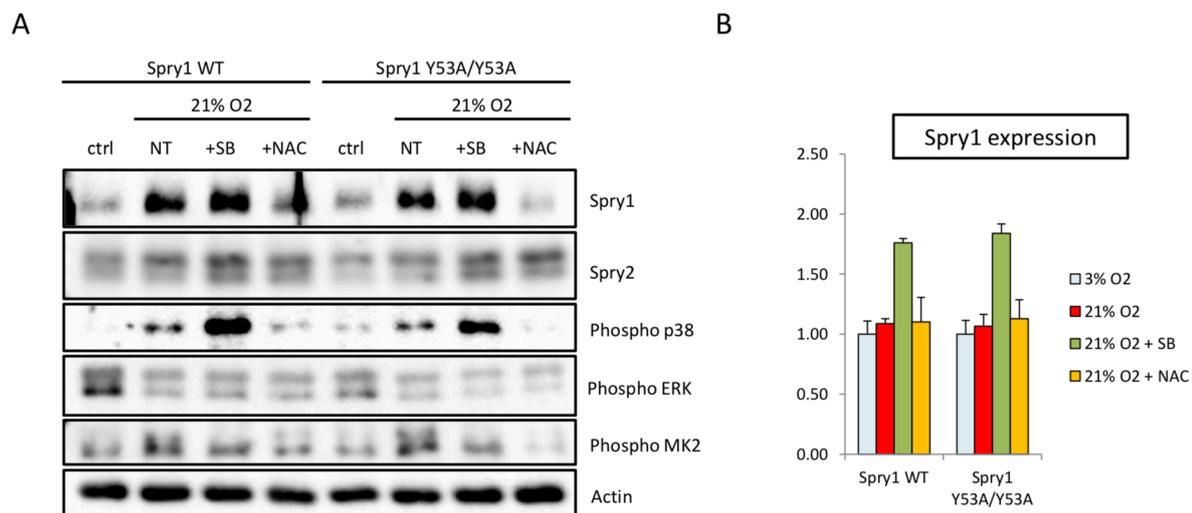
Dado que disponíamos de un fantástico modelo de senescencia por estrés oxidativo, el de los fibroblastos de ratón a 21% de oxígeno, nos dispusimos a analizar el comportamiento de Spry1 y Spry2 en este modelo. Los fibroblastos dérmicos de ratón, después de ser incubados desde su extracción en un ambiente de 3% fisiológico de oxígeno, aumentan los niveles de Spry1, pero no los de Spry2, tras un corto periodo de 24 horas en un ambiente estresante del 21% de oxígeno (Figura 50). Dicha acumulación de Spry1 sucede de manera simultánea a la activación de la vía p38, mientras que la vía ERK no se encuentra afectada en este lapso de tiempo en condiciones estresantes.



**Figura 50. La proteína Spry1 se induce de manera muy temprana a causa del exceso de estrés oxidativo causante de senescencia prematura en fibroblastos dérmicos.** Western blot en células dérmicas de ratón que muestra la inducción de Spry1, phospho p38 y phospho ERK en los distintos tiempos indicados de estímulo.

Además, la estabilización de Spry1 no depende de la presencia de la tirosina 53, al observarse el mismo efecto del ambiente estresante del 21% de oxígeno sobre células de genotipos Spry1 WT o Spry1 Y53A/Y53A (Figura 51A). De nuevo, la presencia de inhibidor SB203580 es capaz de elevar incluso más los niveles de la proteína Spry1, volviendo a mostrar el control represivo que la vía p38 ejerce sobre esta proteína en la inducción temprana a causa de un estímulo de senescencia como el cultivo al 21% de oxígeno de este tipo celular. En concordancia, en dichas condiciones de oxígeno, las atmosféricas, los fibroblastos dérmicos de ratón no aumentan los niveles de Spry1 en presencia del antioxidante N-acetilcisteína (NAC), fortaleciendo el concepto de que la inducción de Spry1 depende de manera directa de la presencia de estrés oxidativo. Para comprobar si el aumento de Spry1 en las condiciones de estrés mentadas depende de un aumento en la transcripción del RNA que lo codifica, evaluamos su expresión por RT-qPCR. De manera crucial, observamos cómo, en este punto del proceso senescente, el incremento de los niveles de proteína Spry1 no se debe a una potenciación en la expresión del propio gen, sino que depende enteramente de las posibles modificaciones estructurales que el estrés oxidativo pueda causar sobre la proteína Spry1 a través de mediadores todavía por determinar (Figura 51B). Ello pone de manifiesto el papel de sensor del nivel de estrés oxidativo que Spry1 puede estar llevando a cabo en

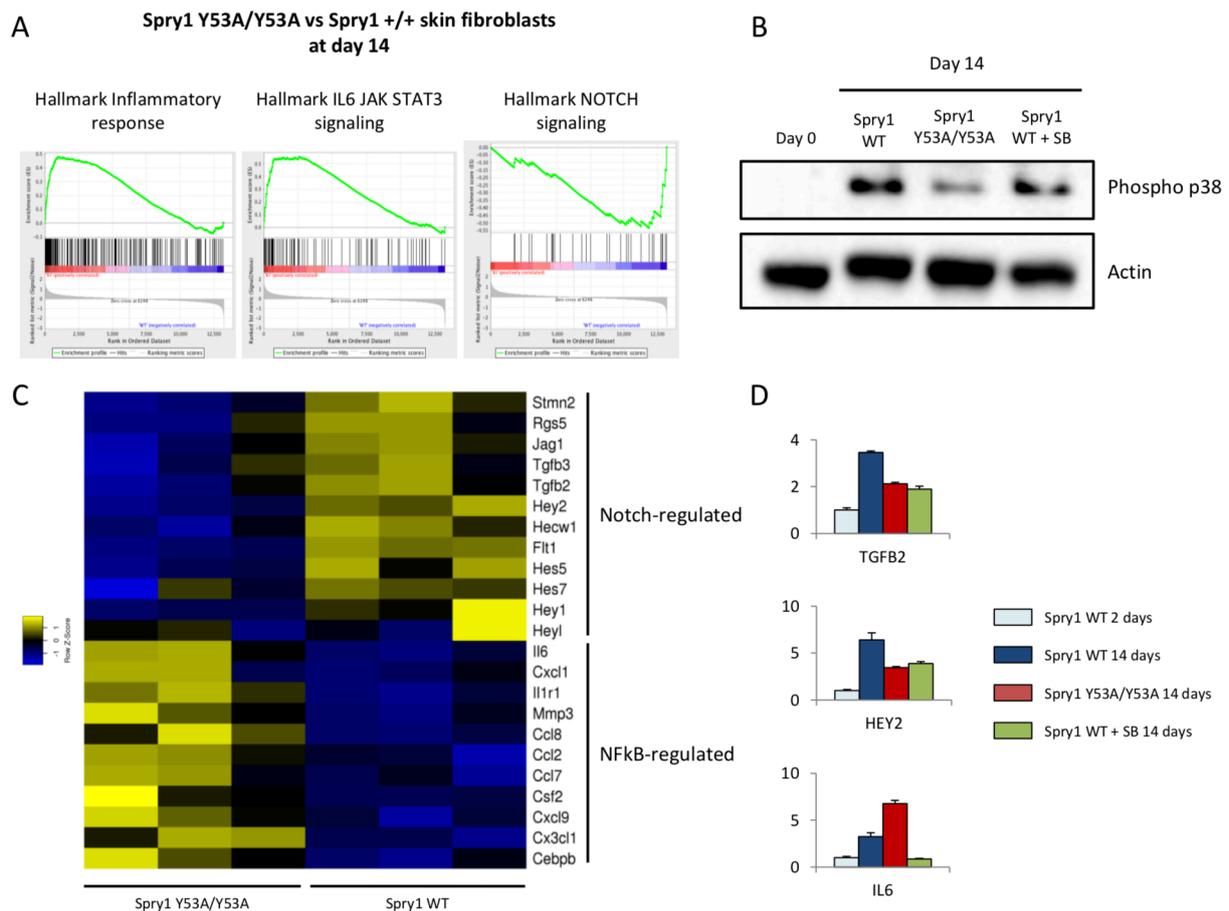
senescencia y le otorga un rol tan novedoso como relevante en este proceso. Además, y como sucede también en la figura 46, la adición de inhibidor de p38 vuelve a señalar una contención por parte de esta vía sobre el aumento de los niveles de Spry1 que, al menos en parte, se lleva a cabo a nivel transcripcional.



**Figura 50. La inducción de Spry1 a causa del estrés oxidativo no depende de la presencia de la tirosina 53.** Los niveles de las diferentes proteínas mostradas en el panel (A) fueron valorada mediante Western Blot en células WT e Y53A/Y53A tras 24h de estímulo. Por otro lado, los niveles de expresión de Spry1 fueron analizados mediante RT-qPCR (B) en las mismas condiciones mostradas en el Western Blot.

El análisis transcriptómico de fibroblastos dérmicos de ratón confirma que la activación de p38 por parte de Spry1 es necesaria para la correcta inducción de elementos de la fase inicial de la senescencia

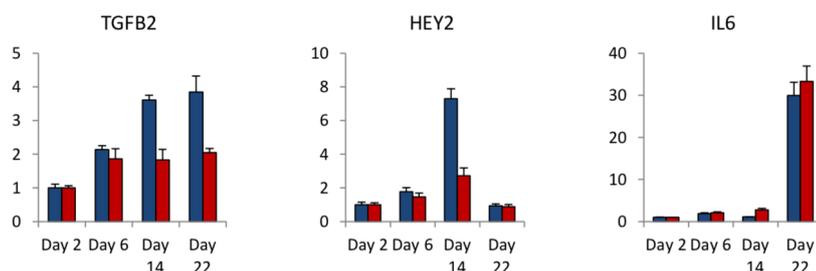
Para desentrañar las diferencias a nivel transcriptómico entre los fibroblastos del ratón mutante de la tirosina 53 y el WT, realizamos un análisis por microarray de dichas condiciones en el punto inicial de la senescencia en este modelo celular, el día 14 post-extracción. Tras introducir los valores de expresión obtenidos en la aplicación GSEA, que nos permite realizar un análisis global y preciso de los datos recogidos en este tipo de experimentos a gran escala, obtuvimos un interesante número de “hallmarks” que se correlacionan de manera significativa con las dos condiciones introducidas. De manera llamativa, dos sets de genes íntimamente relacionados entre sí, la respuesta inflamatoria y la señalización IL6-Stat3, aparecieron correlacionados de manera clara con el perfil de expresión genómica de las células Y53A/Y53A. Por otro lado, curiosamente, las células WT mostraron una asociación clara con el set de genes relacionados con la activación de la vía Notch (Figura 52A). Como ya ha sido descrito previamente, la vía Notch tiene un papel clave en la represión de la producción del SASP inflamatorio en la fase inicial de la senescencia celular (Hoare, Ito et al. 2016). Al seleccionar un amplio número de genes diana de NFkB, responsable del SASP inflamatorio, y otros tantos de Notch y comparar su expresión, observamos cómo la correlación ya mostrada por el GSEA se reproduce de manera clara, encontrándose los primeros aumentados en las células Y53A/Y53A y los segundos en las que mantienen Spry1 íntegro (Figura 52C). Dichos resultados fueron corroborados por qPCR de los genes TGFB2, HEY2 e IL6 en experimentos independientes a los que, además, se añadió la condición en la que la señalización de p38 se ve interrumpida por la adición de SB203580 (Figura 52D). Cabe resaltar que, a diferencia de los principales genes valorados en el estudio del grupo de Masashi Narita, escogimos TGFB2 y HEY2 debido a la ausencia de inducción de TGFB1 y HES1 en nuestro modelo de fibroblastos de ratón (datos no mostrados). En este caso, demostramos cómo el control efectuado por Spry1 sobre Notch y la dinámica del SASP depende de su papel como activador de p38 en senescencia, dado que la inhibición de p38 impide también la activación de Notch y la transcripción de sus genes diana en senescencia, HEY2 y TGFB2 (Figura 52B).



**Figura 52.** El análisis transcriptómico de la fase inicial de la senescencia en fibroblastos dérmicos de ratón revela que la inducción de p38 por parte de Spry1 es necesaria para la coordinación de los distintos SASPs llevada a cabo por Notch. El análisis transcriptómico fue realizado mediante la introducción de los datos del microarray en la aplicación Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) en fibroblastos dérmicos de ratón situados a día 14 post-extracción (A). En dicho momento de la respuesta senescente, la activación de p38 se muestra por Western Blot (B). De los sets escogidos, se realizó un heatmap (C) con aquellos genes implicados en las dos vías contrapuestas en los fibroblastos dérmicos a día 14 y, el efecto de Spry1 sobre la vía p38 en la expresión de los principales elementos de esas vías, confirmado mediante RT-qPCR (D).

Mediante RT-qPCR, comprobamos también la dinámica de expresión de estos genes interrogados a lo largo de diversos puntos temporales en este modelo celular concreto. Como se puede observar, en los fibroblastos dérmicos la expresión de TGFB2 comienza siendo similar entre WT e Y53A/Y53A en los días 2 y 6. Al inicio de la senescencia en el día 14, la expresión de TGFB2 es claramente mayor en las células WT de Spry1, coincidiendo con el pico de expresión que observamos en HEY2, de manera similar a lo que ocurre en el caso de las IMR90 en esta etapa inicial (Figura 53). Sin embargo, la expresión de TGFB2 se mantiene aumentada en las células WT incluso al final de la

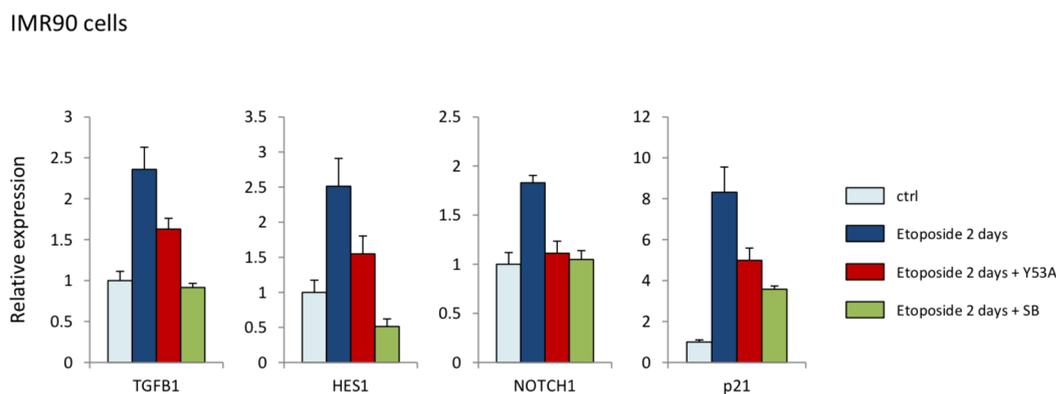
senescencia, a diferencia de lo que sucede tras la inducción de ésta con ciertos estresores en IMR90. En el caso de IL6, pudimos observar cómo a día 6 hay un incremento muy leve de la expresión tanto en células WT como Y53A/Y53A. Dicho incremento se ve disminuido a día 14 sólo en el caso de las células Spry1 WT, coincidiendo también con el pico de expresión de HEY2 que sólo se da en esta condición. A punto final, la expresión de la IL6 en ambos genotipos se ve sustancialmente incrementada y no muestra diferencias entre ambas condiciones, como ya habíamos descrito en experimentos mostrados con anterioridad.



**Figura 53. Dinámica de expresión de los principales elementos coordinados por Spry1-p38 en el modelo celular de senescencia de los fibroblastos dérmicos de ratón.** Mediante RT-qPCR, la dinámica de expresión de los genes TGFB2, HEY2 e IL6 fue comprobada en este modelo celular concreto.

Por otro lado, quisimos comprobar si la acción de Spry1 sobre p38 y de este último sobre TGFbeta y Notch observada en los fibroblastos dérmicos de ratón era extrapolable a las IMR90. Para ello, analizando la expresión de TGFB1 y HES1 en la etapa inicial de la senescencia inducida por daño al DNA con etopósido, observamos que tanto la introducción de un alelo Y53A como el tratamiento con inhibidor de p38 producen una disminución en la expresión de estos genes, en concordancia con lo ocurrido en nuestro modelo de fibroblastos de ratón (Figura 54). Ello se acompaña, además, de efectos sobre la transcripción de otros genes presentes en la etapa inicial de la senescencia como, por ejemplo, p21, que guarda una estrecha relación no sólo con p53 sino también con TGFbeta para su expresión en ciertos contextos de senescencia (Aarts, Georgilis et al. 2017). El efecto del alelo mutado de Spry1 tanto sobre la expresión de p21 como de TGFB1 ya había sido mentado pero sólo como un simple reflejo de la interferencia de la forma mutante sobre la expresión de marcadores iniciales de senescencia. Sin embargo, en este experimento, pudimos ver cómo dicha expresión disminuida de estos marcadores

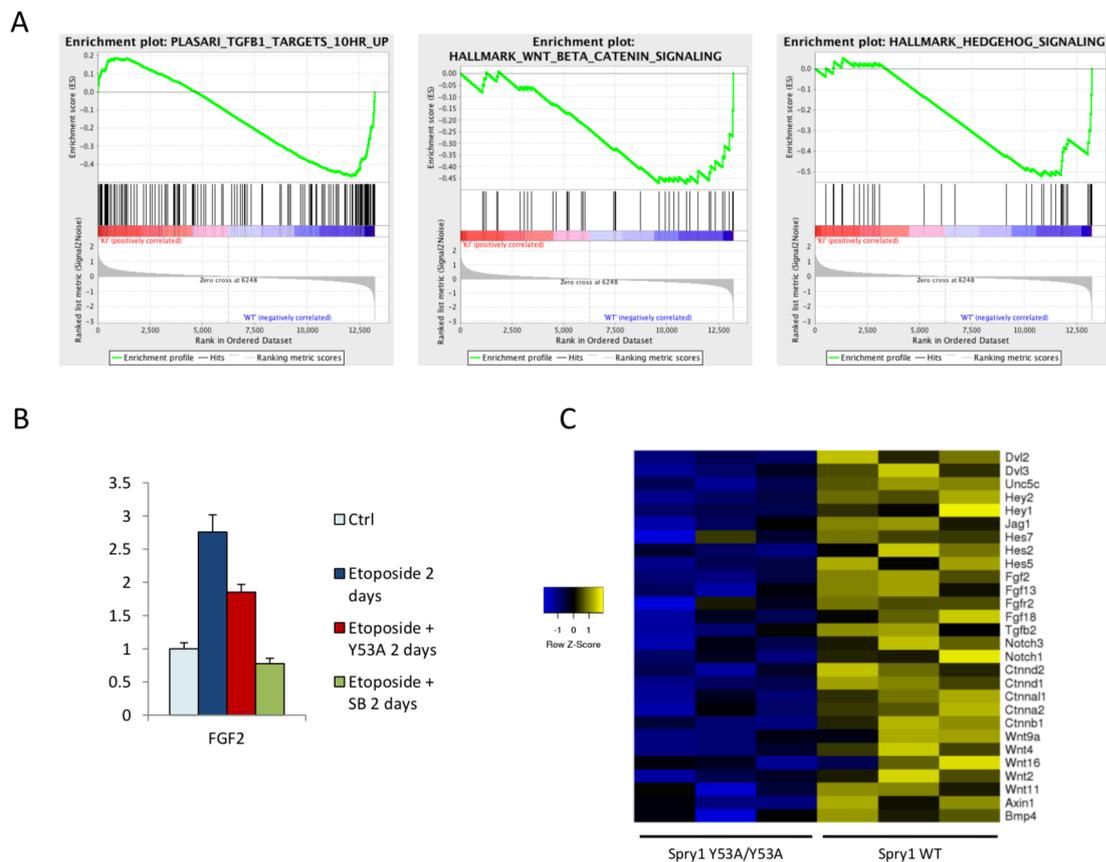
encaja con la deficiente inducción de la vía p38 que conlleva la presencia del mutante Y53A. Por otro lado, aunque se halle escasamente descrito en la literatura, la expresión de Notch1 depende de p53 en un modelo de senescencia como los queratinocitos (Lefort, Mandinova et al. 2007). Además, en nuestros experimentos, como también sucede con el reconocido target de p53, p21, la interrupción de la vía p38 a través de la mutación de Spry1 o del tratamiento con SB reduce el aumento de expresión de Notch1 que se produce en la fase temprana de la senescencia en IMR90. Si en dicho periodo inicial de la respuesta senescente la activación coordinada de p53 y p38 puede conllevar un aumento en la expresión de Notch1, éste puede acumularse en la membrana y desencadenar la inhibición de C/EBPbeta de la que ya ha sido demostrado como responsable en senescencia (Hoare, Ito et al. 2016), produciendo la represión inicial del SASP inflamatorio y explicando, al menos en parte, el mecanismo por el cual las células senescentes acumulan inicialmente Notch1 en sus membranas, todavía por determinar.



**Figura 54.** La activación deficiente de p38 en la etapa inicial de la senescencia en células con presencia del alelo Y53A también impide la inducción adecuada de Notch-TGFbeta en IMR90. La expresión de los genes TGFB1, HES1 y p21 fue comprobada en este modelo celular concreto en la etapa inicial de la senescencia causada por Etopósido en IMR90, es decir, a día 2 post-estímulo.

La fase inicial de la respuesta senescente dependiente de la activación de Spry1-p38 guarda grandes similitudes con la senescencia programada en el desarrollo

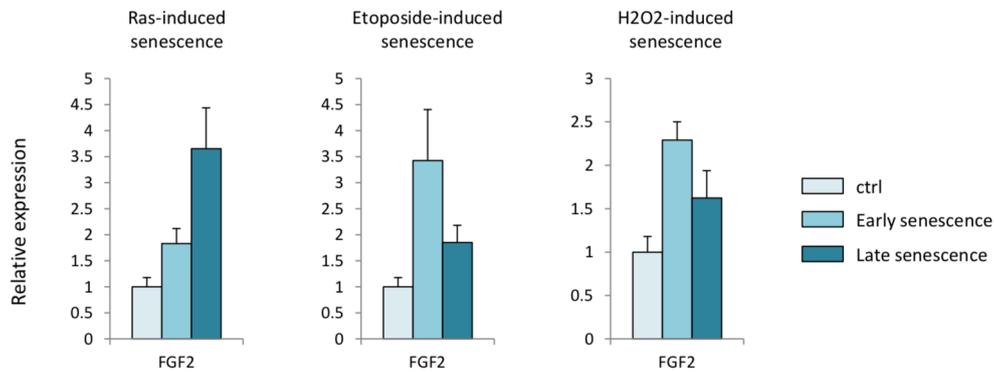
El análisis transcriptómico de los fibroblastos a día 14 también nos ofreció algunos otros datos interesantes. Además de al eje Notch-TGFbeta, la activación deficiente de p38 causada por la mutación Y53A parece afectar a la expresión de genes relacionados con otras vías como Hedgehog o Wnt (Figura 55A). Curiosamente, las vías mentadas han sido recientemente identificadas como mediadores clave de la senescencia programada que se da en procesos de desarrollo embrionario (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013, Storer, Mas et al. 2013). Además, en nuestro grupo, hemos desvelado el papel clave de la tirosina 53 de Spry1 en la senescencia programada que tiene lugar en el sistema genitourinario. FGF2, íntimamente relacionado tanto con el SASP (Coppe, Desprez et al. 2010) como con TGFbeta (Chen, Qin et al. 2012), Hedgehog (Lavine, White et al. 2006) o Wnt (ten Berge, Brugmann et al. 2008), es uno de los genes del microarray más diferencialmente aumentados en las células Spry1 WT. Incluso en fibroblastos IMR90 la inducción de FGF2 se ve entorpecida por la interrupción de la vía p38 bien sea a través de la introducción de un alelo Y53A o mediante la adición de inhibidor SB203580 (Figura 55B). Al agrupar gran parte de los genes que son dianas comunes de las vías mentadas, TGFbeta, Wnt y Hedgehog, en un heatmap de los valores de expresión obtenidos en el microarray (Figura 55C), pudimos observar la clara correlación de la inducción de dichos genes con el genotipo Spry1 WT.



**Figura 55. Vías de senescencia asociadas al desarrollo y a la fase inicial de senescencia como TGFbeta, Wnt o Shh se encuentran afectadas por la presencia de la mutación Y53A.** Los datos del microarray de fibroblastos dérmicos a día 14 fueron analizados a través de GSEA (A), obteniendo la correlación del genotipo Spry1 WT con los gene sets mostrados en la figura. La expresión del principal elemento de dichos gene sets, FGF2, fue comprobada también mediante RT-qPCR en células IMR90 (B). Además, realizamos un heatmap que muestra los principales elementos de los gene sets expuestos en los dos genotipos incluidos en el microarray (C).

