



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

## Memoria del Trabajo de Fin de Máster

**O papel de p65/RelA na senescencia celular e inflamación celular**

**El papel de p65/RelA en la senescencia celular y la inflamación**

**Role of p65/RelA in cellular senescence and inflammation**

**Rocío Mato Basalo**

Julio, 2021

*Director(es) Académico(s): María C. Arufe Gonda*

*Codirector (se procede): Juan A. Fabián Labora*

Universidade da Coruña  
Facultade de Ciencias  
INIBIC

**El papel de p65/RelA en la senescencia e inflamación celular**  
**O papel de p65/RelA na senescencia e inflamación celular**  
**Role of p65/RelA in celular senescence and inflammation**

Rocío Mato Basalo  
A Coruña, Julio 2021

Dra. María del Carmen Arufe Gonda y Dr. Juan Antonio Fafián Labora en calidad de tutor/es de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

ARUFE GONDA  
MARIA DEL  
CARMEN -  
36116727B

Firmado digitalmente  
por ARUFE GONDA  
MARIA DEL CARMEN -  
36116727B  
Fecha: 2021.07.16  
15:51:41 +02'00'

Dra. María del Carmen Arufe Gonda

FAFIAN  
LABORA JUAN  
ANTONIO -  
47387789S

Digitally signed by  
FAFIAN LABORA JUAN  
ANTONIO - 47387789S  
Date: 2021.07.16  
16:08:13 +02'00'

Dr. Juan Antonio Fafián Labora

MATO  
BASALO  
ROCIO -  
44659517A

Firmado  
digitalmente por  
MATO BASALO  
ROCIO - 44659517A  
Fecha: 2021.07.16  
16:05:48 +02'00'

Firma de la alumna Rocío Mato Basalo

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN .....	6
RESUMO .....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	8
1.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....	8
1.2. SENESCENCIA CELULAR .....	9
1.3. INFLAMACIÓN.....	10
1.4. LOS SENOMÓRFICOS .....	11
1.5. NF- $\kappa$ B.....	12
1.6. RUTA DE NF- $\kappa$ B .....	13
1.7. INHIBIDORES DE NF- $\kappa$ B CON POTENCIAL COMO SENOMÓRFICOS.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL Y METODOS.....	18
3.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCS).....	18
3.2. CULTIVO CELULAR DE MSCS .....	19
3.3. MODELOS DE SENESCENCIA .....	19
3.4. MODELOS DE INFLAMACIÓN .....	21
3.5. ENSAYOS CON LOS INHIBIDORES DE NF- $\kappa$ B .....	21
3.6. TINCIÓN CRISTAL VIOLETA .....	23
3.7. EXTRACCIÓN DE ARN .....	23
3.8. SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNC) .....	24
3.9. PCR CUANTITATIVA (QPCR).....	24
3.10. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	25
3.11. ESTADÍSTICA .....	26
3.12. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	26
4. RESULTADOS Y DICUSIÓN .....	27
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS MSCS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	27
4.2. OBTENCIÓN DE MODELOS DE SENESCENCIA Y PRO-INFLAMACIÓN.....	27
4.3. EL USO DE SENOMÓRFICOS PREVIENE LOS ESTADIOS DE SENESCENCIA Y PRO-INFLAMACIÓN .....	31
5. CONCLUSIONES .....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36

## ABREVIATURAS

**ADN:** ácido desoxirribonucleico o en inglés DNA

**ARN:** ácido ribonucleico o en inglés RNA

**ARNm:** ARN mensajero

**BCL-xL:** célula-B/linfoma xL

**C/EBP:** proteína de unión al potenciador CCAAT, por sus siglas en inglés, *CCAAT/enhancer-binding protein*

**CD:** marcadores de superficie por sus siglas en inglés *cluster of differentiation*

**Cdks:** kinasas dependientes de ciclinas, por sus siglas en inglés, *cyclin-dependent kinases*

**cDNA:** ADN complementario

**CHUAC:** Complejo Hospitalario de la Universidad de A Coruña

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**DDIS:** inducción al daños en el ADN asociados a senescencia, por sus siglas en inglés *DNA damage induced senescence*

**DMEN:** por sus siglas en inglés, *dulbecco's modified eagle's medium*

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**EV:** vesículas extracelulares, por sus siglas en inglés, *extracellular vesicles*)

**F:** sentido, por sus siglas en inglés forward

**FACS:** por sus siglas en inglés *fluorescence-activated cell sorter*

**FBS:** uero bovino fetal (SBF o FBS por sus siglas en inglés, *fetal bovin suerum*

**FCS:** por sus siglas en ingles *forward scatering*

**HPRT:** gen de mantenimiento, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa, por sus siglas en inglés, *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*

**iCAM-1:** moléculas de adhesión por sus siglas en inglés, *intracelular adhesión molecule 1*

**ikB $\alpha$**  por sus siglas en ingles, *inhibitor of nuclear factor kappa B*

**IKK:** kinasa que fosforilan al complejo ikB $\alpha$

**IL:** las interleuquinas

**ISCT:** sociedad internacional de células y terapia génica, por sus siglas en inglés *International society cell and Gen Therapy*

**JSH-23:** 4-metil-N1-(3-fenil-propil)-benceno-1,2-diamina

**m/v:** masa por volumen

**MG-132:** Cbz-leu-leu-leucinal

**mg:** miligramos

**mm:** milímetros

**MSCs:** células madre mesenquimales, por sus siglas en inglés *mesenchymal stem cells*

**mTOR:** diana de rapamicina en células de mamífero

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**NLS:** secuencia de localización nuclear, por sus siglas en inglés *nuclear localization sequence*

**nm:** nanómetros

**°C:** grados centígrados

**p21:** inhibidor de Cdk-1a

**p65:** factor de transcripción p65 o RelA

**PA:** pro-inflamación

**PI3K:** fosfoinositol-3-kinasa

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**R:** antisentido, por sus siglas en inglés reverse

**RE:** retículo endoplasmático

**RHD:** dominio de homología Rel, por sus siglas en inglés, *Rel homology domain*

**rpm:** revoluciones por minuto

**RPMi:** por sus siglas en inglés, *roswell park memorial institute medium*

**SASP:** fenotipo de senescencia asociado al secretoma, por sus siglas en inglés, *the senescence-associated secretory phenotype*

**SD:** error estándar de la media, por sus siglas en inglés *standard deviation*

**SSC:** por sus siglas en inglés *side angle scattering*

**TAD:** dominio transcripcional de transactivación o TAD (por sus siglas en inglés, *transcription transactivation domains*)

**TIS:** senescencia inducida para terapia, por sus siglas en inglés *therapy-induced senescence*

**TLR4:** receptores tipo Toll 4

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , por sus siglas en inglés, *tumor necrotic factor  $\alpha$*

**U/uL:** unidades por microlitro

**UA:** unidades arbitrarias

**ul:** microlitro

**v/v:** volumen por volumen

## RESUMEN

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es una familia de proteínas relacionada con multitud de eventos celulares, entre los que destacan la inflamación, el cáncer y la senescencia celular, por lo que la descripción de los mecanismos de activación y silenciamiento de esta ruta es esencial para el conocimiento acerca de estos procesos. El principal componente de NF- $\kappa$ B es p65, el cual, es un activador de SASP. Este SASP está estrechamente relacionado con los procesos de la senescencia celular e inflamación, por lo que en este trabajo nos planteamos, mediante un desarrollo experimental basado en estudios moleculares, entender el papel de p65 en dichos procesos mediante su inducción en MSCs y la inhibición de la misma. Además, mediante la inhibición de p65 (usando MG-132, curcumina y JSH-23), no solo hemos podido validar su relación con la senescencia y la inflamación, si no, que la acción de estos inhibidores pone de relevancia su uso como senomórficos, con el fin de influir en futuras terapias celulares asociadas a paliar los efectos de la senescencia celular e inflamación.

**Palabras claves:** p65, NF- $\kappa$ B, senescencia, inflamación, senomórficos y SASP.

## RESUMO

O factor de transcripción NF- $\kappa$ B é unha familia de proteínas relacionadas cunha multitude de eventos celulares, entre os que destaca a inflamación, o cancro e a senescencia celular, polo que a descripción dos mecanismos de activación e silenciamiento desta ruta é esencial para o coñecemento de ditos procesos. O compoñent principal de NF- $\kappa$ B é p65, o cal, é un activador de SASP. Iste SASP está estreitamente relacionado cos procesos de senescencia celular e inflamación, polo que neste traballo planteamonos, mediante un desenvolvemento experimental baseado en estudos moleculares, entender o papel de p65 en ditos procesos mediante a inhibición de p65 (MG-132, curcumina e JSH-23), non só podemos validar a súa relación coa senescencia e a inflamación, se non, que a acción destes inhibidores pon de relieve o seu uso como senomórficos, có fin de influir en furturas terapias celulares asociadas a paliar os efectos da senescencia celular e a inflamación.

**Palabras chave:** p65, NF- $\kappa$ B, senescencia, inflamación, senomórficos y SASP.

## ABSTRACT

The transcription factor NF- $\beta$  is a family of proteins related to a multitude of cellular events, including inflammation, cancer and cellular senescence, so the description of the mechanisms of activation and silencing of this pathway is essential for the understanding of these processes. The main component of NF- $\beta$  is p65, which is an activator of SASP. This SASP is closely related to the processes of cellular senescence and inflammation, so in this work we aimed to know the role of p65 in these processes by means of an experimental development based on molecular studies and its induction in MSCs and its inhibition. Furthermore, by inhibiting p65 (MG-132, curcumin and JSH-23), we have not only been able to validate its relationship with senescence and inflammation, but the action of these inhibitors highlights its use as a senomorphic, in order to influence future cell therapies associated with alleviating the effects of cellular senescence and inflammation.

**Wordkeys:** p65, NF- $\kappa\beta$ , senescence, inflammation, senomorphics y SASP.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés *mesenchymal stem cells*) son un tipo de células madre adultas que tiene una alta capacidad de proliferación (autorenovación o en inglés *self-renewal*), así como la capacidad de diferenciarse a células del linaje mesodérmico (osteocitos, condrocitos y adipocitos), una de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) (J. Kim *et al.*, 2008; Weinberger *et al.*, 2016). Los diferentes estadios celulares se inducen por la coordinación transcripcional y diferentes interacciones proteína-proteína de la célula (J. A. Fafián-Labora *et al.*, 2019). En el caso de las MSCs se encuentran *NANOG* y *SOX2* (Fagnocchi *et al.*, 2016). A su vez todas las células, presentan marcadores de superficie (o CD por sus siglas en inglés *cluster of differentiation*) en concreto, las MSCs presentan los siguientes marcadores de superficie característicos: CD105, CD73, CD29 y CD90; y la ausencia de marcadores de precursores hematopoyéticos: CD45, CD34, CD14, CD11b y CD11 $\alpha$ .

Aunque en un primer momento las MSCs se obtuvieron a partir de la médula ósea, actualmente este tipo celular puede aislarse de diversos tejidos estromales como el cordón umbilical, la placenta, páncreas, tejido muscular o adiposo (J. A. Fafián-Labora *et al.*, 2019).

Para determinar que las células obtenidas son realmente MSCs la sociedad internacional de células y terapia génica o ISCT por sus siglas en inglés *International society cell & Gene Therapy* (<https://www.isctglobal.org/home>) ha reunido los diferentes métodos de aislamiento y caracterización de dichas células (Dominici *et al.*, 2006). En concreto, la ISCT sugiere que para identificar las MSCs se tenga las siguientes características (Dominici *et al.*, 2006):

1. La plasticidad y la adherencia de las propias células y la morfología fibroblástica.
2. La capacidad de diferenciarse en condrocitos, osteoblastos y adipocitos bajo diferentes condiciones *in vitro*.
3. La expresión de los marcadores de superficie mencionados y la ausencia de marcadores de otros tipos celulares.

El potencial terapéutico de las mismas, así como el modelado de enfermedad y validación de tratamientos de las células madre es uno de sus principales atractivos. Sin embargo, para este fin, es necesario descifrar los mecanismos moleculares que competen los

diferentes estadios celulares y el comportamiento de estas células a nivel *in vivo* e *in vitro*. Así mismo, a pesar del amplio conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan las propiedades de las MSCs, lo cierto es, que aún existen muchos mecanismos desconocidos para su manipulación para poder ser usadas como terapia.

## 1.2. Senescencia celular

La senescencia celular en MSCs es aquel estadio de la célula que se corresponde a un bajo poder de división y diferenciación además con alta actividad metabólica asociado con la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa lisosómica (J. A. Fafián-Labora *et al.*, 2019). En concreto, la acumulación de células senescentes está implicado con el proceso biológico de envejecimiento y por ello enfermedades relacionadas a la edad como cardiovasculares, artrosis entre otras... (Gorgoulis *et al.*, 2019; B. Wang *et al.*, 2020). Además, estas células presentan cambios característicos relacionados con la mitocondria como el poder oxidativo, el mantenimiento y dinamismo del propio orgánulo (J. A. Fafián-Labora *et al.*, 2019; J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2020; López-Otín *et al.*, 2013). Para el estudio de la senescencia celular, se han propuesto varios modelos que la promueven. Como se mencionó anteriormente, estas células presentan un metabolismo característico, el cual puede provocar daños a nivel de ADN, por lo que uno de los métodos para el estudio de la senescencia en modelos *in vitro* es el uso de sustancias como el etopósido que inducen daños en el ADN asociados a senescencia (o DDIS por sus siglas en inglés *DNA damage induced senescence*) (Mato-Basalo, *et al.* 2021) (**Figura 4B**). Por otro lado, otra de las maneras mas usadas para establecer la senescencia celular *in vitro* es mediante el uso de sustancias como palbociclib (**Figura 4A**). El palbociclib es un potente inhibidor de las Cdk (quinasas dependientes de ciclinas, por sus siglas en inglés, *cyclin-dependent kinases*) del ciclo celular, en concreto, de Cdk-1 y Cdk-6 (Valenzuela *et al.*, 2019). La inhibición de estas Cdk4/6 provoca el arresto proliferativo y en ultima instancia la entrada en senescencia mediante senescencia inducida por terapia o TIS por sus siglas en inglés *therapy-induced senescence*) (**Figura 4A**) (Mato-Basalo *et al.*, 2021; Valenzuela *et al.*, 2019). Las células senescentes no solo presentan una alteración del propio metabolismo celular, si no, que presentan una alta actividad de este, así como niveles elevados de transcripción y de traducción (J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2021). Otra de las características de estas células es que presentan un secretoma particular denominado fenotipo de senescencia asociado al secretoma (SASP por sus siglas en inglés, *the senescence-*

*associated secretory phenotype*) (J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2021). El SASP hace capaces a las células senescentes de crear un microambiente identitativo y capaz de comunicarse con el resto de células de su entorno a través de los distintos actores que lo componen, como son factores solubles (citoquinas o interleuquinas, entre otros), metaloproteasas y las vesículas extracelulares (o EV por sus siglas en inglés, *extracellular vesicles*) y lípidos mediadores (J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2021). Por ejemplo, se ha descrito que las EV procedentes de SASP (o evSASP, por sus siglas en inglés, *extracellular vesicles to the senescence-associated secretory phenotype*) tienen tanto efectos perjudiciales como beneficiosos para el entorno del que forman parte. Por un lado, las evSASP inducen senescencia en los fibroblastos humanos (Borghesan *et al.*, 2019), o favoreciendo la progresión tumoral (Takasugi *et al.*, 2017); por el contrario, pueden promover la reparación tisular a través de la transmisión de la senescencia y la disfunción del mismo tejido asociada al envejecimiento (J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2020). Otro importante componente de las células senescentes es la producción de componentes relacionados con el sistema inmune como las citoquinas y las interleuquinas. En concreto, parte de este fenotipo secretor esta compuesta por las interleuquinas 6 y 8 (IL-6 e IL-8, respectivamente), así como la citoquina TNF- $\alpha$  (J. Fafián-Labora *et al.*, 2020; Mato-Basalo *et al.*, 2021).

Con todo lo mencionado anteriormente, los mecanismos moleculares que están implicados en SASP es un atractivo campo para descubrir nuevos mecanismos y el desarrollo de nuevas terapias basadas en SASP.

### 1.3. Inflamación

La inflamación es un evento celular que se produce cuando hay una agresión a la integridad del individuo o de las células del propio individuo (Bernardo & Fibbe, 2013). La inflamación se caracteriza por la presencia en el ambiente factores solubles y celulares (citoquinas, quimiocinas, metaloproteasas, lípidos mediadores, vesículas extracelulares) en respuesta a un evento traumático, infeccioso, después de una ischemia, toxicidad o a una enfermedad autoinmune (Bernardo & Fibbe, 2013) como la aterosclerosis, la demencia y el cáncer.

Los factores liberados por las células que entran en inflamación (o un estado pro-inflamatorio) son capaces de interactuar con los receptores de superficie de distintos tipos celular. Uno de

estos factores de secreción es la citoquina TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , por sus siglas en inglés, *tumor necrotic factor  $\alpha$* ) que interactúa con los receptores de superficie de las MSCs y activa la ruta de NF- $\kappa$ B mediante la activación IKK (**Figura 2**) a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4) (Prockop & Youn Oh, 2012; Waterman *et al.*, 2010).

Estos mecanismos de activación de la inflamación se encuentran activados en diversas enfermedades. Un factor atenuante en la inflamación y del cual no se comprende todavía del todo es su relación con el envejecimiento, cuyo estudio se denomina, en inglés, *inflamm-aging* (Matacchione *et al.*, 2021). En el caso del envejecimiento nos encontramos con una acumulación de distintas sustancias y células que provocan la activación de una respuesta nociva y en definitiva la aparición de distintas enfermedades (J. A. Fafián-Labora & O’Loughlen, 2020). Esta acumulación de sustancias se cree que están relacionados con los componentes inflamatorios ya que el incremento de daños en diferentes orgánulos celulares como las mitocondrias provocan daños oxidativos (J. A. Fafián-Labora & O’Loughlen, 2021; Ghasemi *et al.*, 2019; Marinos *et al.*, 1995). Estos daños y el déficit de la renovación proteosomal pone de manifiesto como los procesos de envejecimiento e inflamación se encuentran relacionados, aunque los mecanismos por los cuales sucede no se comprendan del todo.

#### 1.4. Los senomórficos

Los senofármacos son fármacos que están basados en el proceso de senescencia para su desarrollo como los senolíticos que se encargan de eliminar selectivamente a las células senescentes sin afectar a células proliferantes, quiescentes o diferenciadas (Cano *et al.*, 2019). Por otro lado, tenemos los senomórficos que afectan a comunicación intercelular de las células senescentes mediante la modulación de SASP por medio de rutas como mTOR, NF- $\kappa$ B entre otras (J. A. Fafián-Labora & O’Loughlen, 2020). Sin embargo, los senolíticos, son fármacos que tienen la característica de inhibir rutas de supervivencia de las células como PI3K, p21 o BCL-xL (entre otros), así como, su resistencia a entrar en apoptosis (Tse *et al.*, 2008).

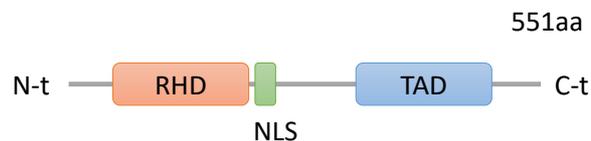
Durante los últimos años se han propuesto diferentes senolíticos y los senomórficos como una estrategia para mitigar los efectos del envejecimiento y sus enfermedades relacionadas como la artrosis, fibrosis y cáncer (E. C. Kim & Kim, 2019).

Por lo que, en última instancia, los senomórficos, junto con los senolíticos presentan un alto potencial en la terapia celular para el tratamiento de enfermedades asociadas a la edad como las mencionas anteriormente (E. C. Kim & Kim, 2019).

## 1.5. NF- $\kappa$ B

El factor nuclear kappa activador de la cadena ligera de la actividad de las células  $\beta$  o NF- $\kappa$ B, por siglas en inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, es una familia de factores transcripcionales de las que forman parte las proteínas p50, p52, p65 (o RELA), c-REL and RelB (Zhang *et al.*, 2017). Esta familia de factores de transcripción esta implicada en la regulación de diferentes procesos celulares, entre otros, en la respuesta inmune y la inflamación (Zhang *et al.*, 2017).

En concreto, el monómero p65 (o RELA) es el principal actor de la cascada desencadenada por esta familia de factores transcripcionales. Este monómero, consta de tres dominios principales: 1) un dominio de homología Rel o RHD (por sus siglas en inglés, *Rel homology domain*); 2) una secuencia de localización nuclear o NLS (por sus siglas en inglés *nuclear localization sequence*); y 3) un dominio transcripcional de transactivación o TAD (por sus siglas en inglés, *transcription transactivation domains*) (Zhang *et al.*, 2017).



**Figura 1. Dominios de p65.** El componente principal de NF- $\kappa$ B, p65, es una proteína de 551 aminoácidos (aa) que consta de un dominio de homología Rel o RHD en su extremo amino terminal o N-t, una secuencia de localización nuclear o NLS y un dominio transcripcional de transactivación o TAD en su extremo carboxilo o C-t.

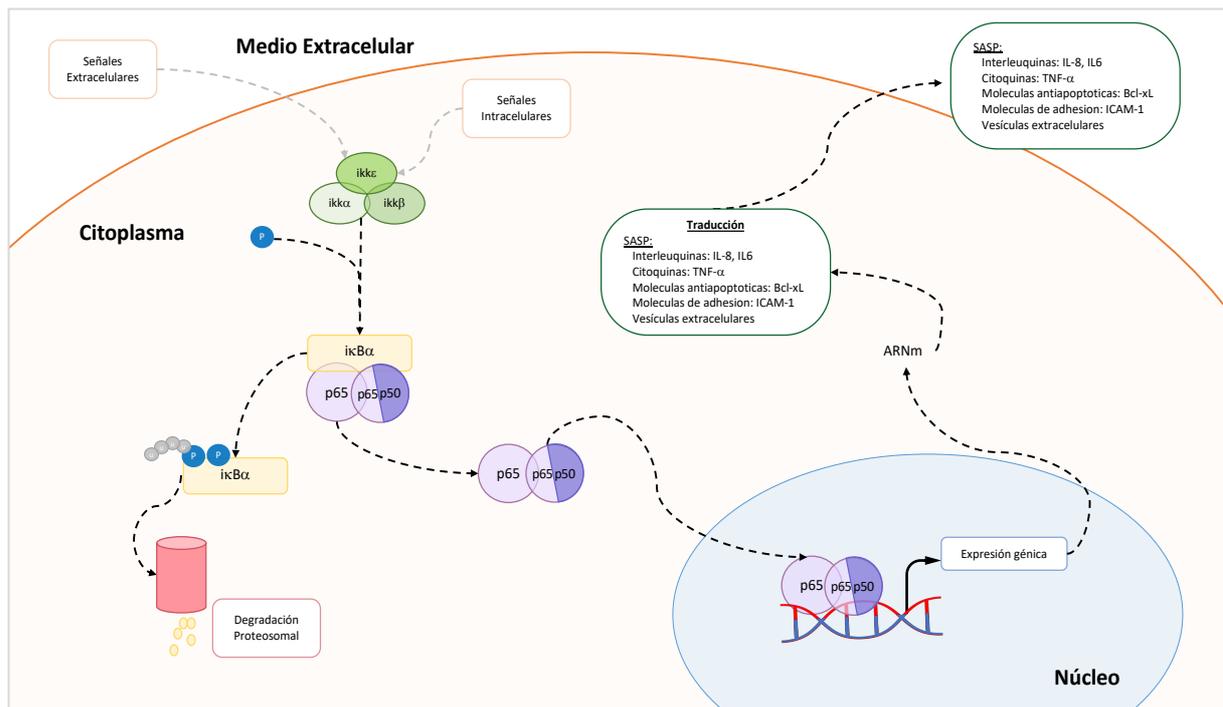
Dado que p65 ha sido el factor mejor descrito debido a su prevalencia en la activación de los procesos de inflamación, respuesta inmune y senescencia celular (J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2020). Se propone el estudio del p65 en este trabajo.