Además, posteriormente comprobamos que FGF2 aumenta su expresión en IMR90 tras todos los estímulos de senescencia que hemos utilizado en este estudio ya en la fase temprana, indicando que también se trata de un marcador presente ya etapa inicial de la respuesta senescente in vitro (Figura 56). Todo ello puede implicar que, más allá de la inducción de Notch-TGFbeta, la activación de p38 por Spry1 puede influir sobre otras vías de señalización como Hedgehog o Wnt en la etapa inicial de la senescencia, coincidiendo ésta en gran medida con la que se da en el desarrollo embrionario a nivel de señalización. Por tanto, dado que el eje Spry1-p38 emerge como sustancial para las vías de señalización desveladas en la etapa temprana de la respuesta senescente in vitro, y éstas son clave para procesos singulares de senescencia como la programada

embrionaria puede que, de manera preliminar, nos encontremos ante una explicación del porqué de la relevancia de Spry1 para las estructuras senescentes presentes en el desarrollo genitourinario.



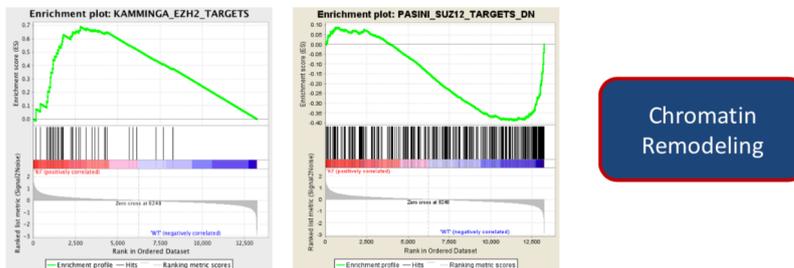
**Figura 56.** La expresión de FGF2 se incrementa ya en la etapa inicial de la respuesta senescente en células IMR90. La dinámica de expresión de FGF2 fue comprobada, en fibroblastos IMR90, mediante RT-qPCR de las distintas fases de la senescencia causada por los inductores indicados.

La mutación Y53A presente en la etapa inicial de la senescencia en fibroblastos dérmicos es capaz de alterar otros aspectos asociados a las células senescentes

Aunque menos explorados, otros de los aspectos que podrían verse alterados por la interrupción del eje Spry1-p38 (Figura 57) podrían ser tanto aspectos relacionados con la remodelación de la cromatina asociada, por ejemplo, a la expresión de los inhibidores de ciclo reprimida por los grupos Polycomb (Vire, Brenner et al. 2006, Bracken, Kleine-Kohlbrecher et al. 2007), en nuestro caso representados por EZH2 y SUZ12, como aspectos que conciernen a la compleja modulación del metabolismo llevada a cabo en las células senescentes (Wiley and Campisi 2016).

A

Spry1 Y53A/Y53A vs Spry1 +/+ skin fibroblasts at day 14



B

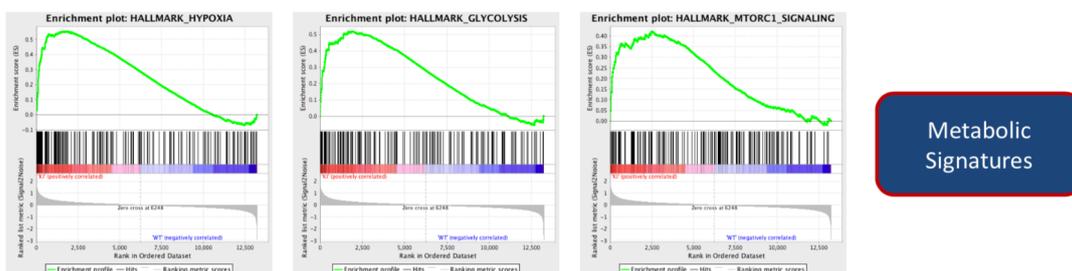


Figura 57. Aspectos relacionados con la senescencia encontrados por el análisis con GSEA de los datos obtenidos en el microarray de los fibroblastos dérmicos en la etapa inicial de la senescencia. Algunos de los datos menos explorados en nuestro experimento muestran asociación de los genotipos analizados con rasgos de las células senescentes como el control de la remodelación de la cromatina (A) o la modulación del metabolismo celular (B).

La activación del eje Spry1-p38 en respuesta a estímulos estresores favorece la inducción de senescencia frente a la de apoptosis

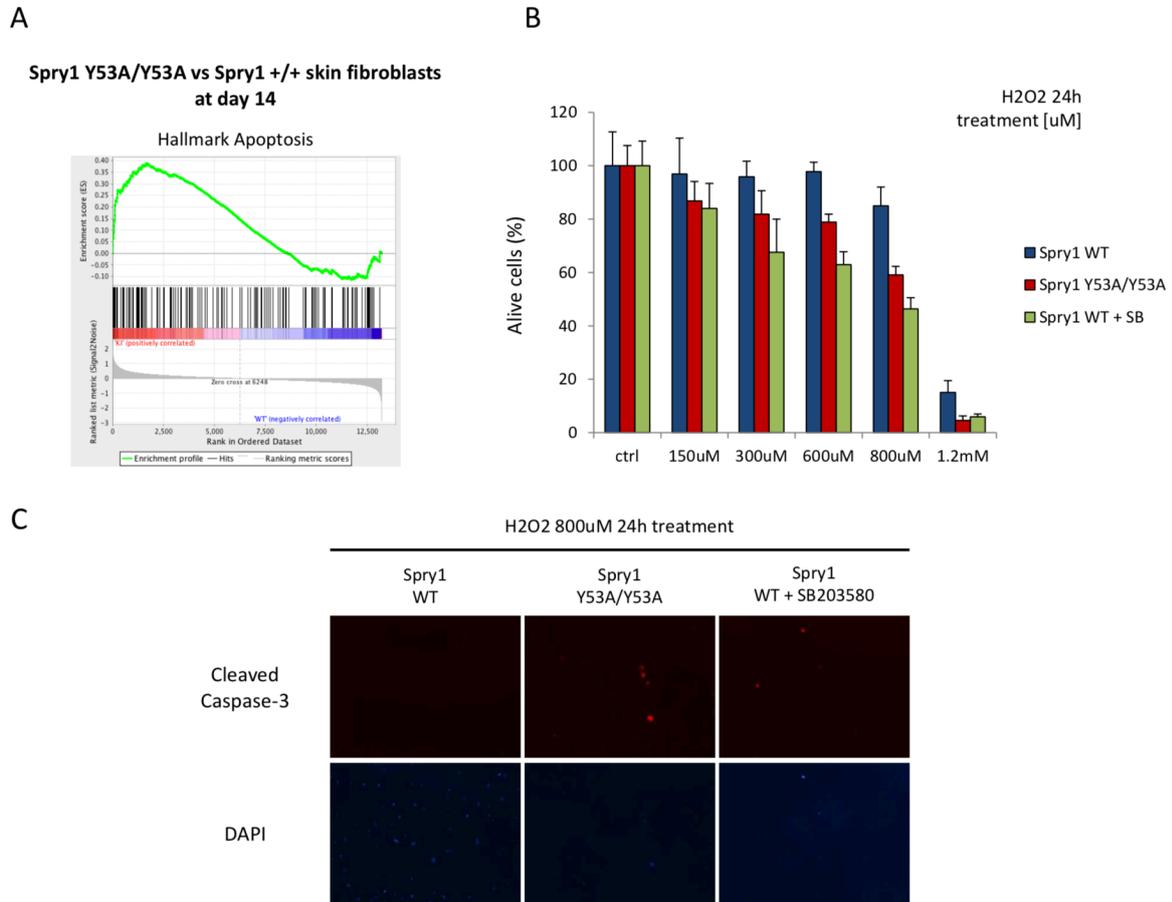
Las células han de enfrentarse, a lo largo del periodo de su existencia, a un amplio abanico de eventos moleculares inductores de estrés. Dos de los principales elementos de esta nutrida lista son el daño en el DNA y el estrés oxidativo, encontrándose además íntimamente relacionados entre sí. Existen desde tiempo atrás estudios que indican cómo dichos estresores son capaces de desencadenar las dos respuestas que la célula ofrece de manera predominante ante la producción de daño: la senescencia y la apoptosis (Childs, Baker et al. 2014, Munoz-Espin and Serrano 2014). No obstante, la primera de las respuestas nombradas, la senescencia, es inducida sólo a partir de cierto nivel de

daño capaz de comprometer el estado celular (Chen, Liu et al. 2000, Debacq-Chainiaux, Borlon et al. 2005, Probin, Wang et al. 2006, Krenning, Feringa et al. 2014) siempre que sea sin alcanzar un extremo lesivo que conduzca a la muerte apoptótica (Childs, Baker et al. 2014). En realidad, mientras que los mecanismos de muerte programada se encuentran inducidos en ambos tipos de respuesta al estrés, sólo la célula senescente activa rutas moleculares de supervivencia que compensan dicha orientación hacia el suicidio celular (Yosef, Pilpel et al. 2017). Además, en estos últimos años el estudio de dicho equilibrio celular entre la apoptosis y la senescencia se halla ciertamente en boga, puesto que posibilita la eliminación de las células senescentes mediante el fomento de su entrada en apoptosis a través de la interrupción de las vías de supervivencia (Chang, Wang et al. 2016, Yosef, Pilpel et al. 2016, Demaria, O'Leary et al. 2017).

Aparte de todos los gene sets previamente mostrados asociados con uno de los genotipos, Spry1 WT o Spry1 Y53A/Y53A, en el estudio transcriptómico de los fibroblastos dérmicos de ratón con GSEA, uno de los todavía no mencionados es el Hallmark Apoptosis, significativamente asociado con las células Spry1 Y53A/Y53A a día 14 post-extracción (Figura 58A). Además, durante la realización de los experimentos 3T3 con dichas células, tuvimos la sensación de una mayor proporción de células muertas en los cultivos obtenidos del ratón mutante Y53A respecto al WT. Teniendo en cuenta lo brevemente introducido en el anterior párrafo y extensamente desarrollado en la introducción, nos propusimos valorar si, como ya ha sido previamente demostrado (Yosef, Pilpel et al. 2017), el defecto en la inducción de la respuesta senescente manifestado en distintos contextos, en nuestro caso en presencia del alelo mutante Y53A, disminuye el umbral de estrés a partir del que comparece la muerte apoptótica.

En primer lugar, usando el mismo modelo celular en el que realizamos el análisis transcriptómico, decidimos establecer un rango de dosis de peróxido de hidrógeno estimulando células cultivadas a 3% de oxígeno para evitar la influencia de las condiciones estresantes producidas por la concentración de oxígeno atmosférico (21%). Tras 24 horas de estímulo, pudimos observar cómo, de manera clara, la proporción de células que permanecían vivas tras la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 800uM era superior en la condición Spry1 WT que en las Spry1 Y53A/Y53A o en las Spry1 WT tratadas con inhibidor de la vía p38 (Figura 58B). Además, al realizar sobre dichos fibroblastos la tinción por inmunofluorescencia de la caspasa 3 activada, uno de los principales

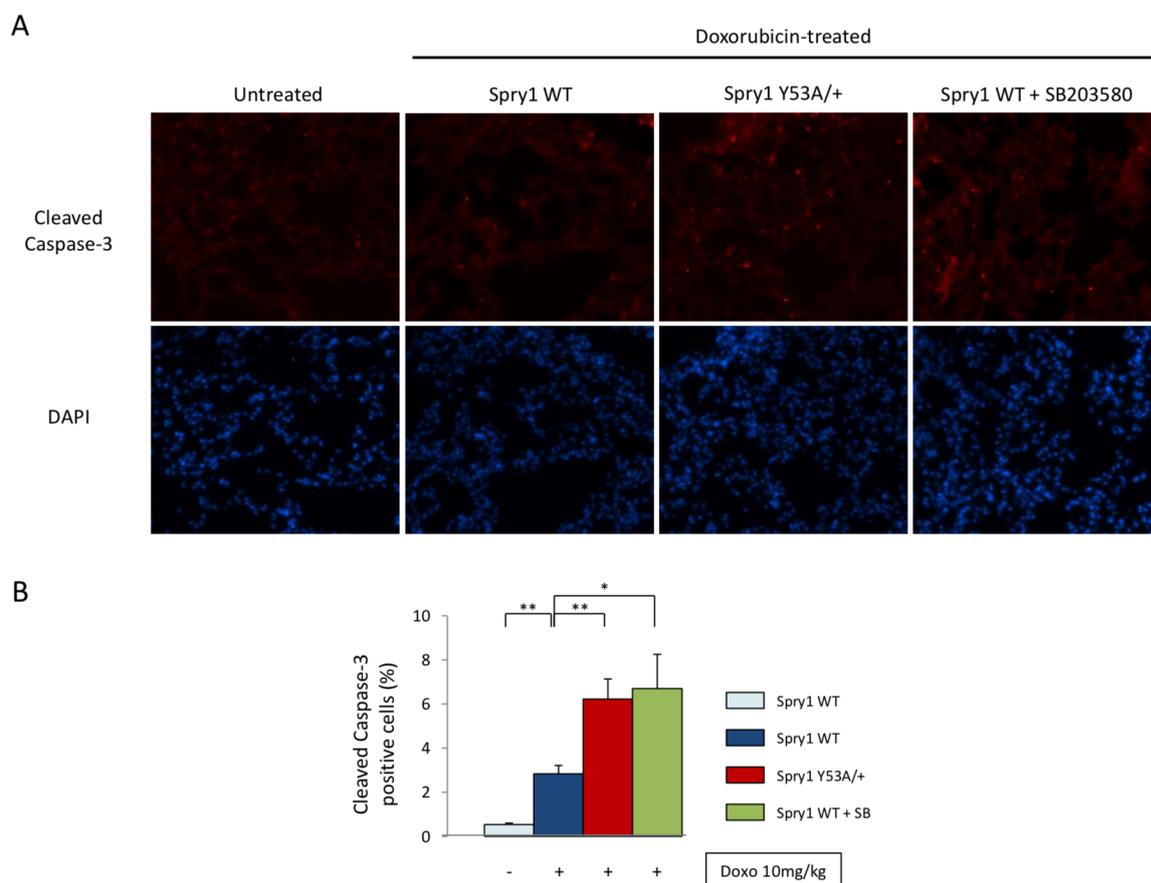
efectores de la apoptosis, pudimos constatar la mayor orientación de las células Spry1 Y53A/Y53A y WT con inhibidor SB hacia la respuesta apoptótica (Figura 58C).



**Figura 58. La activación de la vía p38 por parte de Spry1 en un contexto de senescencia in vitro favorece la resistencia a apoptosis.** El análisis transcriptómico con GSEA de los fibroblastos dérmicos de ratón en la etapa temprana de la senescencia desvela una clara asociación del perfil de expresión de las células Spry1 Y53A/Y53A con la apoptosis (A). Para corroborar dicho escenario, el mismo tipo celular fue utilizado en un experimento en el que, tras estimular con distintas dosis de estrés oxidativo, se trató de hallar diferencias entre las condiciones analizadas (B). La inmunofluorescencia de la caspasa 3 activada en la condición 800uM de H2O2 muestra las diferencias entre condiciones (C).

Dado que la presencia de células senescentes resulta nociva en determinados contextos y que habíamos probado la necesidad de las células de activar el eje Spry1-p38 tanto para la inducción eficiente de senescencia como para el fomento de los mecanismos de supervivencia que, frente al estrés, de ella se derivan, decidimos comprobar la relevancia de este último fenómeno en un paradigma como la senescencia inducida por quimioterapia. De manera relevante, en dicho escenario, la eliminación de células senescentes causadas por el tratamiento con doxorubicina mediante el uso de senolíticos se ha probado como beneficiosa para evitar efectos secundarios perniciosos de la quimioterapia, como son la recidiva tumoral o la metástasis (Demaria, O'Leary et al. 2017).

Por ello, realizamos una inmunofluorescencia de caspasa 3 activada en los pulmones de ratones tratados con doxorubicina, comparando ratones Spry1 WT, Spry1 Y53A/+ y Spry1 WT con SB, tratados de manera similar al experimento mostrado en la figura 45 mediante la administración intraperitoneal de inhibidor de p38 a 5mg/kg/día durante 9 días desde el mismo momento en que el tratamiento con doxorubicina se le administra a cada animal. Al evaluar la presencia de células positivas para caspasa 3 activa nos percatamos de que, en consonancia con lo observado en fibroblastos dérmicos, los ratones con el alelo Y53A o tratados con SB mostraban una mayor proporción de células apoptóticas en el tejido pulmonar (Figuras 59A y 59B). En contraste con el concepto de eliminación de las células senescentes una vez ya presentes en los distintos contextos (Zhu, Tchkonja et al. 2016), este experimento aporta una nueva visión en la cual, mediante la interrupción del eje Spry1-p38, la senescencia perniciosa causada por la quimioterapia es sustituida por apoptosis al interferir en los mecanismos de inducción y viabilidad de la respuesta senescente. Cabe señalar que, en las mismas condiciones, en este tejido, hemos demostrado previamente que la inducción de senescencia es deficiente puesto que la inducción de dos de sus principales marcadores, p21 e IL6, se ve disminuida en las condiciones que aquí aparecen con mayor presencia de apoptosis, las del ratón mutante Y53A o las tratadas con inhibidor de p38. En relación a lo mostrado, y como ha sido demostrado por otro grupo, la expresión de p21 es capaz de inhibir la apoptosis en un contexto de senescencia celular (Yosef, Pilpel et al. 2017), encajando con lo que observamos en nuestro caso.

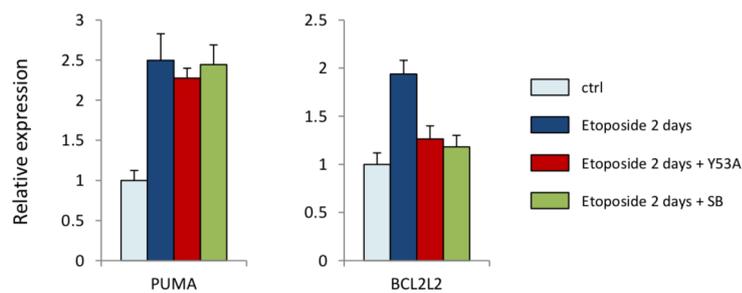


**Figura 59. La activación del eje Spry1-p38 es necesaria para la resistencia a la apoptosis que ofrecen las células senescentes en un contexto in vivo.** La inmunofluorescencia de la caspasa 3 activada en las distintas condiciones muestra las diferencias existentes en el tejido pulmonar expuesto a la presencia de doxorubicina causante de senescencia (A), así como la cuantificación resultante en tanto por ciento (B).

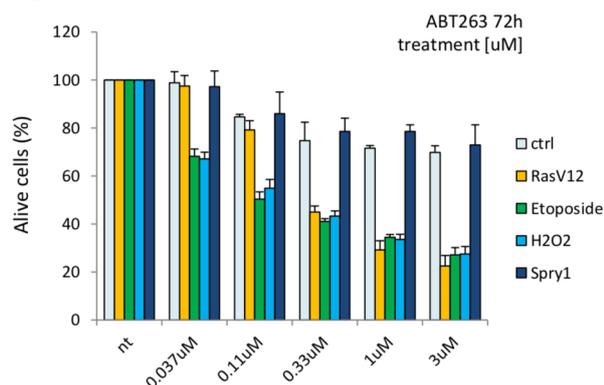
Por otro lado, al inhibir la vía p38 en la senescencia inducida por etopósido en IMR90, la expresión de PUMA, descrita en la respuesta senescente (Baar, Brandt et al. 2017), no se ve alterada (Figura 60A). No obstante, la activación de p38 que se deriva de la integridad de la tirosina 53 de Spry1 favorece la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-w (Yosef, Pilpel et al. 2016), cuyo gen es BCL2L2, explicando así, al menos en parte, la resistencia a apoptosis que favorece el eje Spry1-p38 en senescencia. Es necesario indicar que BCL2L2 es, de todos los genes antiapoptóticos inducidos en senescencia, aquel cuyo incremento sucede de manera más frecuente a lo largo de todos los tipos celulares utilizados como modelos de respuesta senescente (Hernandez-Segura, de Jong et al. 2017) y su expresión ha sido previamente identificada como dependiente de p38 (Frevel, Bakheet et al. 2003, Danckwardt, Gantzert et al. 2011). Por otra parte, en consonancia con lo ya mostrado, la senescencia inducida por la

sobreexpresión de Spry1, a diferencia de la senescencia canónica, no muestra susceptibilidad al tratamiento con inhibidores de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. Dicho de otra forma, basándonos en experimentos realizados por otros grupos (Chang, Wang et al. 2016), la inducción de senescencia por Spry1 en IMR90 no permite la eliminación de estas células por tratamiento con senolíticos como el ABT-263 (Figura 60B). Por tanto, al menos en este paradigma, la activación del eje Spry1-p38 no favorece la faceta apoptótica de la senescencia sino que, más bien, ejerce como mecanismo de compensación para la viabilidad en las células senescentes. Asimismo, la senescencia causada por la sobreexpresión de Spry1 no conlleva la inducción de PUMA, mientras que causa el aumento de la expresión de BCL2L2 (Figura 60C), encajando con lo descrito en esta misma figura en cuanto a la inhibición del eje Spry1-p38 en la senescencia inducida por etopósido.

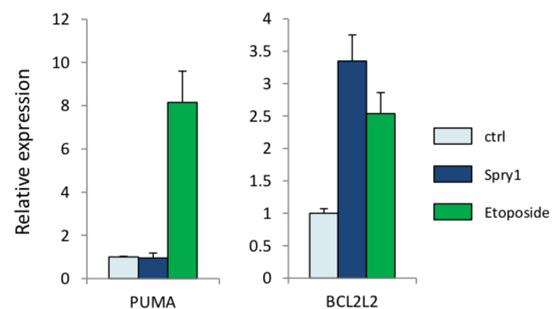
A



B



C



**Figura 60. La inducción de senescencia por el eje Spry1-p38 no muestra la susceptibilidad a los senolíticos característica de esta respuesta.** El número de células vivas tras 72h de tratamiento con ABT-263 muestra el contraste entre las células senescentes por estímulos canónicos y las inducidas por Spry1 (A). Además, la sobreexpresión de Spry1 no produce la expresión de PUMA en senescencia, a diferencia de lo que sucede en una senescencia canónica causada por etoposido (B). La expresión de PUMA fue medida en células en la etapa inicial de la senescencia a causa de etoposido en las distintas condiciones mostradas (C).

# Discusión



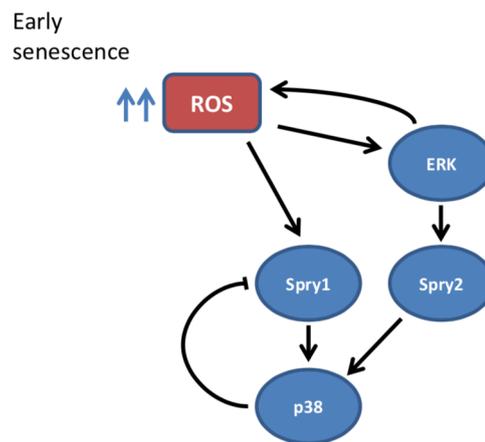
Nuestro trabajo, principalmente, sitúa de manera definitiva a la familia de genes de Sprouty como componentes celulares necesarios para la inducción adecuada de la respuesta senescente. Considerados, casi de manera exclusiva, como elementos de respuesta a la señalización por receptores tirosina-quinasa, la descripción minuciosa realizada en esta tesis, apoyada firmemente en los datos previos generados en nuestro grupo, confirma de forma contundente la participación de los miembros de la familia Sprouty en la senescencia celular. En primer lugar, el único estudio previo al respecto habla de los componentes de la familia Sprouty como elementos que responden, según lo comentado en dicho trabajo, a la señalización aberrante de ERK en la senescencia inducida por oncogenes a causa de la activación de Ras causada por la pérdida de NF1 (Courtois-Cox, Genter Williams et al. 2006). En dicho trabajo se atribuye la inducción de Spry1, Spry2 y Spry4 al establecimiento de un programa celular de oposición a la activación descontrolada de la vía ERK. No obstante, pese a que la pérdida de NF1 conlleva la entrada de senescencia en células humanas como las IMR90 o las BJ, la cinética de activación de AKT y ERK posee un pico inicial que luego disminuye con el tiempo, fenómeno disonante tanto con los tipos y modelos de senescencia estudiados en nuestro trabajo como con los mostrados en un gran número de publicaciones de diversos laboratorios.