## 1.6. Ruta de NF- $\kappa$ B

Como se mencionó anteriormente, la familia de NF- $\kappa$ B esta conformada por una serie de monómeros, los cuales homo- o hetero- dimerizan para llevar a cabo su función (Liu *et al.*, 2017; Taniguchi & Karin, 2018). Las señales como las citoquinas, los oncogenes, el estrés oxidativo o el propio daño en el ADN desencadenan la activación de la cascada citoplasmática de activación de NF- $\kappa$ B (Liu *et al.*, 2017; Mato-Basalo *et al.*, 2021; Taniguchi & Karin, 2018).

Las proteínas que conforman la familia NF- $\kappa$ B se encuentran en el citoplasma asociados a una proteína del complejo  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (por sus siglas en ingles, *inhibitor of nuclear factor kappa B*) formando parte de una ruta clásica (o canónica), o bien formando heterodímeros en un estado de pre-procesado donde participarían en una ruta alternativa, no canónica (Liu *et al.*, 2017; Gutian Xiao *et al.*, 2001).

p65 se encuentra en el citoplasma formando homodímeros (p65-p65) o heterodímeros con p50 (p65-p50), que esta bajo el control de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , formando un complejo  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -p65-p65/p50 por lo que para su activación necesita que el complejo enzimático  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  se disocie (Liu *et al.*, 2017; Sun, 2011). Para provocar dicha disociación (y activar a NF- $\kappa$ B) se necesita que la intervención de unas kinasas (IKK) que fosforilen a  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , dichas kinasas son  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\beta$  e  $\text{I}\kappa\text{B}\epsilon$  (Liu *et al.*, 2017; Taniguchi & Karin, 2018; G. Xiao *et al.*, 2001). La degradación del complejo  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  viene determinada por la fosforilación de la proteína por parte de las IKKs, una vez fosforilada  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  se desprende del complejo  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -p65-p65/p50 dejando al dímero p65-p65/p50 libre, mientras que  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  fosforilada se degradada por el proteosoma (Liu *et al.*, 2017; Sun, 2011).



**Figura 2. Ruta de NF-κβ.** Las señales extracelulares e intracelulares activan a las IKK (ikκ, ikκβ e ikκϵ), kinasas que fosforilan al complejo enzimático ikBα, lo que provoca que se disocie del tetrámero formado por ikBα-p65-p65/p50. Una vez fosforilado y liberado, ikBα-Pi, esto permite su poliubiquitinación para ser posteriormente degradado por el proteosoma. Por otro lado, el dímero liberado, p65-p65/p50 es translocado al núcleo mediante el complejo del poro nuclear debido a la secuencia NLS presente en las proteínas. Una vez en el núcleo p65-p65/p50 se une a diferentes secuencias del ADN para promover la expresión génica de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) que en última instancia se traducen a los componentes, y posterior secreción, de SASP (fenotipo de senescencia asociado al secretoma, por sus siglas en inglés, *the senescence-associated secretory phenotype*): interleuquinas, como la interleuquina 8 (IL-8) y interleuquina 6 (IL-6); citoquinas como TNF-α (o factor de necrosis tumoral), moléculas antiapoptóticas como Bcl-1 (por sus siglas en inglés, *bafilomycin A1*), moléculas de adhesión como ICAM-1 (por sus siglas en inglés, *intracelular adhesión molecule 1*) o vesículas extracelulares.

Una vez libre, el homodímero p65-p65/p50 es translocado al núcleo celular debido al dominio NSL presente en las proteínas (Taniguchi & Karin, 2018; Zhang *et al.*, 2017). Una vez en el núcleo, estas proteínas se unen a distintas secuencias del ADN donde inducen la expresión de diferentes genes implicados en los diferentes procesos celulares en los que está implicado como: el mantenimiento de la senescencia celular en MEFs (por sus siglas en inglés, *mouse embryonic fibroblasts*) y MSCs (Mato-Basalo *et al.*, 2021; J. Wang *et al.*, 2009); la activación pro-inflamatoria inducida por el factor de necrosis tumoral α (o TNF-α por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor α*) en MSCs (Böcker *et al.*, 2008; Mato-Basalo *et al.*, 2021); y

la activación de las células del sistema inmune durante el proceso de envejecimiento (Flores *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2008; Mato-Basalo *et al.*, 2021).

## 1.7. Inhibidores de NF- $\kappa$ B con potencial como senomórficos

En biología molecular, una de las herramientas de las que disponen los investigadores para el estudio del efecto de una proteína, es el uso de inhibidores de la ruta de activación de la misma. El uso de estas sustancias permite relacionar la disminución de dicha proteína de estudio con el efecto que ella induce dentro de las células.

En este trabajo, nos centramos en el estudio de tres inhibidores que actúan en diferentes puntos de la ruta de p65 con el fin de aclarar la ruta de activación de NF- $\kappa$ B y su papel en los procesos de senescencia e inflamación celular. En concreto, los inhibidores seleccionados fueron: curcumina, MG-132 y JSH-23.

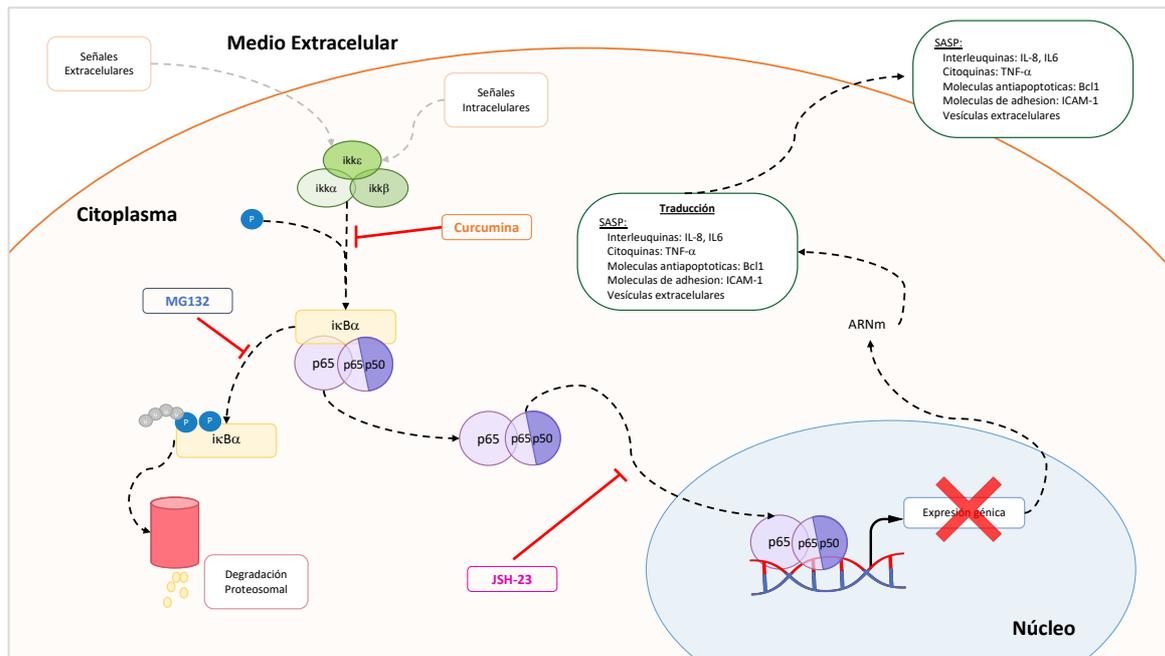
El primer inhibidor de la ruta de NF- $\kappa$ B del que vamos a hablar en este trabajo es la curcumina (o 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenilo)-1,6-heptadieno-3,5-diona), un fenol natural no tóxico aislado de la planta *Curcumina longa L.*, con propiedades anticancerígenas (Ghasemi *et al.*, 2019) (Ghasemi, F., *et al.*, 2019). Esta sustancia es capaz de interactuar con I $\kappa$ B, siendo capaz de inhibir la acción de las IKKs sobre I $\kappa$ B $\alpha$ , y en última instancia también inhibe a p65 (Gupta *et al.*, 2013).

Por otro lado, MG132 (o Cbz-leu-leu-leucinal) es un inhibidor del componente proteosomal y en la ruta de NF- $\kappa$ B bloquea la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibidor del dímero formado por p65-p65/50 (**Figura 3**) (Dolcet *et al.*, 2005). Además, bloquea la ubiquitinización del complejo I $\kappa$ B $\alpha$ -P, por lo que no permite su degradación por el proteosoma (Lee, 1998). Además, MG132 provoca la acumulación en el citoplasma de la célula de otras proteínas inmaduras, desplegadas o mal plegadas, ya que bloquea su degradación proteosomal, produciendo un estrés en el retículo endoplasmático (RE) (Dolcet *et al.*, 2005).

Se sabe que el estrés celular provocado por MG-132 induce la activación de C/EBP (proteína de unión al potenciador CCAAT, por sus siglas en inglés, *CCAAT/enhancer-binding protein*), una familia de factores de transactivación de proteínas implicadas en la proliferación, la diferenciación, el metabolismo y las respuestas inflamatorias. C/EBPb, una de las proteínas que conforman la familia de C/EBP posee un dominio bZIP capaz de interactuar con el dominio

RHD de las proteínas que conforman de NF- $\kappa$ B como p65 (**Figura 1**) inhibiendo la actividad de la misma (Dolcet *et al.*, 2005).

Por ultimo, el último compuesto utilizado para el estudio de la ruta de NF- $\kappa$ B fue JSH-23 o 4-metil-N1-(3-fenil-propil)-benceno-1,2-diamina ya que este inhibe la translocación nuclear del dímero p65-p50 (**Figura 3**) mediante la unión a la NLS del péptido p50 (Kumar *et al.*, 2011).



**Figura 3. Inhibidores de la ruta de NF- $\kappa$ B.** La curcumina interactúa con ikk $\beta$  impidiendo la fosforilación de ikB $\alpha$ , lo cual impide que se active la ruta de NF- $\kappa$ B por p65-p65/p50. MG132 actúa inhibiendo la poliubiquitinación de ikB $\alpha$  fosforilado y su degradación por el proteosoma. Por último, JSH-23 inhibe la translocación de p65-p50 uniéndose a la secuencia NLS de la proteína, impidiendo que entre en el núcleo y active la expresión génica de los diferentes componentes de SASP (fenotipo de senescencia asociado al secretoma, por sus siglas en inglés, *the senescence-associated secretory phenotype*): interleuquinas, como la interleuquina 8 (IL-8) e interleuquina 6 (IL-6); citoquinas como TNF- $\alpha$  (o factor de necrosis tumoral), moléculas antiapoptóticas como Bcl1 (por sus siglas en inglés, *bafilomycin A1*), moléculas de adhesión como ICAM-1 (por sus siglas en inglés, *intracellular adhesion molecule 1*) o vesículas extracelulares.

## 2. OBJETIVOS

Dada la relevancia de los procesos de senescencia e inflamación en el envejecimiento, en este estudio se persigue analizar el efecto de NF- $\kappa$ B en modelos de senescencia e inflamación obtenidos a partir de MSCs. Por lo que, proponemos los siguientes objetivos:

1. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales procedentes del estroma de cordón umbilical.
2. Establecimiento de la inducción de senescencia en células madre mesenquimales.
3. Evaluación de la activación de la ruta de p65 en células madre mesenquimales senescentes y pro-inflamatorias.
4. Evaluación de inhibidores de p65 en la senescencia celular y pro-inflamación de células madre mesenquimales.

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. Aislamiento de células madre mesenquimales (MSCs)

Para el desarrollo de este trabajo se usaron células madre mesenquimales (MSCs) procedentes de cordones umbilicales humanos (UC, por sus siglas en inglés *human umbilical cords*) obtenidas de cesáreas programadas a mujeres sanas y jóvenes (entre 26 y 25 años) de la unidad de maternidad del Complejo Hospitalario de la Universidad de A Coruña (CHUAC) bajo consentimiento e información previa siguiendo las guías de la declaración de Helsinki y aprobados por el Comité Ético del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) (2019/026 y 21/01/2019) (Arufe *et al.*, 2011). Las MSCs se aislaron siguiendo el protocolo de extracción del laboratorio de la Dra. María Arufe (Arufe *et al.*, 2011). Este protocolo consiste en: la recogida y mantenimiento del cordón en medio de cultivo en RPMi (por sus siglas en inglés, *roswell park memorial institute medium*) (Thermo Fisher, California, EE.UU) al 0% (v/v) suero bovino fetal (SBF o FBS por sus siglas en inglés, *fetal bovin suerum*) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Posteriormente, se realizan una serie de lavados con suero salino (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Una vez el cordón estuvo lo más limpio posible se procedió a realizar una primera digestión mecánica, para posteriormente realizar una digestión enzimática que consiste en realizar tres incubaciones con un cóctel enzimático (2 mg/ml de colagenasa y 1.15 mg/ml de dispasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en DMEM 0% (v/v) de suero fetal bovino con 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina) de 10 min cada una a 37 °C. Después, los explantes obtenidos se pusieron en una placa de cultivo de 100 mm (Thermo Fisher, California, EE.UU) con medio DMEM 10% (v/v) SBF, 1% (v/v) L-glutamina, 1% (v/v) penicilina-estreptomicina y gentamicina a 1:1000. Los explantes se mantuvieron durante 5 días en un incubador a 37°C y presión de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v). Durante todo este tiempo se añadió todos los días 2 ml de DMEM (10% (v/v) SBF, 1% (v/v) L-glutamina, 1% (v/v) penicilina-estreptomicina y gentamicina 1:1000). Tras este período se retiran los explantes, se lava con suero salino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) intentando arrastrar los trozos de textura gelatinosa. Todas estas placas con células se mantuvieron en el incubador de cuarentena creciendo hasta realizarles un test de micoplasma, una vez se observó que eran negativas para *Mycoplasma*, fueron pasadas a otro incubador en las mismas condiciones de presión y temperatura hasta tener una densidad celular

adecuada para proceder a su caracterización mediante citometría de flujo y realizar los experimentos que se muestran más adelante.

### 3.2. Cultivo celular de MSCs

Las MSCs procedentes del estroma de cordón umbilical (UC-MSCs) se cultivaron en medio estándar DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino de origen fetal (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (todos los reactivos procedentes de Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Todo el trabajo de cultivo celular se llevó a cabo siempre dentro de cámara de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Para el cultivo celular se utilizaron incubadores con niveles definidos de presión de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) y a 37°C de temperatura y el medio apropiado para su mantenimiento. Las células se cultivaron en placas de 150 mm, 100 mm de diámetro para el cultivo (Thermo Fisher, California, EE.UU) dependiendo de las densidades celulares necesarias en los experimentos. Se realizaron levantamiento de las células empleando tripsina 1X (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para la expansión de las mismas.

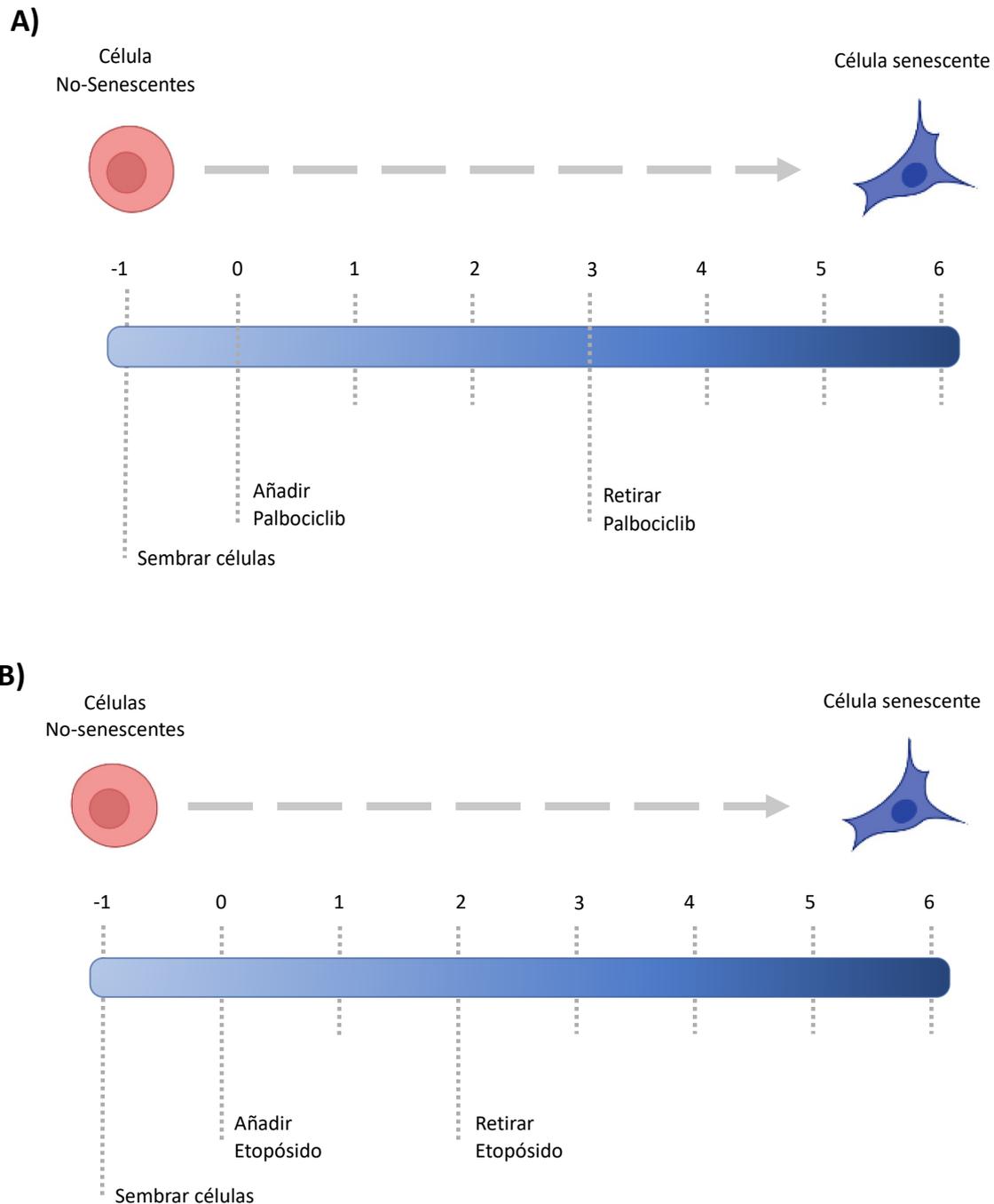
### 3.3. Modelos de senescencia

Para el desarrollo del modelo de senescencia se usaron UC-MSCs:

En primer lugar, el modelo de TIS (procedente del inglés *therapy-induced senescence*) para producir senescencia mediante la inhibición de las Cdks4/6 del ciclo celular, se usó palbociclib 1µM (MedChemexpress, New Jersey NJ, EE.UU) en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) penicilina-estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 3 días (**Figura 4A**). Trascurrido este tiempo se lavaron las células con PBS y se cultivaron con DMEM 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de penicilina y 1% (v/v) de estreptomicina (todo de Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante los siguientes tres días (**Figura 4A**).

Por otro lado, para inducir senescencia mediante daño en el ADN (DISS) se usó durante dos días medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS, 1%(v/v) de penicilina, 1% (v/v) de estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich, Madrid, España), junto con 1 µM Etopósido (MedChemexpress, Nueva Jersey, EE.UU) (**Figura 4B**). Seguidamente, se procedió a lavar las células con suero salino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y cultivadas con DMEM

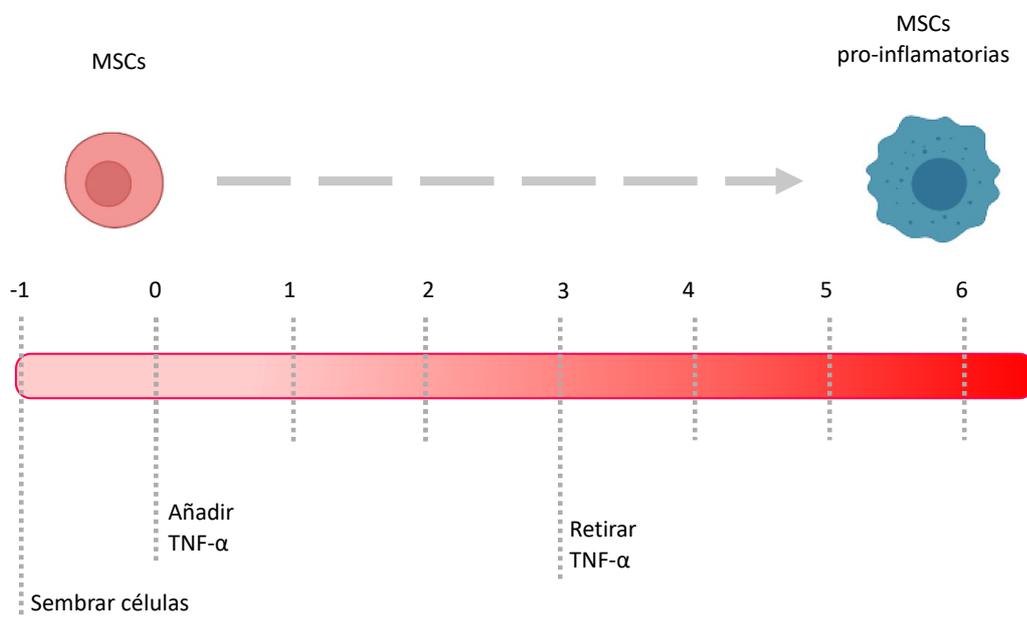
suplementado con 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de penicilina y 1% (v/v) de estreptomicina (todos de Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante los siguientes cuatro días (**Figura 4B**).