En cuanto a la vía AKT, se ha mostrado en un gran número de artículos cómo la célula requiere de su activación para el establecimiento y la persistencia de la senescencia producida por todos los inductores canónicos (Nogueira, Park et al. 2008, Astle, Hannan et al. 2012, Xu, Li et al. 2014, Correia-Melo, Marques et al. 2016). En este mismo sentido, la activación continuada de AKT por la eliminación de PTEN es capaz de causar senescencia (Chen, Trotman et al. 2005). Por otro lado, la vía mTOR, íntimamente relacionada con PI3K-AKT, es una de las vías más reiteradamente descritas como requeridas por la célula para el establecimiento adecuado del fenotipo senescente, principalmente del aparato secretor de estas células (Herranz, Gallage et al. 2015, Laberge, Sun et al. 2015), pero también relevantes para la expresión de inhibidores de ciclo celular (Aarts, Georgilis et al. 2017) así como para el mantenimiento de la senescencia por la producción de ROS mitocondrial (Correia-Melo, Marques et al. 2016).

Por otro lado, respecto a la vía ERK, menos explorada que el eje PI3K-AKT-mTOR en senescencia, se ha observado cómo la célula establece una activación prolongada de la misma durante la respuesta senescente (Kim, Song et al. 2003) en respuesta a estrés oxidativo, daño al DNA (Khalil, Morgan et al. 2011) y, por supuesto, activación de oncogenes como Ras o Raf (Deschenes-Simard, Gaumont-Leclerc et al. 2013). De hecho, más allá de la activación persistente de ERK requerida para, por ejemplo, la expresión crucial de p16 INK4a en senescencia en modelos celulares (Ohtani, Zebedee et al. 2001), dicha inducción de la vía se ha demostrado necesaria incluso para la consecución de la senescencia en un paradigma tan particular como el desarrollo (Storer, Mas et al. 2013). Por todo ello, el concepto en el que la comparecencia de los diferentes miembros de Sprouty en la respuesta senescente tiene como cometido la inhibición de la vía ERK queda, cuanto menos, en entredicho, puesto que en la amplísima mayoría de los casos la célula senescente requiere de la activación continuada de esta vía. Además, como ya habíamos demostrado previamente (Macia, Gallel et al. 2012, Macia, Vaquero et al. 2014) y en este trabajo hemos constatado, la vía ERK no se ve afectada por la función de Sprouty en senescencia.

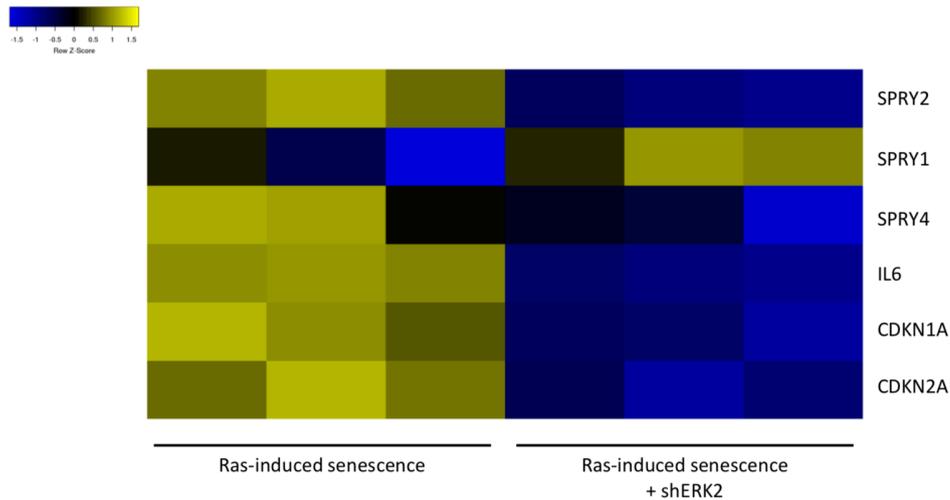
Sin embargo, todo lo expuesto no excluye la posibilidad de que los miembros de Sprouty aumenten sus niveles en las células senescentes debido a la activación de la vía ERK. En este sentido, y como ya hemos señalado en el apartado de resultados, parece evidente que es Spry2 el miembro de la familia que responde al estado de la señalización de ERK mientras que Spry1, por otro lado, depende de manera directa de la presencia de estrés oxidativo. No obstante, en ciertos de los experimentos que hemos llevado a cabo en las IMR90, los niveles de Spry1 se han visto afectados por la adición del inhibidor de la activación de ERK denominado U0126. Sin embargo, de manera sumamente relevante, ello sucede en los casos en los que la inducción de estrés oxidativo no es directa como en la senescencia inducida por peróxido de hidrógeno, sino que se deriva de la activación excesiva de Ras o de la producción de daño al DNA con etopósido. El mecanismo aceptado de activación de la vía p38 en la senescencia inducida por oncogenes describe cómo una activación aberrante de ERK produce un gran aumento de ROS en la célula, lo que mediante mecanismos, hasta la elaboración de nuestro presente trabajo, poco explorados conlleva la inducción de p38 (Wang, Chen et al. 2002, Dolado, Swat et al. 2007). Por otro lado, la producción de daño al DNA inductora de senescencia es capaz de activar la vía ERK (Khalil, Morgan et al. 2011), probablemente con el fin de mantener la viabilidad celular. Por ello, podemos especular que la reducción de ERK en

nuestros experimentos en los casos en que la producción de estrés oxidativo no es directa puede afectar de manera parcial a los niveles de Spry1 por medio de la reducción en la producción de ROS en las células. Debido al panel de Western Blots que obtuvimos en la senescencia inducida por peróxido de hidrógeno, observamos cómo la inhibición de ERK no afecta a los niveles de proteína de Spry1 cuando el estrés oxidativo se induce directamente sobre la célula, hecho que refuerza el concepto de la diferente reacción de Spry1 y Spry2 a los estímulos inductores de senescencia.



**Figura 61. Esquema representativo de los mecanismos de inducción diferencial entre Spry1 y Spry2 en senescencia.** En esta figura se resume de manera gráfica lo desvelado en los experimentos realizados tanto en las células IMR90 con los distintos inductores de senescencia como en los fibroblastos dérmicos tras el estímulo del 21% de oxígeno en el ambiente de cultivo.

De hecho, coincidiendo con la conjetura propuesta, datos transcriptómicos obtenidos en la página Gene Expression Omnibus en que se comparan células que han sufrido OIS con shRNA ctrl y shRNAs contra ERK2 (Deschenes-Simard, Gaumont-Leclerc et al. 2013), demuestran cómo, de todos los miembros de Sprouty, sólo la expresión de Spry2 y Spry4 depende de la vía ERK en las células senescentes (Figura 62). Por tanto, parece que la célula coordina la inducción de los distintos miembros de Sprouty en senescencia mediante mecanismos diferentes pero, al fin y al cabo, complementarios.

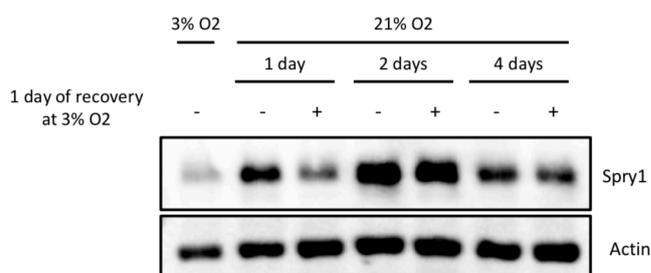


**Figura 62.** Datos extraídos de Gene Expression Omnibus (GEO) indican cómo, en un modelo de senescencia inducida por Ras, la activación de ERK no influye sobre la expresión de Spry1. El set de datos GSE33613, obtenidos de GEO (Gene Expression Omnibus), fue filtrado para mostrar en un heatmap los genes indicados en la figura.

El exceso de estrés oxidativo ha sido repetidamente citado como una de las causas de la respuesta senescente a lo largo de los años de abordaje experimental de este proceso celular (Munoz-Espin and Serrano 2014). Sin embargo, los mecanismos por los que la célula detecta cuando dicho estrés ha de ser necesariamente motivo de la inducción de senescencia están todavía pobremente explorados. Más allá de que, en presencia de ROS, la célula induce la vía p38 y ello es parte necesaria del establecimiento de senescencia (de Magalhaes and Passos 2018), el conocimiento existente no detalla minuciosamente el modo en que la maquinaria celular es capaz de detectar tales niveles de estrés así como de establecer una activación persistente de la vía p38.

En este sentido, y basándonos en varios de los experimentos que hemos realizado en nuestro laboratorio, cabe la posibilidad de que Spry1 sea capaz de actuar como una suerte de sensor de los niveles de radicales oxidantes que, una vez sobrepasado cierto umbral de estrés, ha de desencadenar la inducción de senescencia en las células. De hecho, como se muestra en la figura 63, los fibroblastos dérmicos, como ya ha sido mostrado en otros experimentos de esta tesis, incrementan la cantidad de Spry1 de manera independiente al aumento de mRNA en presencia de concentraciones atmosféricas de oxígeno estresantes (21% O<sub>2</sub>) ya a las 24 horas de estímulo.

Curiosamente, al devolver las células durante otras 24 horas a su ambiente fisiológica (3% O<sub>2</sub>), el nivel de Spry1 es devuelto al estado inicial. Sin embargo, cuando el estrés causado por el cultivo al 21% de oxígeno supera las 48h, la inducción de Spry1 resulta, cuanto menos, más difícil de revertir al devolver las células a las condiciones de oxígeno de 3%. Ello también sucede cuando el estímulo estresor del 21% de oxígeno se da durante 4 días. Por tanto, pese a que no se pueda aseverar la total irreversibilidad de la inducción de Spry1 en los estímulos utilizados en el experimento descrito en este párrafo, resulta inequívoco que la capacidad de la célula para regresar al estado inicial se ve dramáticamente alterada a los 2 y a los 4 días, sugiriendo un posible mecanismo celular que desencadena la respuesta senescente en función de la intensidad y/o duración del estrés sufrido, oxidativo en este caso. Respecto a los mecanismos que utiliza la célula para hacer de la senescencia una respuesta irreversible, resulta relevante la posibilidad de que hayamos definido uno que se adhiera a los escasos ya descritos, entre los que se incluyen las alteraciones cromatínicas SAHF (Narita, Nunez et al. 2003), además de ciertos loops de retroalimentación mediados por rutas como NFκB-Stat3 (Kuilman, Michaloglou et al. 2010), la respuesta al daño al DNA en los DNA-SCARS (Rodier, Munoz et al. 2011) o la producción de ROS mitocondrial (Correia-Melo, Marques et al. 2016, Wiley, Velarde et al. 2016).



**Figura 63.** La inducción de Spry1 en fibroblastos de ratón expuestos a condiciones estresantes se torna menos reversible a partir de las 48 horas de estímulo. Los fibroblastos de dermis de ratón utilizados, al exceder las 48h de cultivo al 21% de oxígeno, resultaron mucho menos capaces de revertir la inducción de Spry1.

Resulta, cuanto menos, sorprendente y novedoso el mecanismo por el cual la presencia de altos niveles de estrés oxidativo incrementan la estabilidad de la proteína Spry1 de

una forma nunca antes descrita para ninguno de los miembros de esta familia de genes. Uno de los posibles responsables estructurales de llevar a cabo el cometido de la detección del exceso de estrés oxidativo puede que resida en la zona rica en cisteínas, el llamado dominio Spry. Dicho dominio, en un estudio sobre Spry2 (Wu, Alexander et al. 2005), es capaz de coordinar centros Fe-S, pródigamente descritos como estructuras moleculares capaces de mensurar el estrés oxidativo mediante la alteración de su estructura en función del estado redox celular (Mettert and Kiley 2015). De manera muy relevante, el estudio sobre la coordinación de centros Fe-S por parte de los diferentes Sprouty describe cómo, mediante la modificación estructural de dichos centros, la función de Spry2 se ve afectada en cuanto a la inhibición de la señalización FGF. Ello posibilita el hecho de que, en situaciones en las que los Sprys se vean ante circunstancias de prolongado estrés oxidativo, pierdan su función principal y pasen a realizar funciones alternativas como, por ejemplo, podría suceder en el caso de la senescencia celular, donde no actúan como inhibidores de la vía ERK. Concretamente, experimentos que hemos realizado en nuestro grupo sugieren que, en presencia de estrés oxidativo, en los fibroblastos dérmicos de ratón que usamos como modelo de senescencia, la mutación de la tirosina 53 de Spry1 no tiene un efecto sobre la inhibición de la vía ERK mientras que, en un entorno más fisiológico del 3% de oxígeno, dicha mutación interfiere con el comportamiento feedback negativo de Sprouty sobre la señalización ERK al estimular con suero.

Es necesario destacar que, al menos en los modelos celulares utilizados en nuestros trabajos, el miembro de la familia Sprouty capaz de responder de manera principal al estrés oxidativo es Spry1. Ello implica que, al ser el elemento de la familia que responde de forma inicial y preponderante a dichas circunstancias de estrés oxidativo, pueda ser el conductor de la respuesta senescente, así como el encargado de coordinarla de manera apropiada, al menos en lo que respecta a la actuación de los otros miembros de Sprouty en senescencia. Ello también podría explicar el hecho de que la mutación de la tirosina 53 de Spry1 sea relevante principalmente en fenotipos enmarcados en la respuesta de las células senescentes en detrimento del posible papel más canónico en cuanto a la señalización por RTKs de la tirosina 55 de Spry2.

En referencia al momento de la comparecencia de los diferentes componentes de la familia Sprouty en las células senescentes, queda claro que sucede de manera temprana a lo largo del proceso de evolución dinámica que es la senescencia celular, y se prolonga

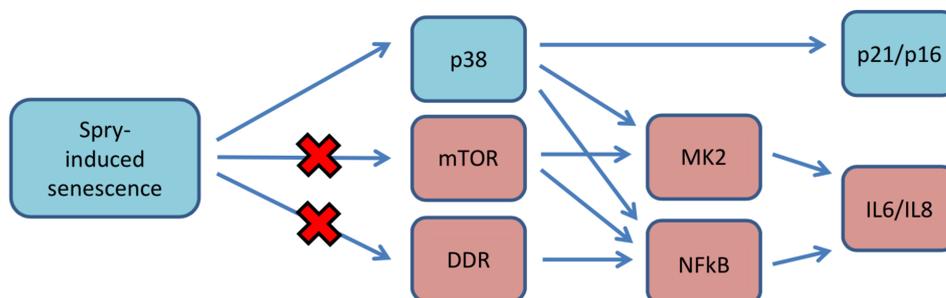
a lo largo del tiempo que comprende esta particular respuesta. De hecho, tanto la activación de la vía ERK como el aumento del nivel de estrés oxidativo (Passos, Nelson et al. 2010) son acontecimientos que acaecen en las células senescentes ya al comienzo de la ejecución de su respuesta a los diversos estresores que la producen. Para comprobarlo de manera eficaz, nuestros experimentos son capaces de discernir entre las dos fases de la senescencia previamente establecidas por el grupo del Dr. Masashi Narita (Ito, Hoare et al. 2017) a través de la valoración de la expresión de sus diferentes marcadores TGFbeta e IL6. La evolución del fenotipo senescente es una característica sumamente en boga en la actualidad y ampliamente aceptada por todos los grupos que lideran la investigación en este campo (van Deursen 2014). Por ello, la presencia de Spry1 y Spry2 en las fases que hemos descrito deja entrever la importancia de estas dos proteínas en la correcta evolución del fenotipo de las células senescentes, más allá de una mera inducción a tiempo final previamente descrita en un único estudio (Courtois-Cox, Genter Williams et al. 2006).

Respecto a la clásica modulación de la vía ERK realizada por la familia Spry en un gran número de modelos celulares (Masoumi-Moghaddam, Amini et al. 2014), podemos aseverar que, en el caso de la senescencia celular, su función no está mediada, al menos en un sentido principal, por la inhibición de dicha vía de señalización. A favor de ello, existe también un elevado número de publicaciones que indican papeles alternativos de los miembros de la familia Spry en la modulación de vías ajenas a ERK como, por ejemplo, uPa-uPAR (Mekkawy and Morris 2013), Wnt (Tennis, Van Scoyk et al. 2010) o HIF (Hicks and Patel 2017). En nuestros contextos celulares *in vitro* e *in vivo*, en los diversos tipos de senescencia mostrados, parece que la función de los Spry 1 y 2 en dicho proceso celular reside en la capacidad de estas proteínas para potenciar la vía p38, previamente demostrada como clave para la inducción de senescencia (Xu, Li et al. 2014).

Cuando profundizamos en la activación por parte de Sprouty de la vía p38 en la sobreexpresión en fibroblastos humanos, pudimos constatar que la capacidad de inducción de senescencia de Spry1 y Spry2 pasa por la integridad de dicha vía de señalización, puesto que, en presencia del inhibidor SB203580 tal capacidad es abolida. Consecuentemente, en presencia de la mutación Y53A, de demostrado comportamiento dominante negativo *in vitro* (Sasaki, Taketomi et al. 2001) e *in vivo* (datos de nuestro

grupo no publicados), tanto en células IMR90 como en fibroblastos dérmicos de ratón, la inducción de p38 en senescencia celular se ve comprometida.

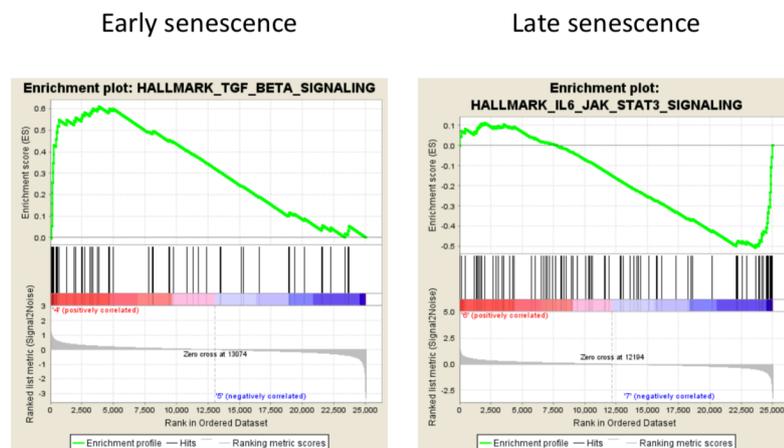
Por otro lado, la sola sobreexpresión de Spry1 es capaz de inducir un fenotipo de senescencia que carece del SASP inflamatorio, hecho que, aparentemente, resulta contradictorio respecto a lo descrito previamente por nuestro grupo en cuanto a la inducción de NFkB por Spry1 en la senescencia de la glándula tiroides (Macia, Vaquero et al. 2014). Sin embargo, en presencia de la mutación Y53A en células IMR90, la expresión de elementos del SASP tardío controlado por NFkB como IL6 e IL8 se ve reducida. Ello es explicable en base a la inestimable tarea realizada por el grupo liderado por Judith Campisi en algunos trabajos relacionados con el SASP en los que se describe que la vía p38 es capaz de potenciar el SASP inflamatorio siempre y cuando coincida con la activación de la señalización de daño al DNA (Freund, Patil et al. 2011). En este mismo sentido, recientes estudios muestran como la inducción del SASP inflamatorio depende de la activación de mTOR (Laberge, Sun et al. 2015), del aumento traduccional de MK2 que se deriva de dicha activación y converge con p38 (Herranz, Gallage et al. 2015), y de la señalización de daño al DNA (Rodier, Coppe et al. 2009), todos ellos ausentes en la inducción de senescencia causada por la transducción de Spry1 en células IMR90 (Figura 64). Por tanto, principalmente, la sobreexpresión de Spry1 en IMR90 nos muestra de manera algo incompleta el hecho de que la vía controlada por esta proteína es p38, lo que no excluye defectos en la expresión del SASP inflamatorio en los contextos en que se da cuando la mutación Y53A se halla presente y la inducción de senescencia se realiza con estímulos canónicos.



**Figura 64. Esquema representativo de las vías activadas por la senescencia inducida por Spry1 en IMR90.** La figura desgrana las vías activadas por Spry1 al ser sobreexpresado en células IMR90 y recapitula las características moleculares halladas en este tipo particular de senescencia, así como las consecuencias en facetas de esta respuesta como la inducción de inhibidores de ciclo o la producción de SASP inflamatorio.

No obstante, en nuestros experimentos hemos desvelado, de manera novedosa, la influencia de la vía p38 sobre la producción de otros elementos del SASP no regulados por NFκB. Pese a la escasa información existente, la regulación de la activación de Notch por p38 en un contexto de senescencia (Weijzen, Rizzo et al. 2002), así como la íntima relación de la vía p38 con TGFβ (Passos, Nelson et al. 2010) permiten especular no sólo con el papel de p38 en la producción la mayoría de elementos del SASP, sino, también, sobre la importancia de esta vía en la variación del contenido del SASP en un sentido temporal. La modulación llevada a cabo por p38 sobre los dos SASPs citados, en distintas fases de la respuesta senescente podría ser explicada, por ejemplo, por la variación en los niveles de activación mostrados por esta vía al comparar una etapa de senescencia temprana con una tardía, incrementándose a lo largo de los días durante los que la senescencia evoluciona fenotípicamente (Freund, Patil et al. 2011). Asimismo, en ausencia de daño al DNA, la activación de p38 es incapaz de producir SASP inflamatorio, tanto en nuestro trabajo como en anteriores (Freund, Patil et al. 2011). No obstante, en presencia de daño al DNA, la inducción de p53 mitiga tanto la activación de p38 como la secreción de SASP inflamatorio (Coppe, Patil et al. 2008), sugiriendo la necesidad de una contención inicial en la activación de la vía p38 o, incluso, de la comparecencia de p53 en caso de desencadenarse una senescencia dirigida por daño al DNA para la correcta coordinación de la evolución del SASP. En este sentido, la inducción persistente de p53 en un contexto de senescencia causada por daño al DNA es capaz de impedir la producción del SASP inflamatorio (Wiley, Schaum et al. 2018) e incluso, como ha sido ya mentado en la introducción, la mayor activación inicial de p53 en senescencia, responsable de fenómenos como la secreción inicial de elementos de alarma intersticial como HMBG1 (Davalos, Kawahara et al. 2013), puede ser determinante para la evolución del SASP dado que controla el aumento de expresión de Notch en presencia de estímulos estresores (Mandinova, Lefort et al. 2008). De hecho, utilizando datos transcriptómicos del laboratorio de Masashi Narita (Kirschner, Samarajiwa et al. 2015), mediante su análisis con la aplicación GSEA, podemos observar cómo, en fibroblastos IMR90, p53 potencia el SASP inicial de TGFβ en la fase temprana de la respuesta senescente (Figura 65) mientras que, como es bien sabido, es responsable de la contención del SASP inflamatorio en la etapa tardía de la senescencia (Coppe, Patil et al. 2008, Mosteiro, Pantoja et al. 2016). Sin embargo, y contrariamente a lo que sucede en la etapa final de la senescencia, en la que p38 y p53 parecen antagonizar en la producción del SASP inflamatorio (Freund, Patil et al. 2011), si tenemos en cuenta los experimentos

que presentamos en esta tesis, p38 y p53 pueden estar coordinando de manera inicial el SASP de TGFbeta, puesto que tanto interfiriendo la función de Sprouty con el mutante Y53A, como inhibiendo la vía p38 con SB o, según lo observado en los datos transcriptómicos del laboratorio del Dr. Narita, impidiendo la función de p53, la producción de dicho SASP se ve afectada. Además, la acción coordinada de p53 y p38 en la etapa inicial de la senescencia también parece darse en, por ejemplo, la inducción de p21 (Sun, Yoshizuka et al. 2007), por lo que existen precedentes que hacen las conjeturas aquí propuestas algo más factibles.



IMR90 p53 WT vs IMR90 shp53

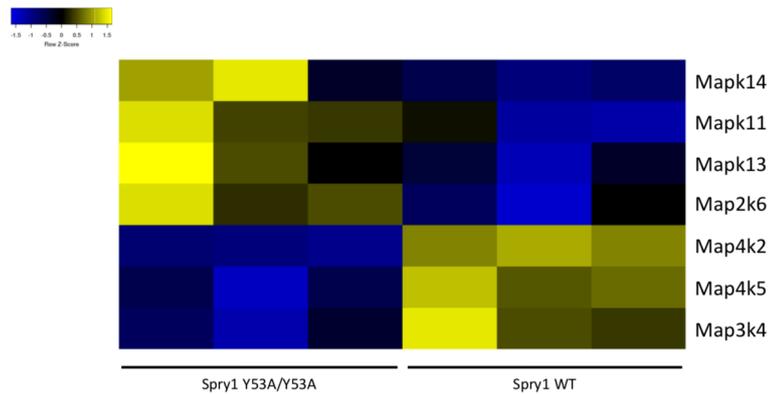
Obtained from GSE53379

**Figura 65.** El análisis mediante GSEA de datos transcriptómicos que comparan células IMR90 con y sin p53 tanto en la etapa temprana como en la etapa tardía de la senescencia muestran el papel dual de p53 en el control de los distintos SASPs. Los datos de microarray, obtenidos del GEO (Gene Expression Omnibus), cuya referencia es GSE53379, nos permiten observar tanto el papel potenciador de p53 en referencia al SASP inicial liderado por TGFbeta como su papel inhibitor en cuanto al SASP inflamatorio tardío.