**Figura 4. Modelo de senescencia inducido.** **A)** Esquema de la inducción de senescencia TIS, se indujo mediante la aplicación de palbociclib a día 0 y se retiró al tercer día; **B)** modelos de senescencia DDIS, fue inducido mediante el uso de etopósido, con el cual se sembraron las células a día 0 del experimento y se retiró al segundo día. En ambos casos, A y B, se mantuvieron hasta el séptimo día y se evaluó la inducción de senescencia.

### 3.4. Modelos de inflamación

Para generar el modelo de pro-inflamación se cultivaron UC-MSCs con 5 ng/mL (v/v) de TNF- $\alpha$  recombinante (Immunotools, Gladiolenweg, Alemania) en DMEM con 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de penicilina y 1% (v/v) de estreptomina durante tres días. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con suero salino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se cultivaron las células durante los siguientes tres días con DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de penicilina y 1% (v/v) de estreptomina (todos de Sigma-Aldrich, Madrid, España) (Figura 5).

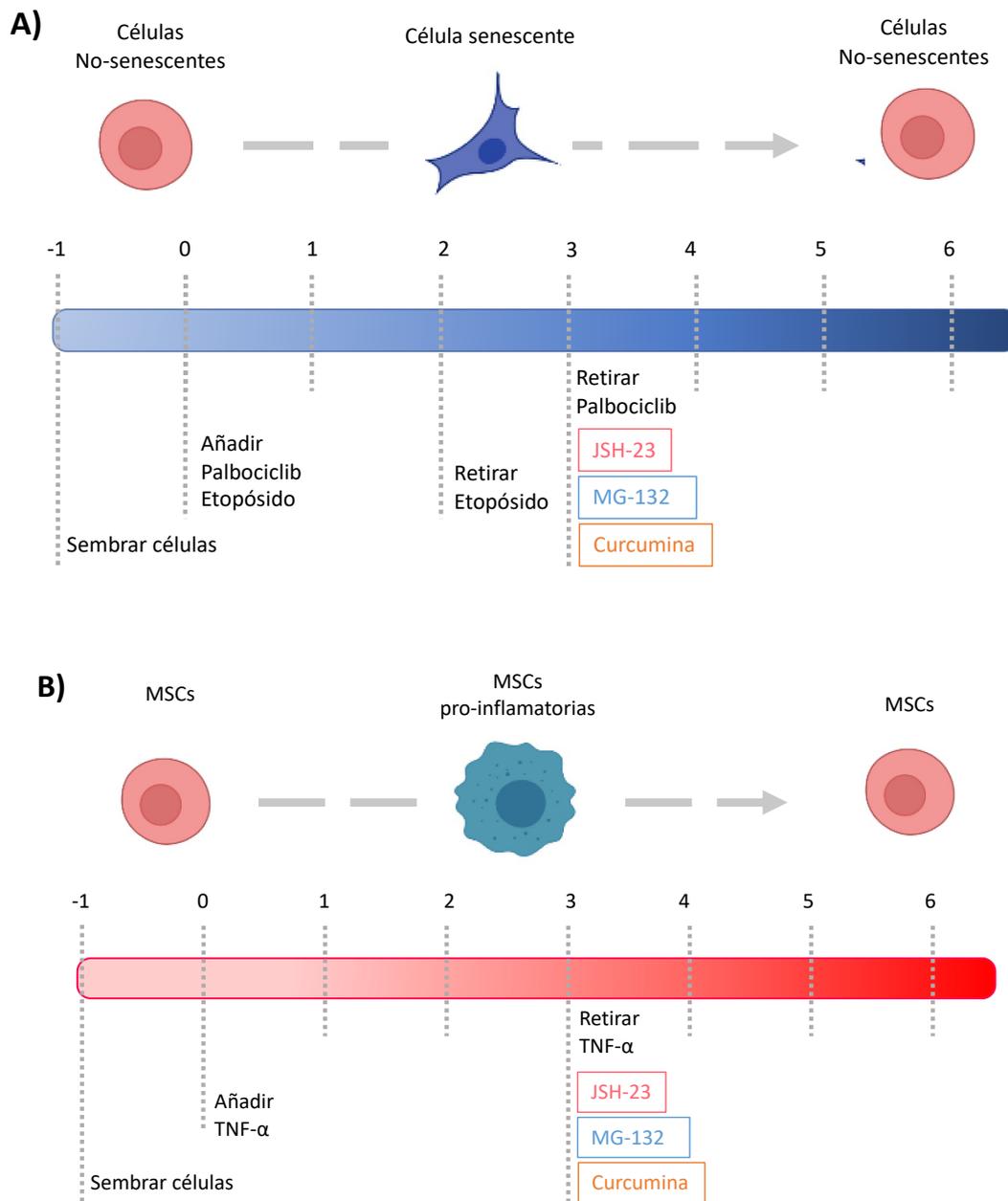


**Figura 5. Modelo de inducción de la inflamación.** Para el desarrollo experimental se sembraron las células a día 0 usando el inductor de la inflamación TNF- $\alpha$ , y se mantuvo el cultivo celular hasta el día 3 donde se realiza un cambio por medio DMEM.

### 3.5. Ensayos con los inhibidores de NF- $\kappa$ B

Tras obtener células UC-MSCs en los estados de senescencia e inflamación, mediante los procedimientos descritos en el apartado anterior (Figura 4 y 5), se procedió al estudio de la actuación de los senolíticos y senomórficos en estos estadios celulares. Se cultivaron dichas células en medio DMEM con 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de penicilina y 1% (v/v) de junto con 1  $\mu$ M de JSH-23 (MedChemExpress, Nueva Jersey, EE.UU), 1  $\mu$ M de MG-132

(MedChemExpress, Nueva Jersey, EE.UU) o 1  $\mu$ M de curcumina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) (Figura 6).



**Figura 6. Modelo de reversión del estados de senescencia y inflamación.** En el esquema **A** se muestra la secuencia de días que dura el experimento, donde a día 0 se siembran las células no-senescentes con los inductores de senescencia etopósido y palbociclib que provocan DDIS y TIS, respectivamente. A día 2 el se retira el medio con etopósido, mientras que el palbociclib es retirado a día 3. En ambos modelos, a día 3 se cambia el medio correspondiente y se cultivan las células con los inhibidores de p65: MG-132, curcumina y JSH-23. En el esquema **B** se muestra la secuencia de días que dura el experimento, donde a día 0 se siembran las células no-senescentes con los inductores inflamación TNF- $\alpha$ . A día 3 el se retira el medio con TNF- $\alpha$ . Se cambia el medio correspondiente y se cultivan las células con los inhibidores de p65: MG-132, curcumina y JSH-23.

### 3.6. Tinción cristal violeta

La tinción cristal violeta se emplea para evaluar la formación de colonias y proliferación celular en diferentes tipos celulares, en nuestro caso se hizo en células madre mesenquimales. Para ello, se preparó una disolución de cristal violeta al 0,5% (v/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en agua destilada. Las MSCs fueron lavadas con suero salino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) dos veces. Las células se fijaron empleando paraformaldehído al 4% (v/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 15 minutos. Después, se lavaron con agua destilada para eliminar los restos de la fijación. Las células se tiñeron con cristal violeta al 0,5% (v/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se agitó durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se retira el cristal violeta y se lava con agua destilada. Finalmente, se empleo acético al 30% (v/v) para disolver el cristal violeta durante 20 minutos para, posteriormente, medir el valor de la absorbancia, a 590 nm, de los pocillos usando un lector de placas NanoQuant (Tecan Trading AG, Mannedorf, Suiza).

### 3.7. Extracción de ARN

Para realizar la extracción de ARN (ácido ribonucleico) se siguió el protocolo de Trizol (Trizol reagent invitrogen, Thermo Fisher, California, EE.UU). Se lavaron las células con suero salino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) frío 3 veces y se añadió 500 uL de Trizol por 100000 células directamente sobre ellas. Se dejó incubar durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se homogenizo en los pocillos con la micropipeta. Seguidamente, se añadió 200 uL de cloroformo (Thermo Fisher, California, EE.UU) y se agito para homogenizar y se centrifugo durante 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. De cada se cogio la fase acuosa donde se encuentra el ARN al que se le añadió 850 uL de isopropanol (Thermo Fisher, California, EE.UU). Estos tubos se agitaron y se dejaron incubar durante 10 minutos en hielo. Se centrifugaron a 11000rpm a 4°C durante 30 minutos. Se decantaron y se secaron las paredes de los tubos, se lavaron usando 1 mL etanol al 75% (v/v) (Applichem Panreac, Illinois, EE.UU) en frío. Se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 7500 rpm, se retiraron el sobrenadante por decantación. Se dejó evaporar el etanol con los tubos *ependorf* abiertos y se re-suspendio el ARN en 20 uL de agua libre de RNasas (ThermoFisher, California, EEUU). Seguidamente, utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher, California, EE.UU) se cuantifico la cantidad de ARN. Finalmente, las muestras se guardaron a -80°C.

### 3.8. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario o cDNA por sus siglas en inglés, *complementary deoxyribonucleic acid*) se realizó la retrotranscripción empleando el kit comercial *Nzytech reverse transcriptase* (Thermo Fisher, California, EE.UU). Se realizó una mezcla de 50 ng de ARN con 50 ng/μL de radom hexamer y 10 mM dNTP Mix (Thermo Fisher, California, EE.UU) . Se incubaron a 65°C durante 5 minutos empleando un termociclador. Posteriormente, se le añadió 1U/ μl de enzima de retrotranscripción (*NZY reverse transcriptase*) preparada en tampón de reacción al 1X (Thermo Fisher, California, EE.UU). Por último, se incubaron a 50°C durante 30 minutos, seguido de 5 minutos a 80°C y finalmente a 4°C empleando el termociclador Applied Biosystems VERETI 96-W (Applied Biosystems, California, EE.UU). Los tubos se guardaron a -20°C hasta que se procedieron los experimentos de PCR cuantitativa.

### 3.9. PCR cuantitativa (qPCR)

Para realizar la PCR cuantitativa (qPCR) usando el fluoróforo SYBR Green (Light Cycle 4800 SYBR Green I Master kit) (Thermo Fisher, California, EE.UU). Se utilizó, una placa de 96 pocillos de placas para qPCR se cogieron por reacción: 2 uL del ADNc de la muestra a analizar, 5 uL de *Sybergreen 2X*, y 2 uL de los cebadores sentido y antisentido para detectar los genes a analizar. Posteriormente se metieron las muestras en el equipo de análisis Real Time Light Cycler (Roche, Basilea, Suiza) con el siguiente programa: un primer ciclo de desnaturalización a 92°C durante 2 minutos; un paso de amplificación de 40 ciclos a 92°C durante 15 segundos; un ciclo para el anillamiento a 55°C durante 30 segundos; y a 72°C durante 15 segundos para la extensión. Finalmente, los datos fueron analizados aplicando el cálculo DDct (Zhang, J. D., *et al.*, 2013) de los genes presentes en la **Tabla 1**.