Ya que, en nuestro trabajo, hemos también desvelado que la vía p38 es necesaria para la producción de elementos de SASP relacionados con contextos de senescencia que carecen de daño al DNA, como en el caso de FGF y Wnt (Storer, Mas et al. 2013), dicha señalización se sitúa en un lugar preponderante en el control del fenotipo secretor senescente en función del contexto.

La vía p38, en senescencia, es capaz de regular la expresión del locus INK4a/ARF mediante la fosforilación inactivadora de HBP1, que ejerce como represor transcripcional de dicho locus (Xiu, Kim et al. 2003), la inducción de Msk1, que actúa como elemento de control epigenético de la expresión del locus (Culerrier, Carraz et al. 2016) o la inhibición de la unión a cromatina del componente represor Polycomb BMI1 (Voncken, Niessen et al. 2005). Asimismo, existen elementos moleculares relacionados con esta vía que se han desvelado cruciales para la inhibición del ciclo implementada en senescencia como, por ejemplo, el control del factor de transcripción Sp1 por parte de p38 (Wu, Xue et al. 2007). Además, p38 es capaz de inducir la expresión de p21 tanto orientando la afinidad molecular de p53 hacia su transcripción (Sanchez-Prieto, Rojas et al. 2000, Sun, Yoshizuka et al. 2007) como activando la producción de TGFbeta, demostrada por nosotros, que causa también el incremento de p21 en senescencia (Munoz-Espin, Canamero et al. 2013, Aarts, Georgilis et al. 2017). Por tanto, teniendo en cuenta los datos ya existentes y los proporcionados por nuestro estudio, encaja el hecho de que la interrupción de la vía p38 tenga, principalmente, efecto sobre la inducción de los inhibidores de ciclo en senescencia celular, en contraste a lo que sucede con los elementos del SASP, afectados o no en función del contexto y del estado de otras vías de señalización. Este mismo hecho, pero en un sentido contrario, sucede con la vía AKT-mTOR puesto que, en función del contexto, es capaz de afectar (Aarts, Georgilis et al. 2017) o no (Herranz, Gallage et al. 2015) a la expresión de los inhibidores de ciclo y, sin embargo, es requerida para la secreción de todos los tipos de SASP en un gran número de contextos (Herranz, Gallage et al. 2015, Laberge, Sun et al. 2015).

Otro de los hechos que resultan llamativos es el que muestra cómo, en el microarray de los fibroblastos dérmicos de ratón, todos los genes que pertenecen a la familia de MAPK p38, sin excepción, además de MKK6 (MAP2K6), se encuentran menos expresados en las células que tienen, en ese momento, mayor activación de la vía, las células Spry1 WT (Figura 66). Ello refuerza la visión de que la vía p38 está más activada en este genotipo respecto a las células Y53A/Y53A puesto que, a modo de feedback negativo, la propia célula muestra a nivel transcriptómico una menor expresión de los miembros de la familia p38 debido su activación incrementada. Este mecanismo ya ha sido descrito para esta misma vía en el caso de MKK6 y MAPK14 (Ambrosino, Mace et al. 2003), dos de los elementos que aparecen en nuestro microarray.



**Figura 66.** La expresión disminuida de los elementos de la vía p38 en los fibroblastos dérmicos de ratón WT confiesan la mayor activación de p38 en presencia de la tirosina 53 de Spry1. El heatmap desplegado muestra la expresión de los distintos genes a día 14 post-extracción (senescencia temprana) en los fibroblastos dérmicos WT.

Resulta necesario profundizar en los posibles mecanismos precisos por los que Sprouty es capaz de potenciar la vía p38 en un contexto de senescencia celular. No obstante, disponemos de indicios que permiten especular sobre la manera en la que estas proteínas activan la vía p38. Es evidente que, al mutar ciertos residuos de la estructura de Spry1, la capacidad de inducción de senescencia a través de p38 de esta proteína se ve interrumpida, como sucede en los casos de la tirosina 53, las argininas 62 y 70 y la arginina 250. Inferir que la relación de Spry1 con el proceso de senescencia se deriva de la interacción de ciertas proteínas con los dominios a los que pertenecen los residuos mutados posibilita la reducción de un amplio abanico de interactores posibles. En Spry1, tanto la región circundante a la tirosina 53 como a las argininas 62 y 70 guarda un elevado nivel de homología con las que se hallan en Spry2. Dichos dominios posibilitan la interacción de alta afinidad entre Spry1, Spry2 y c-Cbl (Wong, Lim et al. 2001), en el caso de la tirosina citada, y entre dichos Sprys y CIN85, en referencia a las argininas situadas en N-terminal (Haglund, Schmidt et al. 2005). Además, nuestros experimentos muestran que Spry2 es capaz de inducir senescencia también a través de la activación de p38. Por otro lado, Spry4 difiere en la estructura de los dominios citados con Spry1 y Spry2, lo que disminuye la afinidad de este miembro por los interactores mentados (Ng, Jackson et al. 2008, Edwin, Anderson et al. 2009). En definitiva, parece plausible que la activación de la vía p38 por parte de Spry1 y Spry2 sea llevada a cabo por algún proceso que dependa de la interacción entre los elementos descritos. En este sentido, la interacción entre

Sprouty, c-Cbl y CIN85 ya ha sido descrita para la activación de una vía de señalización, la vía ERK, a partir del receptor de EGF (Haglund, Schmidt et al. 2005). Adicionalmente, aunque en absoluto explorado en cuanto a Spry, se ha descrito un complejo de proteínas en los que la unión de c-Cbl y CIN85 con MEKK4 es necesaria para impulsar la activación de p38 por parte de GADD45a (Aissouni, Zapart et al. 2005). Resulta llamativo lo poco que se sabe del papel de esta proteína, GADD45a, expresada a causa de la activación de p53 e íntimamente relacionada con p21 (Moskalev, Smit-McBride et al. 2012), en el proceso de senescencia. Cabe la posibilidad de que ejerza como elemento de conexión adicional de la respuesta de daño al DNA, mediada por p53, con la potenciación de p38 en presencia de Spry-Cbl-CIN85 y, de hecho, ya ha sido citada como elemento molecular del eje de señalización que engloba a p53, p38, ROS y TGFbeta en senescencia (Passos, Nelson et al. 2010), así como crucial para la inducción de p38 en un contexto de activación oncogénica de Ras (Bulavin, Kovalsky et al. 2003). Además, en referencia a los resultados obtenidos respecto a la apoptosis, la interacción de GADD45a, c-Cbl y CIN85 favorece la inducción, por parte de MEKK4, de la vía p38 frente a la vía JNK, inequívocamente implicada esta última en mayor medida en los procesos de muerte apoptótica que p38 (Dhanasekaran and Reddy 2008).

Por otro lado, según lo observado en nuestros modelos, el incremento de Spry1 derivado del estrés oxidativo está contenido por la propia vía p38, mostrando un posible rechazo celular a la acumulación de este miembro de Sprouty salvo que se trate de un caso de estrés lo suficientemente intenso y prolongado que, finalmente, conlleve la inducción de senescencia. Sin embargo, dicha contraposición celular a la acumulación de Spry1 por la inhibición mediada por p38 parece sólo darse en una fase primaria de la senescencia celular, donde todavía esta respuesta muestra cierta reversibilidad (van Deursen 2014). En nuestros experimentos, las células manifiestan una clara diferencia en cuanto a la regulación de los niveles de Spry1 por parte de p38, a causa de factores que desconocemos por el momento. Dichos factores, casi con toda seguridad relacionados con la evolución dinámica de la senescencia, bien pudieran ser elementos que conducen a la irreversibilidad de la respuesta senescente como, por ejemplo, la alteración definitiva de la estructura de la cromatina (Chandra and Narita 2013) así como la evolución de la señalización celular en un sentido que inhabilite el control inicial de p38 sobre el nivel de Spry1, como sucede en la regulación temporal de otras vías de senescencia como CEBPbeta por parte de Notch (Hoare, Ito et al. 2016). En efecto, en la etapa final de la senescencia, podemos observar como la inhibición de la vía p38 no sólo no aumenta los

niveles de Spry1 sino que los disminuye en nuestro modelo de fibroblastos dérmicos, mostrando un evidente comportamiento dual en cuanto al control de esta proteína. Consecuentemente, las células que no albergan la mutación Y53A y muestran una inducción completa de p38 poseen, de manera clara, una cantidad de proteína Spry1 superior a las mutantes de deficiente activación de p38 en la etapa final de la respuesta senescente. Por otra parte, un contexto in vivo de senescencia crónica y completa, relacionada con el SASP inflamatorio de la etapa final de las células senescentes, es el envejecimiento (McHugh and Gil 2017). En nuestros ratones envejecidos, la mayor proporción de células senescentes presentes en el pulmón y en la piel de los ratones Spry1 WT muestran, por western blot, elevados niveles de esta proteína en comparación con los tejidos provenientes de ratones con la mutación, en consonancia con lo que sucede en la senescencia final de los fibroblastos de piel. Si bien, en el caso de la regeneración de heridas cutáneas, un contexto de senescencia de cariz más agudo y quizá cercano a la respuesta inicial de las células senescentes, la adición del inhibidor de p38, SB203580, es capaz de aumentar los niveles de expresión de Spry1 respecto al control.

Como hemos podido comprobar, la integridad de la tirosina 53 de la proteína Spry1, estabilizada por mecanismos ajenos a dicho residuo, parece ser sólo necesaria para la correcta potenciación de la vía p38 en senescencia y no para la activación aguda de la misma. Ello encaja con la posibilidad de que, en senescencia, superado cierto umbral de estrés, en este caso oxidativo, la célula estabilice los niveles de Spry1 de manera irreversible y ello favorezca la activación prolongada y creciente de p38. Sin embargo, si los niveles de estresor oxidante no alcanzan dicho umbral desencadenante de senescencia, la activación transitoria de p38 no se vea en ninguna forma influida por Spry1 ni, por supuesto, por la mutación de su tirosina 53. En este sentido, existen desde hace largo tiempo estudios que señalan como la inducción de senescencia se produce a partir de cierta dosis de estímulos productores de estrés oxidativo (Chen, Liu et al. 2000) o daño al DNA (Debacq-Chainiaux, Borlon et al. 2005, Probin, Wang et al. 2006, Krenning, Feringa et al. 2014), siempre a niveles que comprometen el statu quo celular sin llegar al extremo de producirles lesiones desmedidas que conducen a la muerte apoptótica (Childs, Baker et al. 2014), siendo el destino celular controlado en última instancia por el estado post-traducciona l de p53 (Marusyk, Wheeler et al. 2007, Qian and Chen 2013, Saha, Adhikary et al. 2014, Baar, Brandt et al. 2017). Por otro lado, respecto a la existencia de tal umbral de estrés para la inducción de senescencia, es necesario

que la célula ofrezca una cierta resistencia al establecimiento de la misma o, al menos, una contraposición inicial a las vías que propician el desarrollo de este tipo de respuesta celular. Cabe la posibilidad, además, de que la irreversibilidad de la respuesta senescente no sólo dependa de alcanzar ciertos niveles de estresor sino, también, de que dichos niveles sean capaces de coordinar la activación simultánea de un número mínimo de vías necesarias para la inducción de senescencia (Sun 2014). Ello queda patente debido a la implicación, cuando se activan en solitario, de algunas de dichas señalizaciones en procesos reversibles que se asemejan a la respuesta senescente en cuanto a la parada de ciclo celular, como sucede en el caso de p38 y la inhibición por contacto. Pese a tratarse de una inducción más leve que la que se da en las células senescentes, la activación de p38 contribuye al establecimiento de un freno proliferativo en las células que no encuentran espacio por llenar con una nueva división celular. Sin embargo, la reversibilidad de tal freno se manifiesta cuando dichas células vuelven a disponer de sitio que ocupar mediante el reingreso en el ciclo celular (Faust, Dolado et al. 2005). No obstante, vías como AKT (Leontieva, Demidenko et al. 2014) o ERK (Swat, Dolado et al. 2009) no se encuentran activadas en este tipo de parada reversible, diferenciándose así de la señalización incrementada que muestran en senescencia. Por otro lado, en cuanto a la activación de elementos clave de la senescencia como p53, parece que además requieran de la aparición de vías paralelas que afiancen su papel en la parada proliferativa irreversible de las células senescentes. Concretamente, experimentos que utilizan moléculas estabilizadoras de p53 como la nutlin-3a o MI-63 (Wiley, Schaum et al. 2018) son capaces de inducir parada proliferativa en fibroblastos como las IMR90 de manera reversible en condiciones de cultivo de normoxia (3% de oxígeno) e irreversible en condiciones estresantes (21% de oxígeno), siendo esta última de cariz permanente probablemente por la activación simultánea de p38 causada por el estrés oxidativo, aunque todavía por explorar. Ello también abre la posibilidad al uso simultáneo de estabilizadores de p53 junto con moduladores de la actividad de p38, en función de la necesidad de establecer senescencia o de impedirla en procesos fisiopatológicos como los tumorales.

Otro de los hechos que, por supuesto, no han de pasar inadvertidos es el de la presencia de Spry1 en los diversos contextos in vivo de senescencia celular que hemos interrogado en éste y previos trabajos. En primer lugar, hemos demostrado el control de la vía p38 por parte de Spry1 en la senescencia inducida por quimioterapia. Ello sugiere que, en otro de los paradigmas en los que hemos comprobado la relevancia de Spry1 para la

senescencia, el envejecimiento, dicho papel sobre p38 pueda verse reproducido debido a la similitud entre los dos tipos de respuesta senescente mentados (Childs, Durik et al. 2015, Lujambio 2016, Demaria, O'Leary et al. 2017). Tales semejanzas se sustentan en la causa inductora común, el daño al DNA producido a las células, así como en la comparecencia ineficiente del sistema inmune en el manejo de la situación lesiva (Salminen, Kaarniranta et al. 2012, Bracci, Schiavoni et al. 2014). Por otro lado, la activación de la vía p38 necesaria para la inducción de inhibidores de ciclo o IL6 en sistemas envejecidos ha sido repetidamente observada (Ito, Hirao et al. 2006, Wong, Le Guezennec et al. 2009, Ren, Du et al. 2014) y, en este trabajo, hemos identificado el aumento de niveles de Spry1 en sistemas donde el estrés oxidativo juega un papel clave en la activación de p38 como el pulmón o la piel (Shin, Rhie et al. 2005). En concordancia, hemos sido testigos de diferencias en la presencia del marcador beta galactosidasa asociada a la senescencia en dichos tejidos, así como de una marcada disminución de la expresión de marcadores de senescencia como p16INK4a, p21 o IL6 en los pulmones de ratones poseedores de la mutación Y53A. Incluso, existen estudios GWAS (Genome-Wide Association Studies) que, en cierta consonancia con la coordinación de Spry1 y Spry2 para la inducción de senescencia que sugieren nuestros datos, identifican SNPs de Spry2 en humanos longevos (Newman, Walter et al. 2010). Asimismo, la mediación del estrés oxidativo en la activación de p38 ha sido descrita, además de en el envejecimiento (Hsieh and Papaconstantinou 2002, Ito, Hirao et al. 2006), en contextos relacionados con la senescencia como la supresión tumoral (Dolado, Swat et al. 2007), el desarrollo embrionario (Bradham and McClay 2006) o la regeneración de tejidos (Li, Nadelman et al. 2001, Sharma, He et al. 2003, Saika, Okada et al. 2004). En este último contexto, de forma sustancial, se ha descrito cómo la respuesta al estrés oxidativo, tanto en heridas cutáneas como en lesiones hepáticas, media la inducción de células senescentes necesarias para el desarrollo correcto del proceso curativo (Jun and Lau 2010, Kim, Chen et al. 2013).

Es necesario precisar que los distintos ámbitos asociados a la senescencia difieren mucho entre sí en los efectores moleculares de los que se sirven. En los casos del envejecimiento o el cáncer, parece que la función de la senescencia depende en mayor medida de p16INK4a y del SASP inflamatorio. Dicha senescencia de cariz más crónico se distingue en cierta medida de la que se halla en otros procesos como el desarrollo y la regeneración, de carácter más agudo y centrada en activar otras vías como p21 y componentes del SASP inicial como TGFbeta, PDGFa o FGFs (Munoz-Espin, Canamero

et al. 2013, Storer, Mas et al. 2013, Demaria, Ohtani et al. 2014, Aarts, Georgilis et al. 2017). En el control de todos los elementos mencionados hemos demostrado cómo la activación de p38 por Spry1 es esencial, lo que explica la promiscua presencia de Spry1 en los paradigmas de senescencia dispares que hemos citado. De hecho, pese a que se maximizan al final de la senescencia tanto en IMR90 como en fibroblastos de piel, las diferencias en la activación de la vía p38 entre las células con presencia del alelo Y53A y las que no albergan dicha forma mutante son evidentes ya en la senescencia temprana, donde casualmente se potencia sobremanera el SASP relacionado con los procesos agudos de senescencia. De hecho, aunque habiendo sido ya mentado, de forma llamativa, y como sucede en la fase inicial de la senescencia, la inhibición de la vía p38 causa un aumento de la expresión de Spry1 en las heridas cutáneas.

Todo lo comentado en el anterior párrafo encaja con el hecho de que, como ya ha sido descrito (Freund, Patil et al. 2011), la vía p38 se halla activada ya desde poco después del inicio de la respuesta senescente, estando por tanto presente durante ambas fases de la senescencia, en contraste con, por ejemplo, las vías NOTCH-TGFbeta o NFkB (Ito, Hoare et al. 2017). Ello, considerando además que, en senescencia, la vía p38 es necesaria tanto para el adecuado despliegue fenotípico de la fase inicial como de la final (Freund, Patil et al. 2011), reviste de cierto sentido la participación del eje Spry1-p38 en la evolución adecuada de la respuesta senescente en la amplia mayoría de contextos donde ésta se presenta. Pese a que parece quedar claro que la vía p38 requiere de vías adyacentes y complementarias que dirijan su efecto sobre las células senescentes en función del contexto, su situación central tanto en la activación por los principales estímulos inductores de senescencia (Barascu, Le Chalony et al. 2012, Xu, Li et al. 2014), así como su implicación en la ejecución de gran parte de los rasgos característicos de dicho proceso como la inhibición del ciclo celular (Xiu, Kim et al. 2003, Wu, Xue et al. 2007, Passos, Nelson et al. 2010, Spallarossa, Altieri et al. 2010, Culerrier, Carraz et al. 2016), el SASP inflamatorio (Freund, Patil et al. 2011), la actividad beta-galactosidasa (Morreau, Bonten et al. 1991) o, descrito en este trabajo por nosotros, el SASP inicial, dotan a la vía p38 de una relevancia esencial para la confección de este tipo de respuesta al estrés.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante la inhibición de la vía p38 en un contexto *in vivo* de senescencia por tratamiento con quimioterapia se presumen sumamente interesantes. No sólo hemos comprobado que la interrupción de la vía p38 impide el

establecimiento eficiente de senescencia en un tejido como el pulmonar, sino que además hemos desvelado la desaparición de las células receptoras del estrés terapéutico mediante la disminución del umbral de daño en el que se produce la apoptosis. Ello puede sustentarse en estudios previos que demuestran cómo, en respuesta a estrés, tanto la inducción de p21 (Yosef, Pilpel et al. 2017), dependiente en parte de p38 en senescencia según datos propios y ajenos (Sun, Yoshizuka et al. 2007, Xu, Li et al. 2014), como la propia activación de esta vía (Gong, Liu et al. 2010), son capaces de favorecer la supervivencia frente a la muerte apoptótica, encajando con lo observado en nuestras aproximaciones experimentales. De hecho, p53, elemento molecular clave para la resolución de la dicotomía senescencia-apoptosis (Purvis, Karhohs et al. 2012, Childs, Baker et al. 2014, Chen 2016), posee, entre una miríada de residuos post-traduccionalmente modulables, serinas como la 392 que, al ser fosforiladas directa o indirectamente por p38, son capaces de alterar la afinidad de p53 por determinados genes diana (Bruins, Zwart et al. 2004). Sin embargo, pese a la conveniencia del fenómeno observado para evitar las consecuencias nocivas de las células senescentes en este contexto (Demaria, O'Leary et al. 2017), el efecto de la inhibición de p38, en nuestra aproximación experimental, sólo ha sido comprobado sobre células no tumorales, lo que otorga una visión algo incompleta del proceso fisiopatológico real. Pese a ello, existen numerosos estudios que señalan el efecto antitumoral del tratamiento con inhibidores de la vía p38. De hecho, existen claros casos en los que, por ejemplo, la inhibición de p38 es capaz de impedir la resistencia a la quimioterapia en el propio pulmón (Bent, Gilbert et al. 2016), así como de favorecer la entrada en apoptosis de las células cancerosas (Pereira, Igea et al. 2013, Tan, Yu et al. 2014). No obstante, y como sucede con la propia senescencia (Serrano 2015), el papel dual de p38 en cuanto a la función que desempeña en un contexto tumoral, siendo tanto promotor de la supervivencia (Gutierrez-Uzquiza, Arechederra et al. 2012, Gil-Araujo, Toledo Lobo et al. 2014) como de la apoptosis (Porrás, Zuluaga et al. 2004) dependiendo de la situación, hace que cada caso haya de ser analizado en profundidad para la consecución de tratamientos propicios para cada tipo de cáncer. Pese a todo lo mentado, el preponderante papel de p38 como vía que permite la resistencia al tratamiento con quimioterapia (Igea and Nebreda 2015) nos permite mantener una visión optimista respecto a las posibilidades de nuestras contribuciones en este particular paradigma.

Al reflexionar acerca del papel de dicho umbral de estrés influido por Spry1-p38 en un contexto como el del envejecimiento, la primera de las consideraciones que surgen es

que la incapacidad de las células para inducir senescencia, en favor de la apoptosis, a causa del principal fenómeno que conduce al envejecimiento, el daño al DNA (Lopez-Otin, Blasco et al. 2013) pueda resultar tan útil como la eliminación de las mismas una vez ya senescentes (Xu, Pirtskhalava et al. 2018). En favor de esta conjetura, otras aproximaciones experimentales que atenúan vías relacionadas con la senescencia, como PI3K-AKT-mTOR (Johnson, Rabinovitch et al. 2013, Mercken, Crosby et al. 2013, Ortega-Molina, Lopez-Guadamillas et al. 2015), NFkB (Tilstra, Robinson et al. 2012), la propia vía p38 (Ito, Hirao et al. 2006) o AMPK (Martin-Montalvo, Mercken et al. 2013), pese a que en este último caso se trata de una activación de la vía, han sido demostradas como exitosas para retrasar la aparición de los signos del envejecimiento, aunque su influencia directa sobre la acumulación de células senescentes en los tejidos no haya sido interrogada. Además, elegantes modelos transgénicos como el ratón super p53 y super ARF (Garcia-Cao, Garcia-Cao et al. 2002, Matheu, Maraver et al. 2007), muestran una ralentización del envejecimiento que fácilmente podría derivarse de la respuesta apoptótica aumentada que manifiestan las células de dicho ratón frente a la producción de daño al DNA, debido a la mayor cantidad de p53 adicionada por el transgen, hecho crucial, el del aumento de los niveles de p53, para la inducción de apoptosis en lugar de senescencia (Chen, Liu et al. 2000). En concordancia, la presencia de una mutación que entorpece la inducción de apoptosis por parte de p53, la R172P (Attardi and DePinho 2004, Liu, Parant et al. 2004), muestra un fenotipo acelerado de envejecimiento que desencadena enfermedades asociadas a la senescencia como la diabetes tipo 2 (Tavana, Puebla-Osorio et al. 2010). Asimismo, en contraste a lo que sucede en modelos de ratón carentes de efectores clave de la senescencia celular, como p16INK4a o ARF (Sharpless, Ramsey et al. 2004), cuya incidencia de patologías cancerosas enmascara un posible efecto sobre el envejecimiento, probablemente a causa de un impedimento demasiado severo de la respuesta senescente, la modulación sutil del umbral de estrés desencadenante de senescencia o apoptosis puede causar efectos más controlables y, al fin y al cabo, provechosos mediante la interferencia moderada sobre las vías que lo controlan.



# Conclusiones



Primera. La mutación de la tirosina 53 de Spry1 entorpece la inducción de senescencia celular en contextos aparentemente dispares como el envejecimiento o la regeneración de heridas.

Segunda. Las proteínas de Spry son inducidas de manera temprana en la senescencia celular y mantienen elevados sus niveles a lo largo de esta respuesta.

Tercera. Las proteínas de Spry potencian los dos tipos de SASP descritos, el dependiente de NOTCH y el de NFκB.

Cuarta. Las proteínas de Spry activan la vía p38 en senescencia celular y promueven la inducción adecuada de esta respuesta en los distintos contextos estudiados, tanto in vitro como in vivo.

Quinta. La vía p38 reprime la inducción de los niveles de Spry1 en la etapa inicial de la senescencia.

Sexta. El estrés oxidativo incrementa los niveles de Spry1 por mecanismos post-transcripcionales.

Séptima. La inducción de Spry2 en senescencia, a diferencia de lo que sucede con Spry1, depende de la activación de ERK.

Octava. El análisis transcriptómico de la senescencia inducida por Spry1 desvela el control de p38 sobre múltiples elementos de SASP alternativos al SASP inflamatorio.

Novena. La inducción de senescencia por parte del eje Spry1-p38 favorece la resistencia a apoptosis frente a ciertos niveles de estrés celular.



# Bibliografía



Aarts, M., A. Georgilis, M. Beniazza, P. Beolchi, A. Banito, T. Carroll, M. Kulisic, D. F. Kaemena, G. Dharmalingam, N. Martin, W. Reik, J. Zuber, K. Kaji, T. Chandra and J. Gil (2017). "Coupling shRNA screens with single-cell RNA-seq identifies a dual role for mTOR in reprogramming-induced senescence." *Genes Dev* **31**(20): 2085-2098.

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

Acosta, J. C., A. O'Loughlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando and J. Gil (2008). "Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence." *Cell* **133**(6): 1006-1018.

Ahmad, G., B. C. Mohapatra, N. A. Schulte, S. A. Nadeau, H. Luan, N. Zutshi, E. Tom, C. Ortega-Cava, C. Tu, M. Sanada, S. Ogawa, M. L. Toews, V. Band and H. Band (2014). "Cbl-family ubiquitin ligases and their recruitment of CIN85 are largely dispensable for epidermal growth factor receptor endocytosis." *Int J Biochem Cell Biol* **57**: 123-134.

Aird, K. M., G. Zhang, H. Li, Z. Tu, B. G. Bitler, A. Garipov, H. Wu, Z. Wei, S. N. Wagner, M. Herlyn and R. Zhang (2013). "Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence." *Cell Rep* **3**(4): 1252-1265.

Aird, K. M. and R. Zhang (2013). "Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF)." *Methods Mol Biol* **965**: 185-196.

Aissouni, Y., G. Zapart, J. L. Iovanna, I. Dikic and P. Soubeyran (2005). "CIN85 regulates the ability of MEKK4 to activate the p38 MAP kinase pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2): 808-814.

Akita, S., K. Akino and A. Hirano (2013). "Basic Fibroblast Growth Factor in Scarless Wound Healing." *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**(2): 44-49.

Al-Shanti, N. and C. E. Stewart (2012). "Inhibitory effects of IL-6 on IGF-1 activity in skeletal myoblasts could be mediated by the activation of SOCS-3." *J Cell Biochem* **113**(3): 923-933.

Alexander, P. B., L. Yuan, P. Yang, T. Sun, R. Chen, H. Xiang, J. Chen, H. Wu, D. R. Radloff and X. F. Wang (2015). "EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence." *Cell Res* **25**(1): 135-138.

Alimonti, A., C. Nardella, Z. Chen, J. G. Clohessy, A. Carracedo, L. C. Trotman, K. Cheng, S. Varmeh, S. C. Kozma, G. Thomas, E. Rosivatz, R. Woscholski, F. Cognetti, H. I. Scher and P. P. Pandolfi (2010). "A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis." *J Clin Invest* **120**(3): 681-693.

Ambrosino, C., G. Mace, S. Galban, C. Fritsch, K. Vintersten, E. Black, M. Gorospe and A. R. Nebreda (2003). "Negative feedback regulation of MKK6 mRNA stability by p38alpha mitogen-activated protein kinase." *Mol Cell Biol* **23**(1): 370-381.

- Araki, T., H. Nawa and B. G. Neel (2003). "Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors." *J Biol Chem* **278**(43): 41677-41684.
- Aranda, S., M. Alvarez, S. Turro, A. Laguna and S. de la Luna (2008). "Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A." *Mol Cell Biol* **28**(19): 5899-5911.
- Ashwell, J. D. (2006). "The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system." *Nat Rev Immunol* **6**(7): 532-540.
- Astle, M. V., K. M. Hannan, P. Y. Ng, R. S. Lee, A. J. George, A. K. Hsu, Y. Haupt, R. D. Hannan and R. B. Pearson (2012). "AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy." *Oncogene* **31**(15): 1949-1962.
- Attardi, L. D. and R. A. DePinho (2004). "Conquering the complexity of p53." *Nat Genet* **36**(1): 7-8.
- Baar, M. P., R. M. C. Brandt, D. A. Putavet, J. D. D. Klein, K. W. J. Derks, B. R. M. Bourgeois, S. Stryeck, Y. Rijksen, H. van Willigenburg, D. A. Feijtel, I. van der Pluijm, J. Essers, W. A. van Cappellen, I. W. F. van, A. B. Houtsmuller, J. Pothof, R. W. F. de Bruin, T. Madl, J. H. J. Hoeijmakers, J. Campisi and P. L. J. de Keizer (2017). "Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging." *Cell* **169**(1): 132-147 e116.
- Baird, K., S. Davis, C. R. Antonescu, U. L. Harper, R. L. Walker, Y. Chen, A. A. Glatfelter, P. H. Duray and P. S. Meltzer (2005). "Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology." *Cancer Res* **65**(20): 9226-9235.
- Baker, D. J., B. G. Childs, M. Durik, M. E. Wijers, C. J. Sieben, J. Zhong, R. A. Saltness, K. B. Jeganathan, G. C. Verzosa, A. Pezeshki, K. Khazaie, J. D. Miller and J. M. van Deursen (2016). "Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan." *Nature* **530**(7589): 184-189.
- Baker, D. J., C. Perez-Terzic, F. Jin, K. S. Pitel, N. J. Niederlander, K. Jeganathan, S. Yamada, S. Reyes, L. Rowe, H. J. Hiddinga, N. L. Eberhardt, A. Terzic and J. M. van Deursen (2008). "Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency." *Nat Cell Biol* **10**(7): 825-836.
- Baker, D. J., T. Wijshake, T. Tchkonina, N. K. LeBrasseur, B. G. Childs, B. van de Sluis, J. L. Kirkland and J. M. van Deursen (2011). "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders." *Nature* **479**(7372): 232-236.
- Balducci, L. and W. B. Ershler (2005). "Cancer and ageing: a nexus at several levels." *Nat Rev Cancer* **5**(8): 655-662.
- Bao, P., A. Kodra, M. Tomic-Canic, M. S. Golinko, H. P. Ehrlich and H. Brem (2009). "The role of vascular endothelial growth factor in wound healing." *J Surg Res* **153**(2): 347-358.
- Barascu, A., C. Le Chalony, G. Pennarun, D. Genet, N. Imam, B. Lopez and P. Bertrand (2012). "Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation." *EMBO J* **31**(5): 1080-1094.

Barbachano, A., P. Ordonez-Moran, J. M. Garcia, A. Sanchez, F. Pereira, M. J. Larriba, N. Martinez, J. Hernandez, S. Landolfi, F. Bonilla, H. G. Palmer, J. M. Rojas and A. Munoz (2010). "SPROUTY-2 and E-cadherin regulate reciprocally and dictate colon cancer cell tumorigenicity." *Oncogene* **29**(34): 4800-4813.

Barradas, M., E. Anderton, J. C. Acosta, S. Li, A. Banito, M. Rodriguez-Niedenfuhr, G. Maertens, M. Banck, M. M. Zhou, M. J. Walsh, G. Peters and J. Gil (2009). "Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS." *Genes Dev* **23**(10): 1177-1182.

Barsoum, I. and H. H. Yao (2006). "The road to maleness: from testis to Wolffian duct." *Trends Endocrinol Metab* **17**(6): 223-228.

Bartholomew, J. N., D. Volonte and F. Galbiati (2009). "Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway." *Cancer Res* **69**(7): 2878-2886.

Barzilai, A. and K. Yamamoto (2004). "DNA damage responses to oxidative stress." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 1109-1115.

Basson, M. A., S. Akbulut, J. Watson-Johnson, R. Simon, T. J. Carroll, R. Shakya, I. Gross, G. R. Martin, T. Lufkin, A. P. McMahon, P. D. Wilson, F. D. Costantini, I. J. Mason and J. D. Licht (2005). "Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction." *Dev Cell* **8**(2): 229-239.

Basson, M. A., J. Watson-Johnson, R. Shakya, S. Akbulut, D. Hyink, F. D. Costantini, P. D. Wilson, I. J. Mason and J. D. Licht (2006). "Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1." *Dev Biol* **299**(2): 466-477.

Bensaad, K., A. Tsuruta, M. A. Selak, M. N. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb and K. H. Vousden (2006). "TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis." *Cell* **126**(1): 107-120.

Bent, E. H., L. A. Gilbert and M. T. Hemann (2016). "A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses." *Genes Dev* **30**(16): 1811-1821.

Bittles, A. H. and N. Harper (1984). "Increased glycolysis in ageing cultured human diploid fibroblasts." *Biosci Rep* **4**(9): 751-756.

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): 159-165.

Blagosklonny, M. V. (2017). "From rapalogs to anti-aging formula." *Oncotarget* **8**(22): 35492-35507.

Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). "uPAR: a versatile signalling orchestrator." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 932-943.

Bluwstein, A., N. Kumar, K. Leger, J. Traenkle, J. Oostrum, H. Rehrauer, M. Baudis and M. O. Hottiger (2013). "PKC signaling prevents irradiation-induced apoptosis of primary human fibroblasts." *Cell Death Dis* **4**: e498.

Borthakur, G., S. Duvvuri, V. Ruvolo, D. N. Tripathi, S. Piya, J. Burks, R. Jacamo, K. Kojima, P. Ruvolo, J. Fueyo-Margareto, M. Konopleva and M. Andreeff (2015). "MDM2 Inhibitor, Nutlin 3a, Induces p53 Dependent Autophagy in Acute Leukemia by AMP Kinase Activation." *PLoS One* **10**(10): e0139254.

Bracci, L., G. Schiavoni, A. Sistigu and F. Belardelli (2014). "Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer." *Cell Death Differ* **21**(1): 15-25.

Bracken, A. P., D. Kleine-Kohlbrecher, N. Dietrich, D. Pasini, G. Gargiulo, C. Beekman, K. Theilgaard-Monch, S. Minucci, B. T. Porse, J. C. Marine, K. H. Hansen and K. Helin (2007). "The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells." *Genes Dev* **21**(5): 525-530.

Bradham, C. and D. R. McClay (2006). "p38 MAPK in development and cancer." *Cell Cycle* **5**(8): 824-828.

Bruins, W., E. Zwart, L. D. Attardi, T. Iwakuma, E. M. Hoogervorst, R. B. Beems, B. Miranda, C. T. van Oostrom, J. van den Berg, G. J. van den Aardweg, G. Lozano, H. van Steeg, T. Jacks and A. de Vries (2004). "Increased sensitivity to UV radiation in mice with a p53 point mutation at Ser389." *Mol Cell Biol* **24**(20): 8884-8894.

Bulavin, D. V., O. Kovalsky, M. C. Hollander and A. J. Fornace, Jr. (2003). "Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a." *Mol Cell Biol* **23**(11): 3859-3871.

Bulavin, D. V., C. Phillips, B. Nannenga, O. Timofeev, L. A. Donehower, C. W. Anderson, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (2004). "Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway." *Nat Genet* **36**(4): 343-350.

Bulavin, D. V., S. Saito, M. C. Hollander, K. Sakaguchi, C. W. Anderson, E. Appella and A. J. Fornace, Jr. (1999). "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation." *EMBO J* **18**(23): 6845-6854.

Bussian, T. J., A. Aziz, C. F. Meyer, B. L. Swenson, J. M. van Deursen and D. J. Baker (2018). "Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline." *Nature* **562**(7728): 578-582.

Cabrita, M. A. and G. Christofori (2008). "Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling." *Angiogenesis* **11**(1): 53-62.

Cabrita, M. A., F. Jaggi, S. P. Widjaja and G. Christofori (2006). "A functional interaction between sprouty proteins and caveolin-1." *J Biol Chem* **281**(39): 29201-29212.

Campisi, J. (2005). "Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act!" *Mech Ageing Dev* **126**(1): 51-58.

Capell, B. C., A. M. Drake, J. Zhu, P. P. Shah, Z. Dou, J. Dorsey, D. F. Simola, G. Donahue, M. Sammons, T. S. Rai, C. Natale, T. W. Ridky, P. D. Adams and S. L. Berger (2016). "MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype." *Genes Dev* **30**(3): 321-336.

Chakkalakal, J. V., K. M. Jones, M. A. Basson and A. S. Brack (2012). "The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence." *Nature* **490**(7420): 355-360.

Chan, G., D. Kalaitzidis and B. G. Neel (2008). "The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer." *Cancer Metastasis Rev* **27**(2): 179-192.

Chandra, T., K. Kirschner, J. Y. Thuret, B. D. Pope, T. Ryba, S. Newman, K. Ahmed, S. A. Samarajiwa, R. Salama, T. Carroll, R. Stark, R. Janky, M. Narita, L. Xue, A. Chicas, S. Nunez, R. Janknecht, Y. Hayashi-Takanaka, M. D. Wilson, A. Marshall, D. T. Odom, M. M. Babu, D. P. Bazett-Jones, S. Tavaré, P. A. Edwards, S. W. Lowe, H. Kimura, D. M. Gilbert and M. Narita (2012). "Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation." *Mol Cell* **47**(2): 203-214.

Chandra, T. and M. Narita (2013). "High-order chromatin structure and the epigenome in SAHFs." *Nucleus* **4**(1): 23-28.

Chandramouli, S., C. Y. Yu, P. Yusoff, D. H. Lao, H. F. Leong, K. Mizuno and G. R. Guy (2008). "Task1 interacts with Spry2 to abrogate its inhibition of ERK phosphorylation downstream of receptor tyrosine kinase signaling." *J Biol Chem* **283**(3): 1679-1691.

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

Chen, J. (2016). "The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression." *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**(3): a026104.

Chen, P. Y., L. Qin, C. Barnes, K. Charisse, T. Yi, X. Zhang, R. Ali, P. P. Medina, J. Yu, F. J. Slack, D. G. Anderson, V. Kotelianski, F. Wang, G. Tellides and M. Simons (2012). "FGF regulates TGF-beta signaling and endothelial-to-mesenchymal transition via control of let-7 miRNA expression." *Cell Rep* **2**(6): 1684-1696.

Chen, Q. M., J. Liu and J. B. Merrett (2000). "Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts." *Biochem J* **347**(Pt 2): 543-551.

Chen, X., S. T. Cheung, S. So, S. T. Fan, C. Barry, J. Higgins, K. M. Lai, J. Ji, S. Dudoit, I. O. Ng, M. Van De Rijn, D. Botstein and P. O. Brown (2002). "Gene expression patterns in human liver cancers." *Mol Biol Cell* **13**(6): 1929-1939.

Chen, Y. N., M. J. LaMarche, H. M. Chan, P. Fekkes, J. Garcia-Fortanet, M. G. Acker, B. Antonakos, C. H. Chen, Z. Chen, V. G. Cooke, J. R. Dobson, Z. Deng, F. Fei, B. Firestone, M. Fodor, C. Fridrich, H. Gao, D. Grunenfelder, H. X. Hao, J. Jacob, S. Ho, K. Hsiao, Z. B. Kang, R. Karki, M. Kato, J. Larrow, L. R. La Bonte, F. Lenoir, G. Liu, S. Liu, D. Majumdar, M. J. Meyer, M. Palermo, L. Perez, M. Pu, E. Price, C. Quinn, S. Shakya, M. D. Shultz, J. Slisz, K. Venkatesan, P. Wang, M. Warmuth, S. Williams, G. Yang, J. Yuan, J. H. Zhang, P. Zhu, T. Ramsey, N. J. Keen, W. R. Sellers, T. Stams and P. D. Fortin (2016). "Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases." *Nature* **535**(7610): 148-152.

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

- Chesnokova, V., C. Zhou, A. Ben-Shlomo, S. Zonis, Y. Tani, S. G. Ren and S. Melmed (2013). "Growth hormone is a cellular senescence target in pituitary and nonpituitary cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(35): E3331-3339.
- Chew, J., S. Biswas, S. Shreeram, M. Humaidi, E. T. Wong, M. K. Dhillon, H. Teo, A. Hazra, C. C. Fang, E. Lopez-Collazo, D. V. Bulavin and V. Tergaonkar (2009). "WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling." Nat Cell Biol **11**(5): 659-666.
- Chien, Y., C. Scuoppo, X. Wang, X. Fang, B. Balgley, J. E. Bolden, P. Premssrirut, W. Luo, A. Chicas, C. S. Lee, S. C. Kogan and S. W. Lowe (2011). "Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity." Genes Dev **25**(20): 2125-2136.
- Childs, B. G., D. J. Baker, J. L. Kirkland, J. Campisi and J. M. van Deursen (2014). "Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?" EMBO Rep **15**(11): 1139-1153.
- Childs, B. G., D. J. Baker, T. Wijshake, C. A. Conover, J. Campisi and J. M. van Deursen (2016). "Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis." Science **354**(6311): 472-477.
- Childs, B. G., M. Durik, D. J. Baker and J. M. van Deursen (2015). "Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy." Nat Med **21**(12): 1424-1435.
- Childs, B. G., M. Gluscevic, D. J. Baker, R. M. Laberge, D. Marquess, J. Dananberg and J. M. van Deursen (2017). "Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing." Nat Rev Drug Discov **16**(10): 718-735.
- Ching, S. T., G. R. Cunha, L. S. Baskin, M. A. Basson and O. D. Klein (2014). "Coordinated activity of Spry1 and Spry2 is required for normal development of the external genitalia." Dev Biol **386**(1): 1-11.
- Chretien, A., N. Piront, E. Delaive, C. Demazy, N. Ninane and O. Toussaint (2008). "Increased abundance of cytoplasmic and nuclear caveolin 1 in human diploid fibroblasts in H(2)O(2)-induced premature senescence and interplay with p38alpha(MAPK)." FEBS Lett **582**(12): 1685-1692.
- Christofori, G. (2003). "Split personalities: the agonistic antagonist Sprouty." Nat Cell Biol **5**(5): 377-379.
- Colavitti, R. and T. Finkel (2005). "Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence." IUBMB Life **57**(4-5): 277-281.
- Collado, M., M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." Cell **130**(2): 223-233.
- Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid, D. Beach and M. Serrano (2005). "Tumour biology: senescence in premalignant tumours." Nature **436**(7051): 642.
- Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." Nat Rev Cancer **10**(1): 51-57.
- Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annu Rev Pathol **5**: 99-118.

Coppe, J. P., K. Kauser, J. Campisi and C. M. Beausejour (2006). "Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence." *J Biol Chem* **281**(40): 29568-29574.

Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez and J. Campisi (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* **6**(12): 2853-2868.

Coppe, J. P., F. Rodier, C. K. Patil, A. Freund, P. Y. Desprez and J. Campisi (2011). "Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype." *J Biol Chem* **286**(42): 36396-36403.

Correia-Melo, C., F. D. Marques, R. Anderson, G. Hewitt, R. Hewitt, J. Cole, B. M. Carroll, S. Miwa, J. Birch, A. Merz, M. D. Rushton, M. Charles, D. Jurk, S. W. Tait, R. Czapiewski, L. Greaves, G. Nelson, Y. M. Bohlooly, S. Rodriguez-Cuenca, A. Vidal-Puig, D. Mann, G. Saretzki, G. Quarato, D. R. Green, P. D. Adams, T. von Zglinicki, V. I. Korolchuk and J. F. Passos (2016). "Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype." *EMBO J* **35**(7): 724-742.

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

Coutu, D. L., M. Francois and J. Galipeau (2011). "Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells." *Blood* **117**(25): 6801-6812.

Coutu, D. L. and J. Galipeau (2011). "Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging." *Aging (Albany NY)* **3**(10): 920-933.

Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." *Biochem J* **429**(3): 403-417.

Culerrier, R., M. Carraz, C. Mann and M. Djabali (2016). "MSK1 triggers the expression of the INK4AB/ARF locus in oncogene-induced senescence." *Mol Biol Cell* **27**(17): 2726-2734.

d'Adda di Fagagna, F. (2008). "Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response." *Nat Rev Cancer* **8**(7): 512-522.

d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter and S. P. Jackson (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* **426**(6963): 194-198.

D'Cruz, A. A., J. J. Babon, R. S. Norton, N. A. Nicola and S. E. Nicholson (2013). "Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity." *Protein Sci* **22**(1): 1-10.

Dalle Pezze, P., S. Ruf, A. G. Sonntag, M. Langelaar-Makkinje, P. Hall, A. M. Heberle, P. Razquin Navas, K. van Eunen, R. C. Tolle, J. J. Schwarz, H. Wiese, B. Warscheid, J. Deitersen, B. Stork, E. Fassler, S. Schauble, U. Hahn, P. Horvatovich, D. P. Shanley and K. Thedieck (2016). "A systems study reveals concurrent activation of AMPK and mTOR by amino acids." *Nat Commun* **7**: 13254.

Danckwardt, S., A. S. Gantzert, S. Macher-Goeppinger, H. C. Probst, M. Gentzel, M. Wilm, H. J. Grone, P. Schirmacher, M. W. Hentze and A. E. Kulozik (2011). "p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing." *Mol Cell* **41**(3): 298-310.

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

Darimipourain, M., S. Wang, M. Ittmann and B. Kwabi-Addo (2011). "Transcriptional and post-transcriptional regulation of Sprouty1, a receptor tyrosine kinase inhibitor in prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis **14**(4): 279-285.

Dasari, A., J. N. Bartholomew, D. Volonte and F. Galbiati (2006). "Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements." Cancer Res **66**(22): 10805-10814.

DaSilva, J., L. Xu, H. J. Kim, W. T. Miller and D. Bar-Sagi (2006). "Regulation of sprouty stability by Mnk1-dependent phosphorylation." Mol Cell Biol **26**(5): 1898-1907.

Davalos, A. R., J. P. Coppe, J. Campisi and P. Y. Desprez (2010). "Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 273-283.

Davalos, A. R., M. Kawahara, G. K. Malhotra, N. Schaum, J. Huang, U. Ved, C. M. Beausejour, J. P. Coppe, F. Rodier and J. Campisi (2013). "p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes." J Cell Biol **201**(4): 613-629.

de Magalhaes, J. P. and J. F. Passos (2018). "Stress, cell senescence and organismal ageing." Mech Ageing Dev **170**: 2-9.

de Maximy, A. A., Y. Nakatake, S. Moncada, N. Itoh, J. P. Thiery and S. Bellusci (1999). "Cloning and expression pattern of a mouse homologue of drosophila sprouty in the mouse embryo." Mech Dev **81**(1-2): 213-216.

Debacq-Chainiaux, F., E. Boilan, J. Dedessus Le Moutier, G. Weemaels and O. Toussaint (2010). "p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts." Adv Exp Med Biol **694**: 126-137.

Debacq-Chainiaux, F., C. Borlon, T. Pascal, V. Royer, F. Eliaers, N. Ninane, G. Carrard, B. Friguier, F. de Longueville, S. Boffe, J. Remacle and O. Toussaint (2005). "Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway." J Cell Sci **118**(Pt 4): 743-758.

Debacq-Chainiaux, F., J. D. Erusalimsky, J. Campisi and O. Toussaint (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." Nat Protoc **4**(12): 1798-1806.

Demaria, M., M. N. O'Leary, J. Chang, L. Shao, S. Liu, F. Alimirah, K. Koenig, C. Le, N. Mitin, A. M. Deal, S. Alston, E. C. Academia, S. Kilmarx, A. Valdovinos, B. Wang, A. de Bruin, B. K. Kennedy, S. Melov, D. Zhou, N. E. Sharpless, H. Muss and J. Campisi (2017). "Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse." Cancer Discov **7**(2): 165-176.