Gen		Secuencias 5' → 3'
<i>p65</i>	F	TTCCCGATCTGAGTCCAGGT
	R	GCTTGTCTCGGGTTTCTGGA
<i>IL-6</i>	F	CCAGGAGCCCAGCTATGAAC
	R	CCCAGGGAGAAGGCAACTG
<i>IL-8</i>	F	GAGTGGACCACACTGCGCCA
	R	TCCACAACCCTCTGCACCCAGT
<i>HPRT</i>	F	ATGACCAGTCAACAGGGGACA
	R	GCTTGCGACCTTGACCATCT

**Tabla 1. Cebadores qPCR.** Genes analizados por qPCR. Lista con los oligonucleótidos utilizados para la detección de la expresión de los genes indicados. F (por venir de la palabra inglesa *forward*) o aguas arriba y R (por venir de la palabra inglesa, *reverse*) o aguas abajo, que previamente fueron validados para la qPCR.

### 3.10. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que nos permite obtener información sobre una población celular de la que tomamos una muestra representativa. Esta técnica es realizada mediante un citómetro de flujo, citómetro o FACS (por sus siglas en inglés *fluorescence-activated cell sorter*) obteniendo información de la fluorescencia y tamaño de las partículas analizadas. Esta técnica consiste en generar una corriente de células sobre las que se hace incidir un haz de luz láser, produciendo dispersión y reflexión según choca el haz con las células en suspensión. Posteriormente, se analiza ya almacenan los datos de la duración, intensidad y espectro de la dispersión y la reflexión. Esta técnica se basa en el análisis de dos parámetros: el tamaño de la partícula se obtiene analizando la dispersión frontal, FCS (por sus siglas en inglés *forward scattering*); y la complejidad, granulosidad intracelular de la partícula se obtiene por el parámetro SSC (por sus siglas en inglés *side angle scattering*). Además, la citometría de flujo es compatible con el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos para detectar la fluorescencia de los mismo, esto permite la detección de diferentes tipos celulares en una misma muestra.

En concreto para la caracterización de UC-MSC utilizadas en este trabajo, se incubaron 200.000 células durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos para células mesenquimales (CD90-FITC, CD73-PE y CD105-FITC) y marcadores de células hematopoyéticas (CD45-FITC y CD-34) a una concentración 1:1000 (todos los anticuerpos de BD Pharmingen, Madrid, España). Además, se incubaron las células con los isotipos (todos procedentes de BD Pharmingen, Madrid, España) de los anticuerpos utilizados como control negativo. Tras esta incubación, se lavaron tres veces con PBS y se procedió a su análisis empleando el citómetro de flujo y separador. Los datos mostrados se obtuvieron mediante BD FACSDica (BD Science, San Jose, CA, EE.UU).

### 3.11. Estadística

Para la obtención de la estadística, en este trabajo se realizó la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov considerando que los grupos comparados no estaban emparejados debido a la alta variabilidad de las líneas celulares usadas. Los datos obtenidos fueron indicados usando la media  $\pm$  SD (error estándar de la media, por sus siglas en inglés *standard deviation*) y las probabilidades se representaron como: \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ) y \*\*\*( $p < 0,001$ ). En el caso de los datos de la citometría de flujo, al tratarse de una muestra representativa, no se realizó ninguna prueba estadística, sin embargo, los datos obtenidos fueron expresados usando la media  $\pm$  SD.

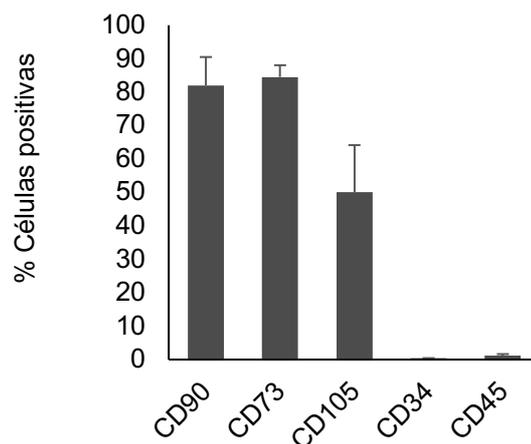
### 3.12. Revisión bibliográfica

Para la obtención de la bibliografía utilizada en este trabajo se usaron las plataformas digitales de libre acceso, Google Académico (<https://scholar.google.es/>) y PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

## 4. RESULTADOS Y DICUSIÓN

### 4.1. Caracterización de las MSCs mediante citometría de flujo

La caracterización de las MSCs aisladas del estroma de cordón umbilical de pacientes humanas mediante la técnica citometría de flujo nos muestra que las células son positivas con un 82,00%, 84,50% y 50,00%, para los marcadores de diferenciación celular (o CD por sus siglas en inglés, *cluster of differentiation*) de MSCs CD90, CD73 y CD105 respectivamente (**Figura 7**). Mientras que los porcentajes para marcadores de diferenciación de células hematopoyéticas CD34 y CD45 son 0,35% y 1,20% respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por el grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del INIBIC (Mato-Basalo *et al.*, 2021).

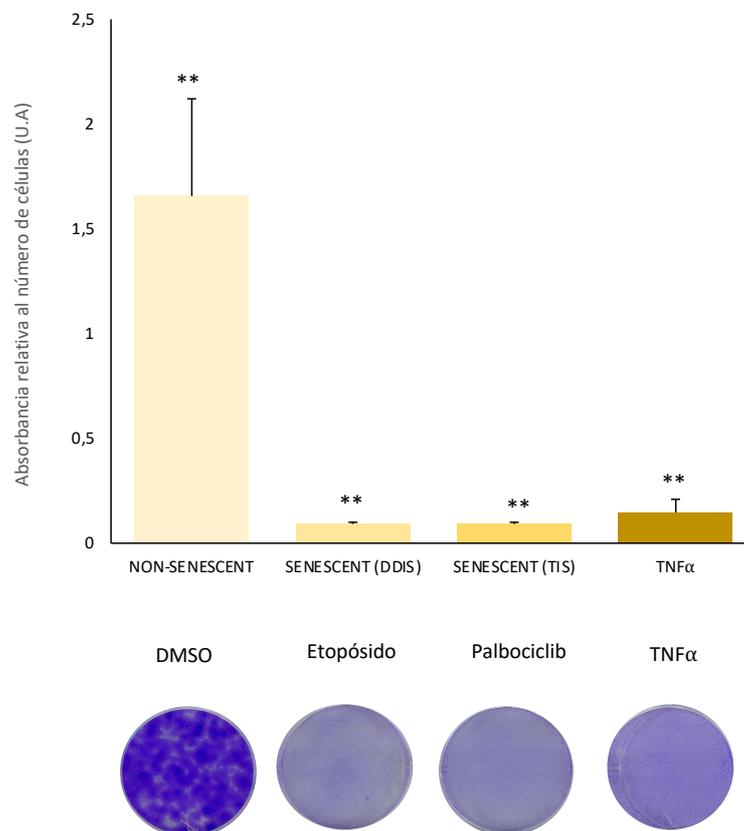


**Figura 7. Caracterización celular mediante citometría de flujo.** En el gráfico se muestra un experimento representativo con el porcentaje (%) de células positivas para los marcadores de diferenciación celular (CD) de MSCs: CD90, CD73 y CD105; y células hematopoyéticas: CD34 y CD45.

### 4.2. Obtención de modelos de senescencia y pro-inflamación

Las MSCs no senescentes o proliferativas, en contraste con las células senescentes y pro-inflamatoria, presentan una alta capacidad de proliferación. Dicho esto, un método rápido para evaluar la inducción de estos procesos es mediante la técnica de tinción cristal violeta,

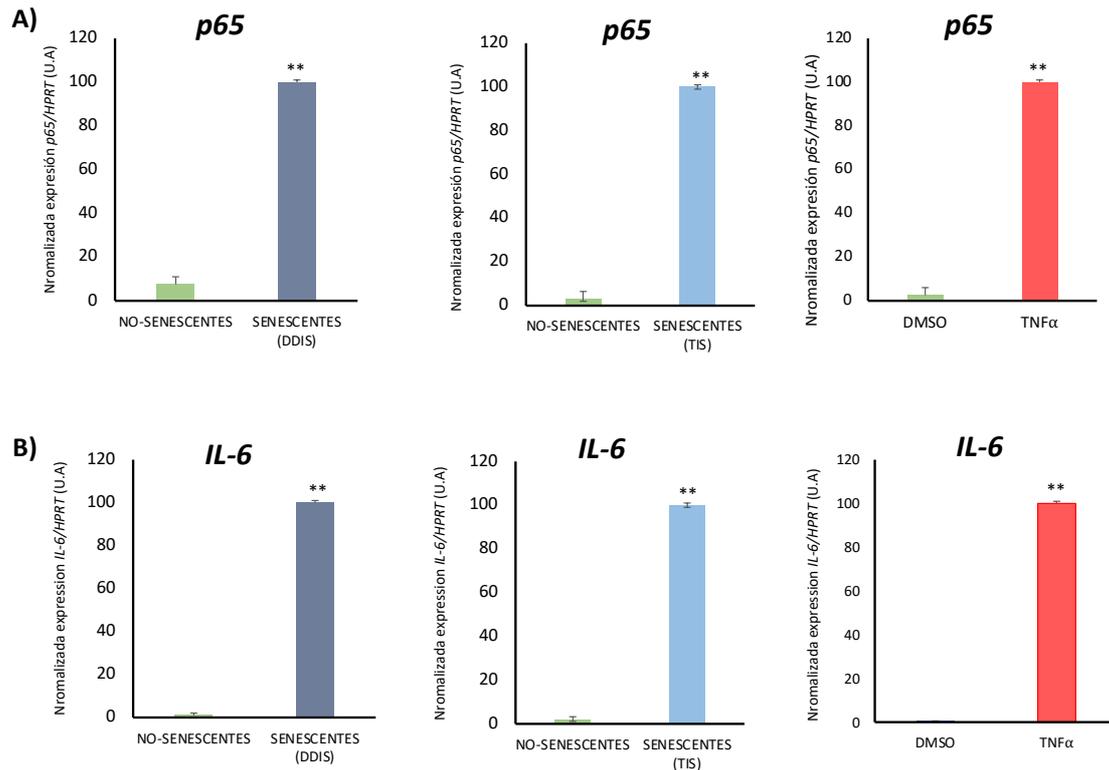
como se describió anteriormente en el apartado de material y métodos. En la **Figura 8** se observa la capacidad proliferativa de las células en diferentes condiciones: 1) control con DMSO; 2) modelo de senescencia por DDIS inducido por etopósido; 3) modelo de senescencia por TIS inducida por palbociclib; y 4) modelo de pro-inflamación inducido por TNF- $\alpha$ . Por un lado, en **Figura 8B**, podemos ver como el tapiz de células se tiñe en los diferentes pocillos a diferentes intensidades, cuya cuantificación podemos ver en el gráfico de la **Figura 8A** en términos de absorbancia relativa al número de células por pocillo. Para esto, se sembraron en placas de 24 pocillos unas 15.000 células por cada uno. Seguidamente, se procedió a la inducción y establecimiento de senescencia (**Figura 4**) y pro-inflamación (**Figura 5**) como se describió en el apartado de material y métodos.



**Figura 8. Evaluación de la proliferación celular en DDIS, TIS y PA.** Para el análisis de la proliferación celular se usó la técnica cristal violeta, donde en **A**) podemos ver la cuantificación de la técnica cristal violeta de los modelos de senescencia (DDIS y TIS) y pro-inflamatorio (PA) TNF- $\alpha$  comparando los con un control con DMSO. **B**) Se muestra una imagen representativa de la técnica en los modelos de senescencia DDIS, TIS y PA comparados con el control DMSO. Los datos de la figura **A** muestran las barras de error que representan la desviación estándar (n=3 réplicas técnicas). Son considerados valores estadísticamente significativos \*\* p<0,01.