Demaria, M., N. Ohtani, S. A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, J. R. Mitchell, R. M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, M. E. Dolle, J. H. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara and J. Campisi (2014). "An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA." Dev Cell **31**(6): 722-733.

- Demidenko, Z. N. and M. V. Blagosklonny (2009). "Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential." *Aging (Albany NY)* **1**(12): 1008-1016.
- Denu, J. M. and K. G. Tanner (1998). "Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation." *Biochemistry* **37**(16): 5633-5642.
- Desai, L. P., Y. Zhou, A. V. Estrada, Q. Ding, G. Cheng, J. F. Collawn and V. J. Thannickal (2014). "Negative regulation of NADPH oxidase 4 by hydrogen peroxide-inducible clone 5 (Hic-5) protein." *J Biol Chem* **289**(26): 18270-18278.
- Deschenes-Simard, X., M. F. Gaumont-Leclerc, V. Bourdeau, F. Lessard, O. Moiseeva, V. Forest, S. Igelmann, F. A. Mallette, M. K. Saba-El-Leil, S. Meloche, F. Saad, A. M. Mes-Masson and G. Ferbeyre (2013). "Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation." *Genes Dev* **27**(8): 900-915.
- Dhanasekaran, D. N. and E. P. Reddy (2008). "JNK signaling in apoptosis." *Oncogene* **27**(48): 6245-6251.
- Dhomen, N., J. S. Reis-Filho, S. da Rocha Dias, R. Hayward, K. Savage, V. Delmas, L. Larue, C. Pritchard and R. Marais (2009). "Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice." *Cancer Cell* **15**(4): 294-303.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci and F. d'Adda di Fagagna (2006). "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication." *Nature* **444**(7119): 638-642.
- Dickson, M. A. (2014). "Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy." *Clin Cancer Res* **20**(13): 3379-3383.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-9367.
- Ding, W., S. Bellusci, W. Shi and D. Warburton (2003). "Functional analysis of the human Sprouty2 gene promoter." *Gene* **322**: 175-185.
- Ding, W., S. Bellusci, W. Shi and D. Warburton (2004). "Genomic structure and promoter characterization of the human Sprouty4 gene, a novel regulator of lung morphogenesis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(1): L52-59.
- Ding, W., W. Shi, S. Bellusci, J. Groffen, N. Heisterkamp, P. Minoo and D. Warburton (2007). "Sprouty2 downregulation plays a pivotal role in mediating crosstalk between TGF-beta1 signaling and EGF as well as FGF receptor tyrosine kinase-ERK pathways in mesenchymal cells." *J Cell Physiol* **212**(3): 796-806.
- Ding, W. and D. Warburton (2008). "Down-regulation of Sprouty2 via p38 MAPK plays a key role in the induction of cellular apoptosis by tumor necrosis factor-alpha." *Biochem Biophys Res Commun* **375**(3): 460-464.
- Dolado, I., A. Swat, N. Ajenjo, G. De Vita, A. Cuadrado and A. R. Nebreda (2007). "p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis." *Cancer Cell* **11**(2): 191-205.

Dorr, J. R., Y. Yu, M. Milanovic, G. Beuster, C. Zasada, J. H. Dabritz, J. Lisec, D. Lenze, A. Gerhardt, K. Schleicher, S. Kratzat, B. Purfurst, S. Walenta, W. Mueller-Klieser, M. Graler, M. Hummel, U. Keller, A. K. Buck, B. Dorken, L. Willmitzer, M. Reimann, S. Kempa, S. Lee and C. A. Schmitt (2013). "Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy." *Nature* **501**(7467): 421-425.

Dosil, M. A., C. Mirantes, N. Eritja, I. Felip, R. Navaridas, S. Gatius, M. Santacana, E. Colas, C. Moiola, J. A. Schoenenberger, M. Encinas, E. Gari, X. Matias-Guiu and X. Dolcet (2017). "Palbociclib has antitumour effects on Pten-deficient endometrial neoplasias." *J Pathol* **242**(2): 152-164.

Edwin, F., K. Anderson and T. B. Patel (2010). "HECT domain-containing E3 ubiquitin ligase Nedd4 interacts with and ubiquitinates Sprouty2." *J Biol Chem* **285**(1): 255-264.

Edwin, F., K. Anderson, C. Ying and T. B. Patel (2009). "Intermolecular interactions of Sprouty proteins and their implications in development and disease." *Mol Pharmacol* **76**(4): 679-691.

Efeyan, A. and M. Serrano (2007). "p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes." *Cell Cycle* **6**(9): 1006-1010.

Eren, M., A. E. Boe, S. B. Murphy, A. T. Place, V. Nagpal, L. Morales-Nebreda, D. Urich, S. E. Quaggin, G. R. Budinger, G. M. Mutlu, T. Miyata and D. E. Vaughan (2014). "PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(19): 7090-7095.

Evangelou, K., J. Bartkova, A. Kotsinas, I. S. Pateras, M. Liontos, G. Velimezi, M. Kosar, T. Liloglou, I. P. Trougakos, L. Dyrskjot, C. L. Andersen, M. Papaioannou, Y. Drosos, G. Papafotiou, Z. Hodny, B. Sosa-Pineda, X. R. Wu, A. Klinakis, T. Orntoft, J. Lukas, J. Bartek and V. G. Gorgoulis (2013). "The DNA damage checkpoint precedes activation of ARF in response to escalating oncogenic stress during tumorigenesis." *Cell Death Differ* **20**(11): 1485-1497.

Faratian, D., A. H. Sims, P. Mullen, C. Kay, I. Um, S. P. Langdon and D. J. Harrison (2011). "Sprouty 2 is an independent prognostic factor in breast cancer and may be useful in stratifying patients for trastuzumab therapy." *PLoS One* **6**(8): e23772.

Faust, D., I. Dolado, A. Cuadrado, F. Oesch, C. Weiss, A. R. Nebreda and C. Dietrich (2005). "p38alpha MAPK is required for contact inhibition." *Oncogene* **24**(53): 7941-7945.

Feng, Z., W. Hu, E. de Stanchina, A. K. Teresky, S. Jin, S. Lowe and A. J. Levine (2007). "The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways." *Cancer Res* **67**(7): 3043-3053.

Feringa, F. M., J. A. Raaijmakers, M. A. Hadders, C. Vaarting, L. Macurek, L. Heitink, L. Krenning and R. H. Medema (2018). "Persistent repair intermediates induce senescence." *Nat Commun* **9**(1): 3923.

Flatt, T. (2012). "A new definition of aging?" *Front Genet* **3**: 148.

Fong, C. W., M. S. Chua, A. B. McKie, S. H. Ling, V. Mason, R. Li, P. Yusoff, T. L. Lo, H. Y. Leung, S. K. So and G. R. Guy (2006). "Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma." *Cancer Res* **66**(4): 2048-2058.

- Fontana, L., S. E. Mitchell, B. Wang, V. Tosti, T. van Vliet, N. Veronese, B. Bertozzi, D. S. Early, P. Maissan, J. R. Speakman and M. Demaria (2018). "The effects of graded caloric restriction: XII. Comparison of mouse to human impact on cellular senescence in the colon." *Aging Cell* **17**(3): e12746.
- Fontana, L., J. Nehme and M. Demaria (2018). "Caloric restriction and cellular senescence." *Mech Ageing Dev* **176**: 19-23.
- Fontana, L., L. Partridge and V. D. Longo (2010). "Extending healthy life span--from yeast to humans." *Science* **328**(5976): 321-326.
- Freund, A., A. V. Orjalo, P. Y. Desprez and J. Campisi (2010). "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences." *Trends Mol Med* **16**(5): 238-246.
- Freund, A., C. K. Patil and J. Campisi (2011). "p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype." *EMBO J* **30**(8): 1536-1548.
- Frevel, M. A., T. Bakheet, A. M. Silva, J. G. Hissong, K. S. Khabar and B. R. Williams (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts." *Mol Cell Biol* **23**(2): 425-436.
- Frey, M. R., R. S. Dize, K. L. Edelblum and D. B. Polk (2006). "p38 kinase regulates epidermal growth factor receptor downregulation and cellular migration." *EMBO J* **25**(24): 5683-5692.
- Fridman, J. S. and S. W. Lowe (2003). "Control of apoptosis by p53." *Oncogene* **22**(56): 9030-9040.
- Fuchs, Y. and H. Steller (2011). "Programmed cell death in animal development and disease." *Cell* **147**(4): 742-758.
- Fuhrmann-Stroissnigg, H., Y. Y. Ling, J. Zhao, S. J. McGowan, Y. Zhu, R. W. Brooks, D. Grassi, S. Q. Gregg, J. L. Stripay, A. Dorronsoro, L. Corbo, P. Tang, C. Bukata, N. Ring, M. Giacca, X. Li, T. Tchkonja, J. L. Kirkland, L. J. Niedernhofer and P. D. Robbins (2017). "Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics." *Nat Commun* **8**(1): 422.
- Fujikawa, M., K. Kobayashi and T. Kozawa (2012). "Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction." *J Biol Chem* **287**(42): 35702-35708.
- Galbiati, F., D. Volonte, J. A. Engelman, G. Watanabe, R. Burk, R. G. Pestell and M. P. Lisanti (1998). "Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade." *EMBO J* **17**(22): 6633-6648.
- Garcia-Cao, I., M. Garcia-Cao, J. Martin-Caballero, L. M. Criado, P. Klatt, J. M. Flores, J. C. Weill, M. A. Blasco and M. Serrano (2002). "'Super p53' mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally." *EMBO J* **21**(22): 6225-6235.
- Gil, J., D. Bernard, D. Martinez and D. Beach (2004). "Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan." *Nat Cell Biol* **6**(1): 67-72.
- Gil-Araujo, B., M. V. Toledo Lobo, M. Gutierrez-Salmeron, J. Gutierrez-Pitalua, S. Roperro, J. C. Angulo, A. Chiloeches and M. Lasa (2014). "Dual specificity phosphatase 1 expression inversely

correlates with NF-kappaB activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through a p38 MAPK dependent mechanism." *Mol Oncol* **8**(1): 27-38.

Gong, X., A. Liu, X. Ming, P. Deng and Y. Jiang (2010). "UV-induced interaction between p38 MAPK and p53 serves as a molecular switch in determining cell fate." *FEBS Lett* **584**(23): 4711-4716.

Gorgoulis, V. G. and T. D. Halazonetis (2010). "Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response." *Curr Opin Cell Biol* **22**(6): 816-827.

Gross, I., B. Bassit, M. Benezra and J. D. Licht (2001). "Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation." *J Biol Chem* **276**(49): 46460-46468.

Gubern, A., M. Joaquin, M. Marques, P. Maseres, J. Garcia-Garcia, R. Amat, D. Gonzalez-Nunez, B. Oliva, F. X. Real, E. de Nadal and F. Posas (2016). "The N-Terminal Phosphorylation of RB by p38 Bypasses Its Inactivation by CDKs and Prevents Proliferation in Cancer Cells." *Mol Cell* **64**(1): 25-36.

Gutierrez-Uzquiza, A., M. Arechederra, P. Bragado, J. A. Aguirre-Ghiso and A. Porras (2012). "p38alpha mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway." *J Biol Chem* **287**(4): 2632-2642.

Guy, G. R., R. A. Jackson, P. Yusoff and S. Y. Chow (2009). "Sprouty proteins: modified modulators, matchmakers or missing links?" *J Endocrinol* **203**(2): 191-202.

Hacohen, N., S. Kramer, D. Sutherland, Y. Hiromi and M. A. Krasnow (1998). "sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways." *Cell* **92**(2): 253-263.

Haglund, K., M. H. Schmidt, E. S. Wong, G. R. Guy and I. Dikic (2005). "Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation." *EMBO Rep* **6**(7): 635-641.

Halazonetis, T. D., V. G. Gorgoulis and J. Bartek (2008). "An oncogene-induced DNA damage model for cancer development." *Science* **319**(5868): 1352-1355.

Han, J. and P. Sun (2007). "The pathways to tumor suppression via route p38." *Trends Biochem Sci* **32**(8): 364-371.

Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga, K. Matsumoto and E. Nishida (2004). "Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty." *J Biol Chem* **279**(22): 22992-22995.

Hanafusa, H., S. Torii, T. Yasunaga and E. Nishida (2002). "Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway." *Nat Cell Biol* **4**(11): 850-858.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(4): 251-262.

Hardy, T., F. Oakley, Q. M. Anstee and C. P. Day (2016). "Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum." *Annu Rev Pathol* **11**: 451-496.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.

He, S. and N. E. Sharpless (2017). "Senescence in Health and Disease." Cell **169**(6): 1000-1011.

Herbig, U., M. Ferreira, L. Condel, D. Carey and J. M. Sedivy (2006). "Cellular senescence in aging primates." Science **311**(5765): 1257.

Herbig, U., W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen and J. M. Sedivy (2004). "Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)." Mol Cell **14**(4): 501-513.

Hernandez-Segura, A., T. V. de Jong, S. Melov, V. Guryev, J. Campisi and M. Demaria (2017). "Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells." Curr Biol **27**(17): 2652-2660 e2654.

Herranz, N., S. Gallage, M. Mellone, T. Wuestefeld, S. Klotz, C. J. Hanley, S. Raguz, J. C. Acosta, A. J. Innes, A. Banito, A. Georgilis, A. Montoya, K. Wolter, G. Dharmalingam, P. Faull, T. Carroll, J. P. Martinez-Barbera, P. Cutillas, F. Reisinger, M. Heikenwalder, R. A. Miller, D. Withers, L. Zender, G. J. Thomas and J. Gil (2015). "mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype." Nat Cell Biol **17**(9): 1205-1217.

Hicks, K. C. and T. B. Patel (2017). "Sprouty2 protein regulates hypoxia-inducible factor-alpha (HIFalpha) protein levels and transcription of HIFalpha-responsive genes." J Biol Chem **292**(7): 3060.

Hoare, M., Y. Ito, T. W. Kang, M. P. Weekes, N. J. Matheson, D. A. Patten, S. Shetty, A. J. Parry, S. Menon, R. Salama, R. Antrobus, K. Tomimatsu, W. Howat, P. J. Lehner, L. Zender and M. Narita (2016). "NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence." Nat Cell Biol **18**(9): 979-992.

Hoffmann, A. and D. Baltimore (2006). "Circuitry of nuclear factor kappaB signaling." Immunol Rev **210**: 171-186.

Holgren, C., U. Dougherty, F. Edwin, D. Cerasi, I. Taylor, A. Fichera, L. Joseph, M. Bissonnette and S. Khare (2010). "Sprouty-2 controls c-Met expression and metastatic potential of colon cancer cells: sprouty/c-Met upregulation in human colonic adenocarcinomas." Oncogene **29**(38): 5241-5253.

Hsieh, C. C. and J. Papaconstantinou (2002). "The effect of aging on p38 signaling pathway activity in the mouse liver and in response to ROS generated by 3-nitropropionic acid." Mech Ageing Dev **123**(11): 1423-1435.

Hu, J. and S. R. Hubbard (2005). "Structural characterization of a novel Cbl phosphotyrosine recognition motif in the APS family of adapter proteins." J Biol Chem **280**(19): 18943-18949.

Hu, Z., H. Fang, X. Wang, D. Chen, Z. Chen and S. Wang (2014). "Overexpression of SHP2 tyrosine phosphatase promotes the tumorigenesis of breast carcinoma." Oncol Rep **32**(1): 205-212.

Igea, A. and A. R. Nebreda (2015). "The Stress Kinase p38alpha as a Target for Cancer Therapy." Cancer Res **75**(19): 3997-4002.

Impagnatiello, M. A., S. Weitzer, G. Gannon, A. Compagni, M. Cotten and G. Christofori (2001). "Mammalian sprouty-1 and -2 are membrane-anchored phosphoprotein inhibitors of growth factor signaling in endothelial cells." *J Cell Biol* **152**(5): 1087-1098.

Itahana, K., Y. Zou, Y. Itahana, J. L. Martinez, C. Beausejour, J. J. Jacobs, M. Van Lohuizen, V. Band, J. Campisi and G. P. Dimri (2003). "Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1." *Mol Cell Biol* **23**(1): 389-401.

Ito, K., A. Hirao, F. Arai, K. Takubo, S. Matsuoka, K. Miyamoto, M. Ohmura, K. Naka, K. Hosokawa, Y. Ikeda and T. Suda (2006). "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells." *Nat Med* **12**(4): 446-451.

Ito, Y., M. Hoare and M. Narita (2017). "Spatial and Temporal Control of Senescence." *Trends Cell Biol* **27**(11): 820-832.

Iwasa, H., J. Han and F. Ishikawa (2003). "Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway." *Genes Cells* **8**(2): 131-144.

Jarvis, L. A., S. J. Toering, M. A. Simon, M. A. Krasnow and R. K. Smith-Bolton (2006). "Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases." *Development* **133**(6): 1133-1142.

Johnson, S. C., P. S. Rabinovitch and M. Kaeberlein (2013). "mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease." *Nature* **493**(7432): 338-345.

Jones, R. G., D. R. Plas, S. Kubek, M. Buzzai, J. Mu, Y. Xu, M. J. Birnbaum and C. B. Thompson (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." *Mol Cell* **18**(3): 283-293.

Joshi, S. and L. C. Platanius (2014). "Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes." *World J Biol Chem* **5**(3): 321-333.

Jun, J. I. and L. F. Lau (2010). "The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing." *Nat Cell Biol* **12**(7): 676-685.

Kang, C., Q. Xu, T. D. Martin, M. Z. Li, M. Demaria, L. Aron, T. Lu, B. A. Yankner, J. Campisi and S. J. Elledge (2015). "The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4." *Science* **349**(6255): aaa5612.

Kaplon, J., L. Zheng, K. Meissl, B. Chaneton, V. A. Selivanov, G. Mackay, S. H. van der Burg, E. M. Verdegaal, M. Cascante, T. Shlomi, E. Gottlieb and D. S. Peeper (2013). "A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence." *Nature* **498**(7452): 109-112.

Katoh, Y. and M. Katoh (2006). "FGF signaling inhibitor, SPRY4, is evolutionarily conserved target of WNT signaling pathway in progenitor cells." *Int J Mol Med* **17**(3): 529-532.

Khalil, A., R. N. Morgan, B. R. Adams, S. E. Golding, S. M. Dever, E. Rosenberg, L. F. Povirk and K. Valerie (2011). "ATM-dependent ERK signaling via AKT in response to DNA double-strand breaks." *Cell Cycle* **10**(3): 481-491.

Kia, S. K., M. M. Gorski, S. Giannakopoulos and C. P. Verrijzer (2008). "SWI/SNF mediates polycomb eviction and epigenetic reprogramming of the INK4b-ARF-INK4a locus." *Mol Cell Biol* **28**(10): 3457-3464.

- Kim, H. S., M. C. Song, I. H. Kwak, T. J. Park and I. K. Lim (2003). "Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence." *J Biol Chem* **278**(39): 37497-37510.
- Kim, K. H., C. C. Chen, R. I. Monzon and L. F. Lau (2013). "Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts." *Mol Cell Biol* **33**(10): 2078-2090.
- Kim, K. M., J. H. Noh, M. Bodogai, J. L. Martindale, X. Yang, F. E. Indig, S. K. Basu, K. Ohnuma, C. Morimoto, P. F. Johnson, A. Biragyn, K. Abdelmohsen and M. Gorospe (2017). "Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4." *Genes Dev* **31**(15): 1529-1534.
- Kim, K. S., Y. B. Seu, S. H. Baek, M. J. Kim, K. J. Kim, J. H. Kim and J. R. Kim (2007). "Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism." *Mol Biol Cell* **18**(11): 4543-4552.
- Kim, S. O., J. K. Kundu, Y. K. Shin, J. H. Park, M. H. Cho, T. Y. Kim and Y. J. Surh (2005). "[6]-Gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF-kappaB in phorbol ester-stimulated mouse skin." *Oncogene* **24**(15): 2558-2567.
- Kim, W. Y. and N. E. Sharpless (2006). "The regulation of INK4/ARF in cancer and aging." *Cell* **127**(2): 265-275.
- Kipling, D. and H. J. Cooke (1990). "Hypervariable ultra-long telomeres in mice." *Nature* **347**(6291): 400-402.
- Kirschner, K., S. A. Samarajiwa, J. M. Cairns, S. Menon, P. A. Perez-Mancera, K. Tomimatsu, C. Bermejo-Rodriguez, Y. Ito, T. Chandra, M. Narita, S. K. Lyons, A. G. Lynch, H. Kimura, T. Ohbayashi, S. Tavare and M. Narita (2015). "Phenotype specific analyses reveal distinct regulatory mechanism for chronically activated p53." *PLoS Genet* **11**(3): e1005053.
- Klein, O. D., G. Minowada, R. Peterkova, A. Kangas, B. D. Yu, H. Lesot, M. Peterka, J. Jernvall and G. R. Martin (2006). "Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling." *Dev Cell* **11**(2): 181-190.
- Kodama, R., M. Kato, S. Furuta, S. Ueno, Y. Zhang, K. Matsuno, C. Yabe-Nishimura, E. Tanaka and T. Kamata (2013). "ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence." *Genes Cells* **18**(1): 32-41.
- Kortlever, R. M. and R. Bernards (2006). "Senescence, wound healing and cancer: the PAI-1 connection." *Cell Cycle* **5**(23): 2697-2703.
- Kortlever, R. M., P. J. Higgins and R. Bernards (2006). "Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence." *Nat Cell Biol* **8**(8): 877-884.
- Kotake, Y., R. Cao, P. Viatour, J. Sage, Y. Zhang and Y. Xiong (2007). "pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene." *Genes Dev* **21**(1): 49-54.
- Krenning, L., F. M. Feringa, I. A. Shaltiel, J. van den Berg and R. H. Medema (2014). "Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence." *Mol Cell* **55**(1): 59-72.

- Krishnamurthy, J., M. R. Ramsey, K. L. Ligon, C. Torrice, A. Koh, S. Bonner-Weir and N. E. Sharpless (2006). "p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential." *Nature* **443**(7110): 453-457.
- Krishnamurthy, J., C. Torrice, M. R. Ramsey, G. I. Kovalev, K. Al-Regaiey, L. Su and N. E. Sharpless (2004). "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging." *J Clin Invest* **114**(9): 1299-1307.
- Krizhanovsky, V., M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender and S. W. Lowe (2008). "Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis." *Cell* **134**(4): 657-667.
- Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez and J. Campisi (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12072-12077.
- Kruiswijk, F., C. F. Labuschagne and K. H. Vousden (2015). "p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill." *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(7): 393-405.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2010). "The essence of senescence." *Genes Dev* **24**(22): 2463-2479.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredeveld, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." *Cell* **133**(6): 1019-1031.
- Kuracha, M. R., E. Siefker, J. D. Licht and V. Govindarajan (2013). "Spry1 and Spry2 are necessary for eyelid closure." *Dev Biol* **383**(2): 227-238.
- Kwabi-Addo, B., J. Wang, H. Erdem, A. Vaid, P. Castro, G. Ayala and M. Ittmann (2004). "The expression of Sprouty1, an inhibitor of fibroblast growth factor signal transduction, is decreased in human prostate cancer." *Cancer Res* **64**(14): 4728-4735.
- Laberge, R. M., Y. Sun, A. V. Orjalo, C. K. Patil, A. Freund, L. Zhou, S. C. Curran, A. R. Davalos, K. A. Wilson-Edell, S. Liu, C. Limbad, M. Demaria, P. Li, G. B. Hubbard, Y. Ikeno, M. Javors, P. Y. Desprez, C. C. Benz, P. Kapahi, P. S. Nelson and J. Campisi (2015). "mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation." *Nat Cell Biol* **17**(8): 1049-1061.
- Lan, L., J. D. Holland, J. Qi, S. Grosskopf, J. Rademann, R. Vogel, B. Gyorffy, A. Wulf-Goldenberg and W. Birchmeier (2015). "Shp2 signaling suppresses senescence in PyMT-induced mammary gland cancer in mice." *EMBO J* **34**(11): 1493-1508.
- Lao, D. H., S. Chandramouli, P. Yusoff, C. W. Fong, T. Y. Saw, L. P. Tai, C. Y. Yu, H. F. Leong and G. R. Guy (2006). "A Src homology 3-binding sequence on the C terminus of Sprouty2 is necessary for inhibition of the Ras/ERK pathway downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation." *J Biol Chem* **281**(40): 29993-30000.
- Lao, D. H., P. Yusoff, S. Chandramouli, R. J. Philp, C. W. Fong, R. A. Jackson, T. Y. Saw, C. Y. Yu and G. R. Guy (2007). "Direct binding of PP2A to Sprouty2 and phosphorylation changes are a prerequisite for ERK inhibition downstream of fibroblast growth factor receptor stimulation." *J Biol Chem* **282**(12): 9117-9126.
- Lavine, K. J., A. C. White, C. Park, C. S. Smith, K. Choi, F. Long, C. C. Hui and D. M. Ornitz (2006). "Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development." *Genes Dev* **20**(12): 1651-1666.

- Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio and E. S. Hwang (2006). "Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase." *Aging Cell* **5**(2): 187-195.
- Lee, J. S., M. O. Lee, B. H. Moon, S. H. Shim, A. J. Fornace, Jr. and H. J. Cha (2009). "Senescent growth arrest in mesenchymal stem cells is bypassed by Wip1-mediated downregulation of intrinsic stress signaling pathways." *Stem Cells* **27**(8): 1963-1975.
- Lee, S. A., C. Ho, R. Roy, C. Kosinski, M. A. Patil, A. D. Tward, J. Fridlyand and X. Chen (2008). "Integration of genomic analysis and in vivo transfection to identify sprouty 2 as a candidate tumor suppressor in liver cancer." *Hepatology* **47**(4): 1200-1210.
- Lee, S. A., S. Ladu, M. Evert, F. Dombrowski, V. De Murtas, X. Chen and D. F. Calvisi (2010). "Synergistic role of Sprouty2 inactivation and c-Met up-regulation in mouse and human hepatocarcinogenesis." *Hepatology* **52**(2): 506-517.
- Leeksa, O. C., T. A. Van Achterberg, Y. Tsumura, J. Toshima, E. Eldering, W. G. Kroes, C. Mellink, M. Spaargaren, K. Mizuno, H. Pannekoek and C. J. de Vries (2002). "Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1." *Eur J Biochem* **269**(10): 2546-2556.
- Lefort, K., A. Mandinova, P. Ostano, V. Kolev, V. Calpini, I. Kolfschoten, V. Devgan, J. Lieb, W. Raffoul, D. Hohl, V. Neel, J. Garlick, G. Chiorino and G. P. Dotto (2007). "Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases." *Genes Dev* **21**(5): 562-577.
- Leontieva, O. V., Z. N. Demidenko and M. V. Blagosklonny (2014). "Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(24): 8832-8837.
- Levkowitz, G., H. Waterman, E. Zamir, Z. Kam, S. Oved, W. Y. Langdon, L. Beguinot, B. Geiger and Y. Yarden (1998). "c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor." *Genes Dev* **12**(23): 3663-3674.
- Lewis, D. A., Q. Yi, J. B. Travers and D. F. Spandau (2008). "UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53." *Mol Biol Cell* **19**(4): 1346-1353.
- Li, T., N. Kon, L. Jiang, M. Tan, T. Ludwig, Y. Zhao, R. Baer and W. Gu (2012). "Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence." *Cell* **149**(6): 1269-1283.
- Li, W., C. Nadelman, G. Henry, J. Fan, M. Muellenhoff, E. Medina, N. S. Gratch, M. Chen, J. Han and D. Woodley (2001). "The p38-MAPK/SAPK pathway is required for human keratinocyte migration on dermal collagen." *J Invest Dermatol* **117**(6): 1601-1611.
- Li, X., V. G. Brunton, H. R. Burgar, L. M. Wheldon and J. K. Heath (2004). "FRS2-dependent SRC activation is required for fibroblast growth factor receptor-induced phosphorylation of Sprouty and suppression of ERK activity." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 6007-6017.
- Lillig, C. H., C. Berndt, O. Vergnolle, M. E. Lonn, C. Hudemann, E. Bill and A. Holmgren (2005). "Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8168-8173.

- Lin, Z. Q., T. Kondo, Y. Ishida, T. Takayasu and N. Mukaida (2003). "Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice." *J Leukoc Biol* **73**(6): 713-721.
- Liton, P. B., P. Challa, S. Stinnett, C. Luna, D. L. Epstein and P. Gonzalez (2005). "Cellular senescence in the glaucomatous outflow pathway." *Exp Gerontol* **40**(8-9): 745-748.
- Litovchick, L., L. A. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn and J. A. DeCaprio (2011). "DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly." *Genes Dev* **25**(8): 801-813.
- Liu, D. and P. J. Hornsby (2007). "Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion." *Cancer Res* **67**(7): 3117-3126.
- Liu, G., J. M. Parant, G. Lang, P. Chau, A. Chavez-Reyes, A. K. El-Naggar, A. Multani, S. Chang and G. Lozano (2004). "Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice." *Nat Genet* **36**(1): 63-68.
- Lo, T. L., P. Yusoff, C. W. Fong, K. Guo, B. J. McCaw, W. A. Phillips, H. Yang, E. S. Wong, H. F. Leong, Q. Zeng, T. C. Putti and G. R. Guy (2004). "The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer." *Cancer Res* **64**(17): 6127-6136.
- Loaiza, N. and M. Demaria (2016). "Cellular senescence and tumor promotion: Is aging the key?" *Biochim Biophys Acta* **1865**(2): 155-167.
- Lopez-Otin, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." *Cell* **153**(6): 1194-1217.
- Lujambio, A. (2016). "To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question." *Bioessays* **38 Suppl 1**: S56-64.
- Lujambio, A., L. Akkari, J. Simon, D. Grace, D. F. Tschaharganeh, J. E. Bolden, Z. Zhao, V. Thapar, J. A. Joyce, V. Krizhanovsky and S. W. Lowe (2013). "Non-cell-autonomous tumor suppression by p53." *Cell* **153**(2): 449-460.
- Macia, A., P. Gallel, M. Vaquero, M. Gou-Fabregas, M. Santacana, A. Maliszewska, M. Robledo, J. R. Gardiner, M. A. Basson, X. Matias-Guiu and M. Encinas (2012). "Sprouty1 is a candidate tumor-suppressor gene in medullary thyroid carcinoma." *Oncogene* **31**(35): 3961-3972.
- Macia, A., M. Vaquero, M. Gou-Fabregas, E. Castelblanco, J. M. Valdivielso, C. Anerillas, D. Mauricio, X. Matias-Guiu, J. Ribera and M. Encinas (2014). "Sprouty1 induces a senescence-associated secretory phenotype by regulating NFkappaB activity: implications for tumorigenesis." *Cell Death Differ* **21**(2): 333-343.
- Maggio, M., J. M. Guralnik, D. L. Longo and L. Ferrucci (2006). "Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**(6): 575-584.
- Mandinova, A., K. Lefort, A. Tommasi di Vignano, W. Stonely, P. Ostano, G. Chiorino, H. Iwaki, J. Nakanishi and G. P. Dotto (2008). "The FoxO3a gene is a key negative target of canonical Notch signalling in the keratinocyte UVB response." *EMBO J* **27**(8): 1243-1254.
- Mannava, S., A. R. Omilian, J. A. Wawrzyniak, E. E. Fink, D. Zhuang, J. C. Miecznikowski, J. R. Marshall, M. S. Soengas, R. C. Sears, C. D. Morrison and M. A. Nikiforov (2012). "PP2A-B56alpha

controls oncogene-induced senescence in normal and tumor human melanocytic cells." *Oncogene* **31**(12): 1484-1492.

Martin-Montalvo, A., E. M. Mercken, S. J. Mitchell, H. H. Palacios, P. L. Mote, M. Scheibye-Knudsen, A. P. Gomes, T. M. Ward, R. K. Minor, M. J. Blouin, M. Schwab, M. Pollak, Y. Zhang, Y. Yu, K. G. Becker, V. A. Bohr, D. K. Ingram, D. A. Sinclair, N. S. Wolf, S. R. Spindler, M. Bernier and R. de Cabo (2013). "Metformin improves healthspan and lifespan in mice." *Nat Commun* **4**: 2192.

Martinez, N., C. A. Garcia-Dominguez, B. Domingo, J. L. Oliva, N. Zarich, A. Sanchez, S. Gutierrez-Eisman, J. Llopis and J. M. Rojas (2007). "Sprouty2 binds Grb2 at two different proline-rich regions, and the mechanism of ERK inhibition is independent of this interaction." *Cell Signal* **19**(11): 2277-2285.

Marusyk, A., L. J. Wheeler, C. K. Mathews and J. DeGregori (2007). "p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress." *Mol Cell Biol* **27**(15): 5336-5351.

Mason, J. M., D. J. Morrison, B. Bassit, M. Dimri, H. Band, J. D. Licht and I. Gross (2004). "Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: a dual feedback loop." *Mol Biol Cell* **15**(5): 2176-2188.

Masoumi-Moghaddam, S., A. Amini and D. L. Morris (2014). "The developing story of Sprouty and cancer." *Cancer Metastasis Rev* **33**(2-3): 695-720.

Matheu, A., A. Maraver, P. Klatt, I. Flores, I. Garcia-Cao, C. Borras, J. M. Flores, J. Vina, M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway." *Nature* **448**(7151): 375-379.

Mathieu, V., C. Pirker, W. M. Schmidt, S. Spiegl-Kreinecker, D. Lotsch, P. Heffeter, B. Hegedus, M. Grusch, R. Kiss and W. Berger (2012). "Aggressiveness of human melanoma xenograft models is promoted by aneuploidy-driven gene expression deregulation." *Oncotarget* **3**(4): 399-413.

McHugh, D. and J. Gil (2017). "Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues." *J Cell Biol*.

McKie, A. B., D. A. Douglas, S. Olijslagers, J. Graham, M. M. Omar, R. Heer, V. J. Gnanapragasam, C. N. Robson and H. Y. Leung (2005). "Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer." *Oncogene* **24**(13): 2166-2174.

McQuibban, G. A., J. H. Gong, J. P. Wong, J. L. Wallace, I. Clark-Lewis and C. M. Overall (2002). "Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo." *Blood* **100**(4): 1160-1167.

Mekkawy, A. H. and D. L. Morris (2013). "Human sprouty1 suppresses urokinase receptor-stimulated cell migration and invasion." *ISRN Biochem* **2013**: 598251.

Mercken, E. M., S. D. Crosby, D. W. Lamming, L. JeBailey, S. Krzysik-Walker, D. T. Villareal, M. Capri, C. Franceschi, Y. Zhang, K. Becker, D. M. Sabatini, R. de Cabo and L. Fontana (2013). "Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile." *Aging Cell* **12**(4): 645-651.

Mettert, E. L. and P. J. Kiley (2015). "Fe-S proteins that regulate gene expression." *Biochim Biophys Acta* **1853**(6): 1284-1293.

Michos, O., C. Cebrian, D. Hyink, U. Grieshammer, L. Williams, V. D'Agati, J. D. Licht, G. R. Martin and F. Costantini (2010). "Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10." *PLoS Genet* **6**(1): e1000809.

Mikawa, R., Y. Suzuki, H. Baskoro, K. Kanayama, K. Sugimoto, T. Sato and M. Sugimoto (2018). "Elimination of p19(ARF) -expressing cells protects against pulmonary emphysema in mice." *Aging Cell*: e12827.

Milanovic, M., D. N. Y. Fan, D. Belenki, J. H. M. Dabritz, Z. Zhao, Y. Yu, J. R. Dorr, L. Dimitrova, D. Lenze, I. A. Monteiro Barbosa, M. A. Mendoza-Parra, T. Kanashova, M. Metzner, K. Pardon, M. Reimann, A. Trumpp, B. Dorken, J. Zuber, H. Gronemeyer, M. Hummel, G. Dittmar, S. Lee and C. A. Schmitt (2018). "Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness." *Nature* **553**(7686): 96-100.

Milanovic, M., Y. Yu and C. A. Schmitt (2018). "The Senescence-Stemness Alliance - A Cancer-Hijacked Regeneration Principle." *Trends Cell Biol.*

Minamino, T., M. Orimo, I. Shimizu, T. Kunieda, M. Yokoyama, T. Ito, A. Nojima, A. Nabetani, Y. Oike, H. Matsubara, F. Ishikawa and I. Komuro (2009). "A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance." *Nat Med* **15**(9): 1082-1087.

Minowada, G., L. A. Jarvis, C. L. Chi, A. Neubuser, X. Sun, N. Hacohen, M. A. Krasnow and G. R. Martin (1999). "Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed." *Development* **126**(20): 4465-4475.

Moiseeva, O., X. Deschenes-Simard, E. St-Germain, S. Igelmann, G. Huot, A. E. Cadar, V. Bourdeau, M. N. Pollak and G. Ferbeyre (2013). "Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-kappaB activation." *Aging Cell* **12**(3): 489-498.

Montecino-Rodriguez, E., B. Berent-Maoz and K. Dorshkind (2013). "Causes, consequences, and reversal of immune system aging." *J Clin Invest* **123**(3): 958-965.

Morreau, H., E. Bonten, X. Y. Zhou and A. D'Azzo (1991). "Organization of the gene encoding human lysosomal beta-galactosidase." *DNA Cell Biol* **10**(7): 495-504.

Moskalev, A. A., Z. Smit-McBride, M. V. Shaposhnikov, E. N. Plyusnina, A. Zhavoronkov, A. Budovsky, R. Tacutu and V. E. Fraifeld (2012). "Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies." *Ageing Res Rev* **11**(1): 51-66.

Mosteiro, L., C. Pantoja, N. Alcazar, R. M. Marion, D. Chondronasiou, M. Rovira, P. J. Fernandez-Marcos, M. Munoz-Martin, C. Blanco-Aparicio, J. Pastor, G. Gomez-Lopez, A. De Martino, M. A. Blasco, M. Abad and M. Serrano (2016). "Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo." *Science* **354**(6315).

Mu, X. C., L. Staiano-Coico and P. J. Higgins (1998). "Increased transcription and modified growth state-dependent expression of the plasminogen activator inhibitor type-1 gene characterize the senescent phenotype in human diploid fibroblasts." *J Cell Physiol* **174**(1): 90-98.

Munoz-Espin, D., M. Canamero, A. Maraver, G. Gomez-Lopez, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodriguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado and M. Serrano (2013). "Programmed cell senescence during mammalian embryonic development." *Cell* **155**(5): 1104-1118.

Munoz-Espin, D., M. Rovira, I. Galiana, C. Gimenez, B. Lozano-Torres, M. Paez-Ribes, S. Llanos, S. Chaib, M. Munoz-Martin, A. C. Ucerro, G. Garaulet, F. Mulero, S. G. Dann, T. VanArsdale, D. J.

Shields, A. Bernardos, J. R. Murguia, R. Martinez-Manez and M. Serrano (2018). "A versatile drug delivery system targeting senescent cells." EMBO Mol Med.

Munoz-Espin, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(7): 482-496.

Murata, T., Y. Ishitsuka, K. Karouji, H. Kaneda, H. Toki, Y. Nakai, S. Makino, R. Fukumura, H. Kotaki, S. Wakana, T. Noda and Y. Gondo (2014). "beta-CateninC429S mice exhibit sterility consequent to spatiotemporally sustained Wnt signalling in the internal genitalia." Sci Rep **4**: 6959.

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

Nadeau, R. J., J. L. Toher, X. Yang, D. Kovalenko and R. Friesel (2007). "Regulation of Sprouty2 stability by mammalian Seven-in-Absentia homolog 2." J Cell Biochem **100**(1): 151-160.

Naesens, M. (2011). "Replicative senescence in kidney aging, renal disease, and renal transplantation." Discov Med **11**(56): 65-75.

Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-716.

Narita, M., A. R. Young, S. Arakawa, S. A. Samarajiwa, T. Nakashima, S. Yoshida, S. Hong, L. S. Berry, S. Reichelt, M. Ferreira, S. Tavare, K. Inoki, S. Shimizu and M. Narita (2011). "Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes." Science **332**(6032): 966-970.

Newman, A. B., S. Walter, K. L. Lunetta, M. E. Garcia, P. E. Slagboom, K. Christensen, A. M. Arnold, T. Aspelund, Y. S. Aulchenko, E. J. Benjamin, L. Christiansen, R. B. D'Agostino, Sr., A. L. Fitzpatrick, N. Franceschini, N. L. Glazer, V. Gudnason, A. Hofman, R. Kaplan, D. Karasik, M. Kelly-Hayes, D. P. Kiel, L. J. Launer, K. D. Marcante, J. M. Massaro, I. Miljkovic, M. A. Nalls, D. Hernandez, B. M. Psaty, F. Rivadeneira, J. Rotter, S. Seshadri, A. V. Smith, K. D. Taylor, H. Tiemeier, H. W. Uh, A. G. Uitterlinden, J. W. Vaupel, J. Walston, R. G. Westendorp, T. B. Harris, T. Lumley, C. M. van Duijn and J. M. Murabito (2010). "A meta-analysis of four genome-wide association studies of survival to age 90 years or older: the Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **65**(5): 478-487.

Ng, C., R. A. Jackson, J. P. Buschdorf, Q. Sun, G. R. Guy and J. Sivaraman (2008). "Structural basis for a novel intrapeptidyl H-bond and reverse binding of c-Cbl-TKB domain substrates." EMBO J **27**(5): 804-816.

Nichols, W. W., D. G. Murphy, V. J. Cristofalo, L. H. Toji, A. E. Greene and S. A. Dwight (1977). "Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90." Science **196**(4285): 60-63.

Nogueira, V., Y. Park, C. C. Chen, P. Z. Xu, M. L. Chen, I. Tonic, T. Unterman and N. Hay (2008). "Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis." Cancer Cell **14**(6): 458-470.

Novellasdemunt, L., L. Bultot, A. Manzano, F. Ventura, J. L. Rosa, D. Vertommen, M. H. Rider, A. Navarro-Sabate and R. Bartrons (2013). "PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli." Biochem J **452**(3): 531-543.

- O'Connor, J. C., R. H. McCusker, K. Strle, R. W. Johnson, R. Dantzer and K. W. Kelley (2008). "Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology." Cell Immunol **252**(1-2): 91-110.
- Ohtani, N., Z. Zebedee, T. J. Huot, J. A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi, A. D. Sharrocks, G. Peters and E. Hara (2001). "Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence." Nature **409**(6823): 1067-1070.
- Ortega-Molina, A., E. Lopez-Guadamillas, J. A. Mattison, S. J. Mitchell, M. Munoz-Martin, G. Iglesias, V. M. Gutierrez, K. L. Vaughan, M. D. Szarowicz, I. Gonzalez-Garcia, M. Lopez, D. Cebrian, S. Martinez, J. Pastor, R. de Cabo and M. Serrano (2015). "Pharmacological inhibition of PI3K reduces adiposity and metabolic syndrome in obese mice and rhesus monkeys." Cell Metab **21**(4): 558-570.
- Ozaki, K., S. Miyazaki, S. Tanimura and M. Kohno (2005). "Efficient suppression of FGF-2-induced ERK activation by the cooperative interaction among mammalian Sprouty isoforms." J Cell Sci **118**(Pt 24): 5861-5871.
- Park, W. Y., K. A. Cho, J. S. Park, D. I. Kim and S. C. Park (2001). "Attenuation of EGF signaling in senescent cells by caveolin." Ann NY Acad Sci **928**: 79-84.
- Parrinello, S., E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov and J. Campisi (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." Nat Cell Biol **5**(8): 741-747.
- Passos, J. F., G. Nelson, C. Wang, T. Richter, C. Simillion, C. J. Proctor, S. Miwa, S. Olijslagers, J. Hallinan, A. Wipat, G. Saretzki, K. L. Rudolph, T. B. Kirkwood and T. von Zglinicki (2010). "Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence." Mol Syst Biol **6**: 347.
- Patel, R., M. Gao, I. Ahmad, J. Fleming, L. B. Singh, T. S. Rai, A. B. McKie, M. Seywright, R. J. Barnetson, J. Edwards, O. J. Sansom and H. Y. Leung (2013). "Sprouty2, PTEN, and PP2A interact to regulate prostate cancer progression." J Clin Invest **123**(3): 1157-1175.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev **22**(2): 153-183.
- Peng, C., B. Chen, H. K. Kao, G. Murphy, D. P. Orgill and L. Guo (2011). "Lack of FGF-7 further delays cutaneous wound healing in diabetic mice." Plast Reconstr Surg **128**(6): 673e-684e.
- Penn, J. W., A. O. Grobbelaar and K. J. Rolfe (2012). "The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review." Int J Burns Trauma **2**(1): 18-28.
- Pereira, L., A. Igea, B. Canovas, I. Dolado and A. R. Nebreda (2013). "Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK." EMBO Mol Med **5**(11): 1759-1774.
- Petrelli, A., G. F. Gilestro, S. Lanzardo, P. M. Comoglio, N. Migone and S. Giordano (2002). "The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met." Nature **416**(6877): 187-190.

- Polytarchou, C., D. Iliopoulos, M. Hatziapostolou, F. Kottakis, I. Maroulakou, K. Struhl and P. N. Tsichlis (2011). "Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation." *Cancer Res* **71**(13): 4720-4731.
- Pompei, F., M. Polkanov and R. Wilson (2001). "Age distribution of cancer in mice: the incidence turnover at old age." *Toxicol Ind Health* **17**(1): 7-16.
- Porras, A., S. Zuluaga, E. Black, A. Valladares, A. M. Alvarez, C. Ambrosino, M. Benito and A. R. Nebreda (2004). "P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli." *Mol Biol Cell* **15**(2): 922-933.
- Probin, V., Y. Wang, A. Bai and D. Zhou (2006). "Busulfan selectively induces cellular senescence but not apoptosis in WI38 fibroblasts via a p53-independent but extracellular signal-regulated kinase-p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism." *J Pharmacol Exp Ther* **319**(2): 551-560.
- Purvis, J. E., K. W. Karhohs, C. Mock, E. Batchelor, A. Loewer and G. Lahav (2012). "p53 dynamics control cell fate." *Science* **336**(6087): 1440-1444.
- Qian, Y. and X. Chen (2013). "Senescence regulation by the p53 protein family." *Methods Mol Biol* **965**: 37-61.
- Qiao, G., Z. Li, L. Molinero, M. L. Alegre, H. Ying, Z. Sun, J. M. Penninger and J. Zhang (2008). "T-cell receptor-induced NF-kappaB activation is negatively regulated by E3 ubiquitin ligase Cbl-b." *Mol Cell Biol* **28**(7): 2470-2480.
- Raman, M., S. Earnest, K. Zhang, Y. Zhao and M. H. Cobb (2007). "TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage." *EMBO J* **26**(8): 2005-2014.
- Rayess, H., M. B. Wang and E. S. Srivatsan (2012). "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." *Int J Cancer* **130**(8): 1715-1725.
- Ren, X., H. Du, Y. Li, X. Yao, J. Huang, Z. Li, W. Wang, J. Li, S. Han, C. Wang and K. Huang (2014). "Age-related activation of MKK/p38/NF-kappaB signaling pathway in lung: from mouse to human." *Exp Gerontol* **57**: 29-40.
- Ritschka, B., M. Storer, A. Mas, F. Heinzmann, M. C. Ortells, J. P. Morton, O. J. Sansom, L. Zender and W. M. Keyes (2017). "The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration." *Genes Dev* **31**(2): 172-183.
- Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." *J Cell Biol* **192**(4): 547-556.
- Rodier, F., J. P. Coppe, C. K. Patil, W. A. Hoeijmakers, D. P. Munoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos and J. Campisi (2009). "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion." *Nat Cell Biol* **11**(8): 973-979.
- Rodier, F., D. P. Munoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J. P. Coppe, E. Campeau, C. M. Beausejour, S. H. Kim, A. R. Davalos and J. Campisi (2011). "DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion." *J Cell Sci* **124**(Pt 1): 68-81.
- Rodriguez, J. A., U. M. Marigorta, D. A. Hughes, N. Spataro, E. Bosch and A. Navarro (2017). "Antagonistic pleiotropy and mutation accumulation influence human senescence and disease." *Nat Ecol Evol* **1**(3): 55.