Con esta parte, podemos determinar que los modelos desarrollados en MSCs pueden ser empleados para mimetizar la senescencia celular y el fenotipo pro-inflamatorio fisiológico a nivel *in vitro*.

Una vez validada la capacidad proliferativa de los modelos de senescencia y pro-inflamatorios, se procedió a la evaluación de la inducción de la ruta de NF- $\kappa$ B mediante la activación de p65 por qPCR, mediante el análisis de expresión de la propia p65 y de los productos final de la ruta como la interleucina 6 (IL-6) (**Figura 9**). Se usaron los cebadores o *primers* mostrados anteriormente en la **Tabla 1** del apartado de material y métodos, donde se representó su expresión normalizando la expresión de dichos genes normalizándolo frente al gen *HPRT* (hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa, por sus siglas en inglés, *hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*), un gen de mantenimiento o en inglés *housekeeping* (**Figura 9**). Por un lado, podemos ver como los niveles de p65 se incrementaron significativamente en todos los modelos inducidos, en comparación con un control no-senescentes y no-pro-inflamatorio (**Figura 9A**). Además, podemos ver como el gen de la interleuquina 6 (*IL-6*), también se encuentra incrementado en comparación a los controles en estos modelos (**Figura 9B**).

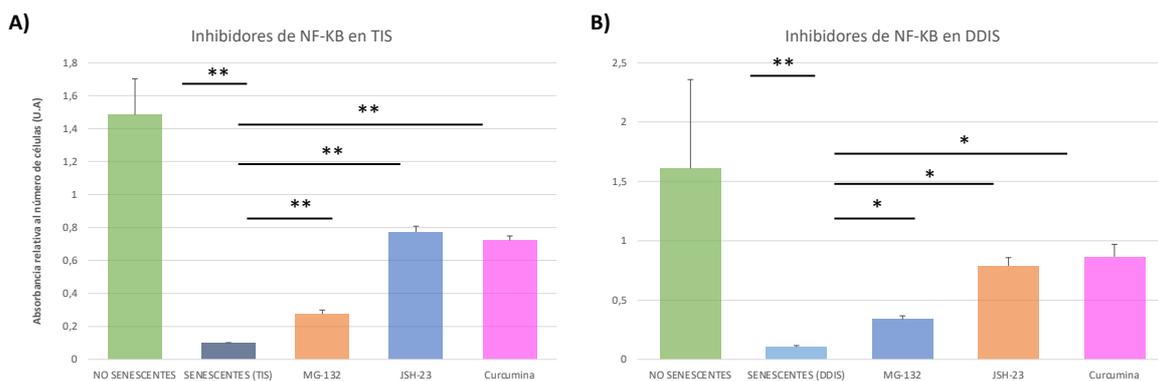


**Figura 9. La inducción de senescencia incrementa los productos finales de la ruta de NF- $\kappa$ B.** Se realizó el análisis de la expresión de genes de la ruta de NF- $\kappa$ B mediante qPCR en modelos de inducción de senescencia DDIS, TIS y TNF- $\alpha$  a partir de MSCs. **A)** Expresión relativa de *p65* en DDIS, TIS y TNF- $\alpha$ . **B)** Expresión relativa de *IL-6* en los dos modelos de senescencia y pro-inflamación. Tanto en **A** como en **B** se muestran la media y las barras de error que representan la desviación estándar (n=3 réplicas técnicas). Los datos se representan usando la media  $\pm$  SD (error estándar de la media, por sus siglas en inglés *standard deviation*) y las probabilidades se representaron como: \*\*( $p < 0,01$ ).

En conjunto, estos datos nos muestran que se produjo activación de la ruta de p65 en senescencia e inflamación en MSCs procedentes del estroma del cordón umbilical similar a los resultados publicados por nuestro grupo con fibroblastos y células de cáncer de mamá (Borghesan *et al.*, 2019) y los obtenidos por Pandey *et al.* 2021 en MSCs procedentes de médula ósea y tejido adiposo (Pandey *et al.*, 2011). Una vez confirmada la activación de p65 en los modelos que hemos llevado a cabo procedemos al estudio de p65 en ambos modelos y ver si existen una relación común entre senescencia e inflamación para el desarrollo de una terapia.

### 4.3. El uso de senomórficos previene los estadios de senescencia y pro-inflamación

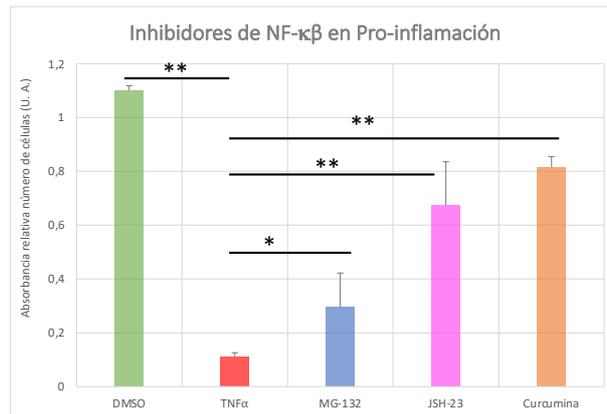
Durante los últimos años se han descrito una gran variedad de sustancias químicas denominados senomórficos, ya que pueden variar SASP afectando a la comunicación entre células de manera paracrina y autocrina (J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2020). Compuestos han dado resultados prometedores en terapias contra diferentes patologías como el cáncer y enfermedades asociadas a la edad. En este trabajo, nos hemos centrado en estudiar tres compuestos altamente prometedores en este tipo de terapias, el MG-132, la curcumina y JSH-23. En un principio, estos compuestos interactúan a diferentes alturas de la ruta de NF- $\kappa$ B, en concreto inhiben la activación de p65 (**Figura 3**).



**Figura 10. Efecto de senomórficos en la senescencia celular.** Cuantificación de la proliferación celular mediante la medición de las absorbancias de la técnica cristal violeta. **A)** Efecto en la proliferación celular de los inhibidores de p65, MG-132, curcumina y JSH-23 en modelos de senescencia inducidos por TIS y usando DMSO como control de la inducción. **B)** Efecto de los inhibidores en modelos de senescencia inducidos por DDIS. Los datos se representan usando la media  $\pm$  SD (error estándar de la media, por sus siglas en inglés *standard deviation*) y las probabilidades se representaron como: \*( $p < 0,05$ ) y \*\*( $p < 0,01$ ).

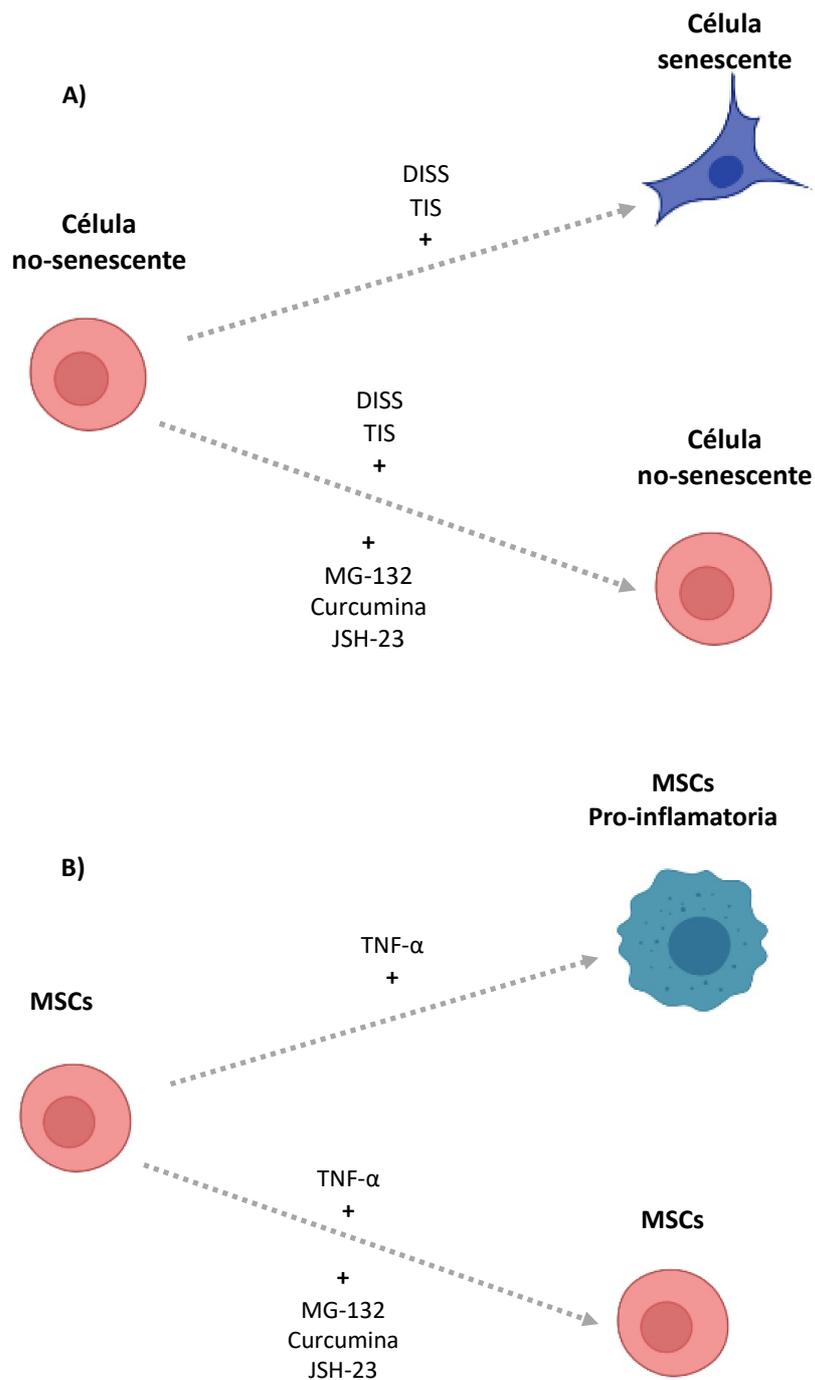
Con el fin de estudiar como p65 influía en los procesos de senescencia (**Figura 10**) y pro-inflamación (**Figura 11**), decidimos usar estos compuestos en un ensayo de proliferación celular cuantificando la absorbancia de la técnica de cristal violeta (descrita en material y métodos). En estos resultados vemos como la capacidad proliferativa de las células senescentes (**Figura 10**) y pro-inflamatorias (**Figura 11**) es inferior a los controles con células no senescentes tratadas con DMSO (**Figura 10** y **11**). Sin embargo, vemos que al usar los

inhibidores de p65, la capacidad proliferativa de las células aumenta, lo que nos indica que, dentro de las distintas proteínas que forman parte de NF- $\kappa$ B, p65 es un actor principal en la inducción de los estadios de senescencia celular y pro-inflamación. Además, estos resultados nos indican la potencialidad de MG-132, curcumina y JSH-23, validando su función como senomórfico.



**Figura 11. Efecto de senomórficos en pro-inflamación celular.** Cuantificación de la absorbancia del cristal violeta para determinar la proliferación celular con el efecto de los inhibidores de p65 (MG-132, curcumina y JSH-23) en modelos de pro-inflamación inducidos por TNF- $\alpha$  usando DMSO como control. Los datos se representan usando la media  $\pm$  SD (error estándar de la media, por sus siglas en inglés *standard desviation*) y las probabilidades se representaron como: \*( $p < 0,05$ ) y \*\*( $p < 0,01$ ).

Gracias a los resultados anteriores, podemos ver como fuimos capaces de inducir senescencia celular (**Figura 4 y 12A**) y estado pro-inflamatorio (**Figura 5 y 12B**) en MSCs. Además, vemos como las sustancias MG-132, curcumina y JSH-23 son capaces de actuar como senomórficos y revertir el fenotipo de los modelos de senescencia y pro-inflamatorios utilizados (**Figura 12**) y su potencial para ser empleados como fármacos para mantener las propiedades de las MSCs en cultivo celular para el tratamiento de enfermedades asociadas a la edad como la arterosclerosis y artrosis.



**Figura 12. Efecto de senomórficos en modelos de DDIS, TIS y PA.** (A) Esquema de inducción de senescencia en células madre mesenquimales en los modelos de DDIS y TIS (B) y activación pro-inflamatoria con TNF- $\alpha$ . También vemos como el uso de las sustancias denominadas senomórficos (MG-132, curcumina y JSH-23) son capaces de revertir tanto la inflamación como la senescencia.

## 5. CONCLUSIONES

El objetivo general de este trabajo se centró en la descripción de la ruta de p65 en los procesos de senescencia celular e inflamación. La proteína p65 es el principal componente de la familia de factores transcripción NF- $\kappa$ B implicados en la respuesta inmune e inflamación. Sin embargo, el papel de p65 no está del todo claro en el proceso de senescencia celular. La producción de las citoquinas como el TNF- $\alpha$  procedentes de SASP sugería que p65 estaba interviniendo en senescencia e inflamación celular, ambos procesos relacionados con el envejecimiento. A su vez, el uso de senomórficos para paliar los síntomas asociados al envejecimiento hacia sospechar la relación de dichos compuestos en la senescencia celular.

Tras el desarrollo y análisis experimental obtenidos en este trabajo pudimos concluir que:

- 1. Se obtuvieron las MSCs procedentes del estroma del cordón umbilical.** Las células obtenidas del estroma del cordón umbilical son células madre mesenquimales (MSCs) en base a los parámetros descritos por sociedad internacional de células y terapia génica o ISCT por sus siglas en inglés *International society cell & Gen Therapy*, pues estas células presentan capacidad de plasticidad y adherencia, de diferenciación a condrocitos, osteoblastos y adipocitos bajo diferentes condiciones *in vitro* así como la expresión de los marcadores de superficie CD105, CD73, CD29 y CD90 y la ausencia de: CD45, CD34, CD14, CD11b y CD11 $\alpha$ .
- 2. Se estableció senescencia mediante dos modelos DDIS y TIS.** Usando las sustancias etopósido y palbocilib, se causo daños al nivel del DNA y la inhibición de las Cdk's del ciclo celular respectivamente que causaron la entrada en senescencia de las MSCs utilizadas.

- 3. Aumento de los niveles de p65 en los estadios celulares de senescencia y pro-inflamación en MSCs.** La actuación de NF- $\kappa$ B mediante el incremento de los niveles de p65 y componentes finales de la ruta (IL-6), evaluados en este trabajo apuntan a una relación directa con el establecimiento de los procesos de senescencia y pro-inflamatorios.
  
- 4. Papel de los inhibidores de p65, curcumina, MG-132 y JSH-23 como senomórficos.** Se observó que el uso de los inhibidores de p65 (curcumina, MG-132 y JSH-23) inhiben la entrada en senescencia celular y activación pro-inflamatoria de MSCs, por ello son considerados unos compuestos que puedan ser empleados como senomórficos para mantener las propiedades de estas células y abren su posible estudio para la implementación de estos compuestos en la terapia celular.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Arufe, M. C., de la Fuente, A., Fuentes, I., De Toro, F. J., & Blanco, F. J. (2011). Umbilical cord as a mesenchymal stem cell source for treating joint pathologies. *World Journal of Orthopedics*, 2(6), 43–50. <https://doi.org/10.5312/wjo.v2.i6.43>
- Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.006>
- Böcker, W., Docheva, D., Prall, W. C., Egea, V., Pappou, E., Roßmann, O., Popov, C., Mutschler, W., Ries, C., & Schieker, M. (2008). IKK-2 is required for TNF- $\alpha$ -induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Molecular Medicine*, 86(10), 1183–1192. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0378-3>
- Borghesan, M., Fafián-Labora, J., Eleftheriadou, O., Carpintero-Fernández, P., Paez-Ribes, M., Vizcay-Barrena, G., Swisa, A., Kolodkin-Gal, D., Ximénez-Embún, P., Lowe, R., Martín-Martín, B., Peinado, H., Muñoz, J., Fleck, R. A., Dor, Y., Ben-Porath, I., Vossenkamper, A., Muñoz-Espin, D., & O’Loughlen, A. (2019). Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell Reports*, 27(13), 3956–3971.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.095>
- Cano, M., Guerrero-Castilla, A., Nabavi, S. M., Ayala, A., & Argüelles, S. (2019). Targeting pro-senescence mitogen activated protein kinase (Mapk) enzymes with bioactive natural compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110544. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.05.052>
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv 2005* 446:5, 446(5), 475–482. <https://doi.org/10.1007/S00428-005-1264-9>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Fafián-Labora, J. A., Morente-López, M., & Arufe, M. C. (2019). Effect of aging on behaviour of mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 11(6), 337–346. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i6.337>
- Fafián-Labora, J. A., & O’Loughlen, A. (2020). Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing. *Trends in Cell Biology*, 30(8), 628–639. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.05.003>
- Fafián-Labora, J. A., & O’Loughlen, A. (2021). NF- $\kappa$ B/IKK activation by small extracellular vesicles within the SASP. *Aging Cell*, May, 1–16. <https://doi.org/10.1111/accel.13426>
- Fafián-Labora, J., Morente-López, M., Sánchez-Dopico, M. J., Arntz, O. J., Van De Loo, F. A. J., De Toro, J., & Arufe, M. C. (2020). Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing. *Stem Cell Research and Therapy*,

11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1534-0>

- Fagnocchi, L., Mazzoleni, S., & Zippo, A. (2016). Integration of signaling pathways with the epigenetic machinery in the maintenance of stem cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8652748>
- Flores, R. R., Clauson, C. L., Cho, J., Lee, B. C., McGowan, S. J., Baker, D. J., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2017). Expansion of myeloid-derived suppressor cells with aging in the bone marrow of mice through a NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. *Aging Cell*, 16(3), 480–487. <https://doi.org/10.1111/ace1.12571>
- Ghasemi, F., Shafiee, M., Banikazemi, Z., Pourhanifeh, M. H., Khanbabaie, H., Shamshirian, A., Amiri Moghadam, S., ArefNezhad, R., Sahebkar, A., Avan, A., & Mirzaei, H. (2019). Curcumin inhibits NF- $\kappa$ B and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways in cervical cancer cells. *Pathology Research and Practice*, 215(10), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152556>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Gupta, S. C., Patchva, S., & Aggarwal, B. B. (2013). Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. *AAPS Journal*, 15(1), 195–218. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9432-8>
- Huang, M.-C., Liao, J.-J., Bonasera, S., Longo, D. L., & Goetzl, E. J. (2008). Nuclear factor- $\kappa$ B-dependent reversal of aging-induced alterations in T cell cytokines. *The FASEB Journal*, 22(7), 2142–2150. <https://doi.org/10.1096/fj.07-103721>
- Kim, E. C., & Kim, J. R. (2019). Senotherapeutics: Emerging strategy for healthy aging and age-related disease. *BMB Reports*, 52(1), 47–55. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.1.293>
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., & Orkin, S. H. (2008). An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Cell*, 132(6), 1049–1061. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.039>
- Kumar, A., Negi, G., & Sharma, S. S. (2011). JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: Effect on neuroinflammation and antioxidant defence. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(8), 750–758. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01402.x>
- Lee, D. H. (1998). Proteasome inhibitors: Valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology*, 8(10), 397–403. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01346-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01346-4)
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(April). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

- Marinos, G., Naoumov, N. V., Rossol, S., Torre, F., Wong, P. Y. N., Gallati, H., Portmann, B., & Williams, R. (1995). Tumor necrosis factor receptors in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, *108*(5), 1453–1463. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90694-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90694-0)
- Matacchione, G., Gurău, F., Silvestrini, A., Tiboni, M., Mancini, L., Valli, D., Rippo, M. R., Recchioni, R., Marcheselli, F., Carnevali, O., Procopio, A. D., Casettari, L., & Olivieri, F. (2021). Anti-SASP and anti-inflammatory activity of resveratrol, curcumin and  $\beta$ -caryophyllene association on human endothelial and monocytic cells. *Biogerontology*, *22*(3), 297–313. <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09915-0>
- Mato-Basalo, R., Morente-López, M., Arntz, O. J., van de Loo, F. A. J., Fafián-Labora, J., & Arufe, M. C. (2021). Therapeutic potential for regulation of the nuclear factor Kappa-B transcription factor p65 to prevent cellular senescence and activation of pro-inflammatory in mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073367>
- Pandey, A. C., Semon, J. A., Kaushal, D., O’Sullivan, R. P., Glowacki, J., Gimble, J. M., & Bunnell, B. A. (2011). MicroRNA profiling reveals age-dependent differential expression of nuclear factor  $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase in adipose and bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy 2011 2:6*, *2*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1186/SCRT90>
- Prockop, D. J., & Youn Oh, J. (2012). Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Molecular Therapy*, *20*(1), 14–20. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.211>
- Sun, S. C. (2011). Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Research*, *21*(1), 71–85. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.177>
- Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., & Hara, E. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nature Communications*, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms15728>
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nature Reviews Immunology*, *18*(5), 309–324. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>
- Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H., & Elmore, S. W. (2008). *ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5836>
- Valenzuela, C. A., Quintanilla, R., Olate-Briones, A., Venturini, W., Mancilla, D., Cayo, A., Moore-Carrasco, R., & Brown, N. E. (2019). SASP-dependent interactions between senescent cells and platelets modulate migration and invasion of cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215292>
- Wang, B., Kohli, J., & Demaria, M. (2020). Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer*, *6*(10), 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>
- Wang, J., Jacob, N. K., Ladner, K. J., Beg, A., Perko, J. D., Tanner, S. M., Liyanarachchi, S.,

- Fishel, R., & Guttridge, D. C. (2009). RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair. *EMBO Reports*, *10*(11), 1272–1278. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.197>
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE*, *5*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., & Hanna, J. H. (2016). Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(3), 155–169. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28>
- Xiao, G., Cvijic, M. E., Fong, A., Harhaj, E. W., Uhlik, M. T., Waterfield, M., & Sun, S. C. (2001). Retroviral oncoprotein tax induces processing of NF- $\kappa$ B2/p100 in T cells: Evidence for the involvement of IKK $\alpha$ . *EMBO Journal*, *20*(23), 6805–6815. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6805>
- Xiao, Gutian, Cvijic, M. E., Fong, A., Harhaj, E. W., Uhlik, M. T., Waterfield, M., & Sun, S.-C. (2001). Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF- $\kappa$ B2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKK $\alpha$ . *The EMBO Journal*, *20*(23), 6805–6815. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.23.6805>
- Zhang, Q., Lenardo, M. J., & Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*, *168*(1–2), 37–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>