- Roos, W. P. and B. Kaina (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." *Trends Mol Med* **12**(9): 440-450.
- Rozen, E. J., H. Schmidt, X. Dolcet, M. A. Basson, S. Jain and M. Encinas (2009). "Loss of Sprouty1 rescues renal agenesis caused by Ret mutation." *J Am Soc Nephrol* **20**(2): 255-259.
- Rubin, C., V. Litvak, H. Medvedovsky, Y. Zwang, S. Lev and Y. Yarden (2003). "Sprouty fine-tunes EGF signaling through interlinked positive and negative feedback loops." *Curr Biol* **13**(4): 297-307.
- Rufini, A., P. Tucci, I. Celardo and G. Melino (2013). "Senescence and aging: the critical roles of p53." *Oncogene* **32**(43): 5129-5143.
- Saha, K., G. Adhikary, S. R. Kanade, E. A. Rorke and R. L. Eckert (2014). "p38delta regulates p53 to control p21Cip1 expression in human epidermal keratinocytes." *J Biol Chem* **289**(16): 11443-11453.
- Saika, S., Y. Okada, T. Miyamoto, O. Yamanaka, Y. Ohnishi, A. Ooshima, C. Y. Liu, D. Weng and W. W. Kao (2004). "Role of p38 MAP kinase in regulation of cell migration and proliferation in healing corneal epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(1): 100-109.
- Saito, S., A. A. Goodarzi, Y. Higashimoto, Y. Noda, S. P. Lees-Miller, E. Appella and C. W. Anderson (2002). "ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation." *J Biol Chem* **277**(15): 12491-12494.
- Sakai, H., H. Fujigaki, S. J. Mazur and E. Appella (2014). "Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) forestalls cellular premature senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA damage response signaling during DNA replication." *Cell Cycle* **13**(6): 1015-1029.
- Sakata, T., H. Sakaguchi, L. Tsuda, A. Higashitani, T. Aigaki, K. Matsuno and S. Hayashi (2004). "Drosophila Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation." *Curr Biol* **14**(24): 2228-2236.
- Salama, R., M. Sadaie, M. Hoare and M. Narita (2014). "Cellular senescence and its effector programs." *Genes Dev* **28**(2): 99-114.
- Salminen, A., K. Kaarniranta and A. Kauppinen (2012). "Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes." *Aging (Albany NY)* **4**(3): 166-175.
- Sanchez, A., F. Setien, N. Martinez, J. L. Oliva, M. Herranz, M. F. Fraga, M. Alaminos, M. Esteller and J. M. Rojas (2008). "Epigenetic inactivation of the ERK inhibitor Spry2 in B-cell diffuse lymphomas." *Oncogene* **27**(36): 4969-4972.
- Sanchez-Prieto, R., J. M. Rojas, Y. Taya and J. S. Gutkind (2000). "A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents." *Cancer Res* **60**(9): 2464-2472.
- Sarkisian, C. J., B. A. Keister, D. B. Stairs, R. B. Boxer, S. E. Moody and L. A. Chodosh (2007). "Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis." *Nat Cell Biol* **9**(5): 493-505.
- Sasaki, A., T. Taketomi, R. Kato, K. Saeki, A. Nonami, M. Sasaki, M. Kuriyama, N. Saito, M. Shibuya and A. Yoshimura (2003). "Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1." *Nat Cell Biol* **5**(5): 427-432.

Sasaki, A., T. Taketomi, T. Wakioka, R. Kato and A. Yoshimura (2001). "Identification of a dominant negative mutant of Sprouty that potentiates fibroblast growth factor- but not epidermal growth factor-induced ERK activation." *J Biol Chem* **276**(39): 36804-36808.

Sato, Y., M. Taoka, N. Sugiyama, K. Kubo, T. Fuchigami, A. Asada, T. Saito, K. Nakajima, T. Isobe and S. Hisanaga (2007). "Regulation of the interaction of Disabled-1 with CIN85 by phosphorylation with Cyclin-dependent kinase 5." *Genes Cells* **12**(12): 1315-1327.

Schaaf, G., M. Hamdi, D. Zwijnenburg, A. Lakeman, D. Geerts, R. Versteeg and M. Kool (2010). "Silencing of SPRY1 triggers complete regression of rhabdomyosarcoma tumors carrying a mutated RAS gene." *Cancer Res* **70**(2): 762-771.

Schafer, M. J., T. A. White, K. Iijima, A. J. Haak, G. Ligresti, E. J. Atkinson, A. L. Oberg, J. Birch, H. Salmonowicz, Y. Zhu, D. L. Mazula, R. W. Brooks, H. Fuhrmann-Stroissnigg, T. Pirtskhalava, Y. S. Prakash, T. Tchkonja, P. D. Robbins, M. C. Aubry, J. F. Passos, J. L. Kirkland, D. J. Tschumperlin, H. Kita and N. K. LeBrasseur (2017). "Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease." *Nat Commun* **8**: 14532.

Schmelzle, K., S. Kane, S. Gridley, G. E. Lienhard and F. M. White (2006). "Temporal dynamics of tyrosine phosphorylation in insulin signaling." *Diabetes* **55**(8): 2171-2179.

Schmidt, M. H. and I. Dikic (2005). "The Cbl interactome and its functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(12): 907-918.

Schutzman, J. L. and G. R. Martin (2012). "Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(49): 20023-20028.

Schwartzenberg-Bar-Yoseph, F., M. Armoni and E. Karnieli (2004). "The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression." *Cancer Res* **64**(7): 2627-2633.

Serrano, M. (2015). "SHP2: a new target for pro-senescence cancer therapies." *EMBO J* **34**(11): 1439-1441.

Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* **88**(5): 593-602.

Shah, P. P., G. Donahue, G. L. Otte, B. C. Capell, D. M. Nelson, K. Cao, V. Aggarwala, H. A. Cruickshanks, T. S. Rai, T. McBryan, B. D. Gregory, P. D. Adams and S. L. Berger (2013). "Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape." *Genes Dev* **27**(16): 1787-1799.

Shakya, R., T. Watanabe and F. Costantini (2005). "The role of GDNF/Ret signaling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis." *Dev Cell* **8**(1): 65-74.

Sharma, G. D., J. He and H. E. Bazan (2003). "p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades." *J Biol Chem* **278**(24): 21989-21997.

Sharpless, N. E., M. R. Ramsey, P. Balasubramanian, D. H. Castrillon and R. A. DePinho (2004). "The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis." *Oncogene* **23**(2): 379-385.

- Shaw, A. T., A. Meissner, J. A. Dowdle, D. Crowley, M. Magendantz, C. Ouyang, T. Parisi, J. Rajagopal, L. J. Blank, R. T. Bronson, J. R. Stone, D. A. Tuveson, R. Jaenisch and T. Jacks (2007). "Sprouty-2 regulates oncogenic K-ras in lung development and tumorigenesis." *Genes Dev* **21**(6): 694-707.
- Shi, Y. and M. Gaestel (2002). "In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance." *Biol Chem* **383**(10): 1519-1536.
- Shim, K., G. Minowada, D. E. Coling and G. R. Martin (2005). "Sprouty2, a mouse deafness gene, regulates cell fate decisions in the auditory sensory epithelium by antagonizing FGF signaling." *Dev Cell* **8**(4): 553-564.
- Shin, M. H., G. E. Rhie, Y. K. Kim, C. H. Park, K. H. Cho, K. H. Kim, H. C. Eun and J. H. Chung (2005). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo." *J Invest Dermatol* **125**(2): 221-229.
- Simboeck, E. and L. Di Croce (2013). "p16INK4a in cellular senescence." *Aging (Albany NY)* **5**(8): 590-591.
- Sirivatanauksorn, Y., V. Sirivatanauksorn, C. Srisawat, A. Khongmanee and C. Tongkham (2012). "Differential expression of sprouty genes in hepatocellular carcinoma." *J Surg Oncol* **105**(3): 273-276.
- Son, Y., S. Kim, H. T. Chung and H. O. Pae (2013). "Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases." *Methods Enzymol* **528**: 27-48.
- Soto-Gamez, A. and M. Demaria (2017). "Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence." *Drug Discov Today* **22**(5): 786-795.
- Soubeyran, P., K. Kowanzetz, I. Szymkiewicz, W. Y. Langdon and I. Dikic (2002). "Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors." *Nature* **416**(6877): 183-187.
- Spallarossa, P., P. Altieri, C. Barisione, M. Passalacqua, C. Aloï, G. Fugazza, F. Frassoni, M. Podesta, M. Canepa, G. Ghigliotti and C. Brunelli (2010). "p38 MAPK and JNK antagonistically control senescence and cytoplasmic p16INK4A expression in doxorubicin-treated endothelial progenitor cells." *PLoS One* **5**(12): e15583.
- Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Soulard and V. Dulic (1999). "Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts." *Mol Cell Biol* **19**(3): 2109-2117.
- Storer, M., A. Mas, A. Robert-Moreno, M. Pecoraro, M. C. Ortells, V. Di Giacomo, R. Yosef, N. Pilpel, V. Krizhanovsky, J. Sharpe and W. M. Keyes (2013). "Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning." *Cell* **155**(5): 1119-1130.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15545-15550.
- Sun, P. (2014). "Contact inhibition against senescence." *Oncotarget* **5**(17): 7212-7213.

- Sun, P., N. Yoshizuka, L. New, B. A. Moser, Y. Li, R. Liao, C. Xie, J. Chen, Q. Deng, M. Yamout, M. Q. Dong, C. G. Frangou, J. R. Yates, 3rd, P. E. Wright and J. Han (2007). "PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression." *Cell* **128**(2): 295-308.
- Sutterluty, H., C. E. Mayer, U. Setinek, J. Attems, S. Ovtcharov, M. Mikula, W. Mikulits, M. Micksche and W. Berger (2007). "Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms." *Mol Cancer Res* **5**(5): 509-520.
- Swat, A., I. Dolado, J. M. Rojas and A. R. Nebreda (2009). "Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38alpha mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation." *Mol Cell Biol* **29**(12): 3332-3343.
- Takebayashi, S., H. Tanaka, S. Hino, Y. Nakatsu, T. Igata, A. Sakamoto, M. Narita and M. Nakao (2015). "Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells." *Aging Cell* **14**(4): 689-697.
- Takekawa, M., M. Adachi, A. Nakahata, I. Nakayama, F. Itoh, H. Tsukuda, Y. Taya and K. Imai (2000). "p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation." *EMBO J* **19**(23): 6517-6526.
- Taketomi, T., D. Yoshiga, K. Taniguchi, T. Kobayashi, A. Nonami, R. Kato, M. Sasaki, A. Sasaki, H. Ishibashi, M. Moriyama, K. Nakamura, J. Nishimura and A. Yoshimura (2005). "Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia." *Nat Neurosci* **8**(7): 855-857.
- Tan, W., H. G. Yu and H. S. Luo (2014). "Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitizes human gastric cells to doxorubicin treatment in vitro and in vivo." *Mol Med Rep* **10**(6): 3275-3281.
- Tartaglia, M., E. L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H. G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burgt, A. H. Crosby, A. Ion, S. Jeffery, K. Kalidas, M. A. Patton, R. S. Kucherlapati and B. D. Gelb (2001). "Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome." *Nat Genet* **29**(4): 465-468.
- Tata, P. R., H. Mou, A. Pardo-Saganta, R. Zhao, M. Prabhu, B. M. Law, V. Vinarsky, J. L. Cho, S. Breton, A. Sahay, B. D. Medoff and J. Rajagopal (2013). "Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo." *Nature* **503**(7475): 218-223.
- Tavana, O., N. Puebla-Osorio, M. Sang and C. Zhu (2010). "Absence of p53-dependent apoptosis combined with nonhomologous end-joining deficiency leads to a severe diabetic phenotype in mice." *Diabetes* **59**(1): 135-142.
- Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers and W. L. Gerald (2010). "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." *Cancer Cell* **18**(1): 11-22.
- Tchkonia, T., D. E. Morbeck, T. Von Zglinicki, J. Van Deursen, J. Lustgarten, H. Scoble, S. Khosla, M. D. Jensen and J. L. Kirkland (2010). "Fat tissue, aging, and cellular senescence." *Aging Cell* **9**(5): 667-684.

- ten Berge, D., S. A. Brugmann, J. A. Helms and R. Nusse (2008). "Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development." *Development* **135**(19): 3247-3257.
- Tennis, M. A., M. M. Van Scoyk, S. V. Freeman, K. M. Vandervest, R. A. Nemenoff and R. A. Winn (2010). "Sprouty-4 inhibits transformed cell growth, migration and invasion, and epithelial-mesenchymal transition, and is regulated by Wnt7A through PPARgamma in non-small cell lung cancer." *Mol Cancer Res* **8**(6): 833-843.
- Tilstra, J. S., A. R. Robinson, J. Wang, S. Q. Gregg, C. L. Clauson, D. P. Reay, L. A. Nasto, C. M. St Croix, A. Usas, N. Vo, J. Huard, P. R. Clemens, D. B. Stolz, D. C. Guttridge, S. C. Watkins, G. A. Garinis, Y. Wang, L. J. Niedernhofer and P. D. Robbins (2012). "NF-kappaB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice." *J Clin Invest* **122**(7): 2601-2612.
- Trempelec, N., J. P. Munoz, K. Slobodnyuk, S. Marin, M. Cascante, A. Zorzano and A. R. Nebreda (2017). "Induction of oxidative metabolism by the p38alpha/MK2 pathway." *Sci Rep* **7**(1): 11367.
- Tsavachidou, D., M. L. Coleman, G. Athanasiadis, S. Li, J. D. Licht, M. F. Olson and B. L. Weber (2004). "SPRY2 is an inhibitor of the ras/extracellular signal-regulated kinase pathway in melanocytes and melanoma cells with wild-type BRAF but not with the V599E mutant." *Cancer Res* **64**(16): 5556-5559.
- Van Den Steen, P. E., A. Wuyts, S. J. Husson, P. Proost, J. Van Damme and G. Opdenakker (2003). "Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities." *Eur J Biochem* **270**(18): 3739-3749.
- van Deursen, J. M. (2014). "The role of senescent cells in ageing." *Nature* **509**(7501): 439-446.
- Velarde, M. C. and M. Demaria (2016). "Targeting Senescent Cells: Possible Implications for Delaying Skin Aging: A Mini-Review." *Gerontology* **62**(5): 513-518.
- Velasco, A., J. Pallares, M. Santacana, S. Gatus, M. Fernandez, M. Domingo, J. Valls, A. Yeramian, M. Encinas, X. Dolcet and X. Matias-Guiu (2011). "Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma." *Hum Pathol* **42**(2): 185-193.
- Vernier, M., V. Bourdeau, M. F. Gaumont-Leclerc, O. Moiseeva, V. Begin, F. Saad, A. M. Mes-Masson and G. Ferbeyre (2011). "Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies." *Genes Dev* **25**(1): 41-50.
- Viniegra, J. G., N. Martinez, P. Modirassari, J. Hernandez Losa, C. Parada Cobo, V. J. Sanchez-Arevalo Lobo, C. I. Aceves Luquero, L. Alvarez-Vallina, S. Ramon y Cajal, J. M. Rojas and R. Sanchez-Prieto (2005). "Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM." *J Biol Chem* **280**(6): 4029-4036.
- Vire, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J. M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit and F. Fuks (2006). "The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation." *Nature* **439**(7078): 871-874.
- Volonte, D. and F. Galbiati (2009). "Caveolin-1, cellular senescence and pulmonary emphysema." *Aging (Albany NY)* **1**(9): 831-835.

- Voncken, J. W., H. Niessen, B. Neufeld, U. Rennfahrt, V. Dahlmans, N. Kubben, B. Holzer, S. Ludwig and U. R. Rapp (2005). "MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1." *J Biol Chem* **280**(7): 5178-5187.
- Vousden, K. H. and D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 275-283.
- Wagner, W., P. Horn, M. Castoldi, A. Diehlmann, S. Bork, R. Saffrich, V. Benes, J. Blake, S. Pfister, V. Eckstein and A. D. Ho (2008). "Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process." *PLoS One* **3**(5): e2213.
- Wajapeyee, N., R. W. Serra, X. Zhu, M. Mahalingam and M. R. Green (2008). "Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7." *Cell* **132**(3): 363-374.
- Wakioka, T., A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron and A. Yoshimura (2001). "Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling." *Nature* **412**(6847): 647-651.
- Wan, F. and M. J. Lenardo (2009). "Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(4): a000067.
- Wang, A. S. and O. Dreesen (2018). "Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging." *Front Genet* **9**: 247.
- Wang, W., J. X. Chen, R. Liao, Q. Deng, J. J. Zhou, S. Huang and P. Sun (2002). "Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence." *Mol Cell Biol* **22**(10): 3389-3403.
- Wang, W., X. Yang, I. Lopez de Silanes, D. Carling and M. Gorospe (2003). "Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function." *J Biol Chem* **278**(29): 27016-27023.
- Webley, K., J. A. Bond, C. J. Jones, J. P. Blaydes, A. Craig, T. Hupp and D. Wynford-Thomas (2000). "Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2803-2808.
- Weijzen, S., P. Rizzo, M. Braid, R. Vaishnav, S. M. Jonkheer, A. Zlobin, B. A. Osborne, S. Gottipati, J. C. Aster, W. C. Hahn, M. Rudolf, K. Siziopikou, W. M. Kast and L. Miele (2002). "Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells." *Nat Med* **8**(9): 979-986.
- Wiley, C. D. and J. Campisi (2016). "From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence." *Cell Metab* **23**(6): 1013-1021.
- Wiley, C. D., N. Schaum, F. Alimirah, J. A. Lopez-Dominguez, A. V. Orjalo, G. Scott, P. Y. Desprez, C. Benz, A. R. Davalos and J. Campisi (2018). "Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype." *Sci Rep* **8**(1): 2410.
- Wiley, C. D., M. C. Velarde, P. Lecot, S. Liu, E. A. Sarnoski, A. Freund, K. Shirakawa, H. W. Lim, S. S. Davis, A. Ramanathan, A. A. Gerencser, E. Verdin and J. Campisi (2016). "Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype." *Cell Metab* **23**(2): 303-314.

- Wingrove, J. A. and P. H. O'Farrell (1999). "Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in *Drosophila*." Cell **98**(1): 105-114.
- Winn, R. A., L. Marek, S. Y. Han, K. Rodriguez, N. Rodriguez, M. Hammond, M. Van Scoyk, H. Acosta, J. Mirus, N. Barry, Y. Bren-Mattison, T. J. Van Raay, R. A. Nemenoff and L. E. Heasley (2005). "Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation." J Biol Chem **280**(20): 19625-19634.
- Wlodarchak, N. and Y. Xing (2016). "PP2A as a master regulator of the cell cycle." Crit Rev Biochem Mol Biol **51**(3): 162-184.
- Wolstein, J. M., D. H. Lee, J. Michaud, V. Buot, B. Stefanchik and M. D. Plotkin (2010). "INK4a knockout mice exhibit increased fibrosis under normal conditions and in response to unilateral ureteral obstruction." Am J Physiol Renal Physiol **299**(6): F1486-1495.
- Wong, A., B. Lamothe, A. Lee, J. Schlessinger and I. Lax (2002). "FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6684-6689.
- Wong, E. S., X. Le Guezennec, O. N. Demidov, N. T. Marshall, S. T. Wang, J. Krishnamurthy, N. E. Sharpless, N. R. Dunn and D. V. Bulavin (2009). "p38MAPK controls expression of multiple cell cycle inhibitors and islet proliferation with advancing age." Dev Cell **17**(1): 142-149.
- Wong, E. S., J. Lim, B. C. Low, Q. Chen and G. R. Guy (2001). "Evidence for direct interaction between Sprouty and Cbl." J Biol Chem **276**(8): 5866-5875.
- Wu, J., L. Xue, M. Weng, Y. Sun, Z. Zhang, W. Wang and T. Tong (2007). "Sp1 is essential for p16 expression in human diploid fibroblasts during senescence." PLoS One **2**(1): e164.
- Wu, X., P. B. Alexander, Y. He, M. Kikkawa, P. D. Vogel and S. L. McKnight (2005). "Mammalian sprouty proteins assemble into large monodisperse particles having the properties of intracellular nanobatteries." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 14058-14062.
- Xiu, M., J. Kim, E. Sampson, C. Y. Huang, R. J. Davis, K. E. Paulson and A. S. Yee (2003). "The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation." Mol Cell Biol **23**(23): 8890-8901.
- Xu, M., T. Pirtskhalava, J. N. Farr, B. M. Weigand, A. K. Palmer, M. M. Weivoda, C. L. Inman, M. B. Ogrodnik, C. M. Hachfeld, D. G. Fraser, J. L. Onken, K. O. Johnson, G. C. Verzosa, L. G. P. Langhi, M. Weigl, N. Giorgadze, N. K. LeBrasseur, J. D. Miller, D. Jurk, R. J. Singh, D. B. Allison, K. Ejima, G. B. Hubbard, Y. Ikeno, H. Cubro, V. D. Garovic, X. Hou, S. J. Werooha, P. D. Robbins, L. J. Niedernhofer, S. Khosla, T. Tchkonina and J. L. Kirkland (2018). "Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age." Nat Med.
- Xu, M., Q. Yu, R. Subrahmanyam, M. J. Difilippantonio, T. Ried and J. M. Sen (2008). "Beta-catenin expression results in p53-independent DNA damage and oncogene-induced senescence in prelymphomagenic thymocytes in vivo." Mol Cell Biol **28**(5): 1713-1723.
- Xu, Y., N. Li, R. Xiang and P. Sun (2014). "Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence." Trends Biochem Sci **39**(6): 268-276.

Yakymovych, I., M. Yakymovych, G. Zang, Y. Mu, A. Bergh, M. Landstrom and C. H. Heldin (2015). "CIN85 modulates TGFbeta signaling by promoting the presentation of TGFbeta receptors on the cell surface." *J Cell Biol* **210**(2): 319-332.

Yang, G., D. G. Rosen, Z. Zhang, R. C. Bast, Jr., G. B. Mills, J. A. Colacino, I. Mercado-Uribe and J. Liu (2006). "The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16472-16477.

Ye, X., B. Zerlanko, A. Kennedy, G. Banumathy, R. Zhang and P. D. Adams (2007). "Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells." *Mol Cell* **27**(2): 183-196.

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

Yosef, R., N. Pilpel, R. Tokarsky-Amiel, A. Biran, Y. Ovadya, S. Cohen, E. Vadai, L. Dassa, E. Shahr, R. Condiotti, I. Ben-Porath and V. Krizhanovsky (2016). "Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL." *Nat Commun* **7**: 11190.

Yu, D. M., S. H. Jung, H. T. An, S. Lee, J. Hong, J. S. Park, H. Lee, H. Lee, M. S. Bahn, H. C. Lee, N. K. Han, J. Ko, J. S. Lee and Y. G. Ko (2017). "Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction." *Aging Cell* **16**(4): 773-784.

Yu, L., M. C. Hebert and Y. E. Zhang (2002). "TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses." *EMBO J* **21**(14): 3749-3759.

Yu, T., Y. Yaguchi, D. Echevarria, S. Martinez and M. A. Basson (2011). "Sprouty genes prevent excessive FGF signalling in multiple cell types throughout development of the cerebellum." *Development* **138**(14): 2957-2968.

Zebedee, Z. and E. Hara (2001). "Id proteins in cell cycle control and cellular senescence." *Oncogene* **20**(58): 8317-8325.

Zhang, C., M. Lin, R. Wu, X. Wang, B. Yang, A. J. Levine, W. Hu and Z. Feng (2011). "Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(39): 16259-16264.

Zhao, Y., A. Tyshkovskiy, D. Munoz-Espin, X. Tian, M. Serrano, J. P. de Magalhaes, E. Nevo, V. N. Gladyshev, A. Seluanov and V. Gorbunova (2018). "Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**(8): 1801-1806.

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

Zhu, Y., T. Tchkonja, T. Pirtskhalava, A. C. Gower, H. Ding, N. Giorgadze, A. K. Palmer, Y. Ikeno, G. B. Hubbard, M. Lenburg, S. P. O'Hara, N. F. LaRusso, J. D. Miller, C. M. Roos, G. C. Verzosa, N. K. LeBrasseur, J. D. Wren, J. N. Farr, S. Khosla, M. B. Stout, S. J. McGowan, H. Fuhrmann-Stroissnigg, A. U. Gurkar, J. Zhao, D. Colangelo, A. Dorronsoro, Y. Y. Ling, A. S. Barghouty, D. C.

Navarro, T. Sano, P. D. Robbins, L. J. Niedernhofer and J. L. Kirkland (2015). "The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs." Aging Cell **14**(4): 644-658.

Ziaei, S., N. Shimada, H. Kucharavy and K. Hubbard (2012). "MNK1 expression increases during cellular senescence and modulates the subcellular localization of hnRNP A1." Exp Cell Res **318**(5): 500-508.

Zou, H., E. Stoppani, D. Volonte and F. Galbiati (2011). "Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases." Mech Ageing Dev **132**(11-12): 533-542.

Zwerschke, W., S. Mazurek, P. Stockl, E. Hutter, E. Eigenbrodt and P. Jansen-Durr (2003). "Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence." Biochem J **376**(Pt 2): 403-411.