



TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA A pH6 COMO MARCADOR DE
SENESCENCIA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE VERTEBRADOS**

JOSÉ ANTONIO DE MERA RODRÍGUEZ

**R007 - PROGRAMA DE DOCTORADO EN MODELIZACIÓN Y EXPERIMENTACIÓN EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

Conforme:

Yolanda Gañán Presmanes

Javier de Francisco Morcillo

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y coodirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2023

AGRADECIMIENTOS.

La realización de la presente tesis doctoral me ha permitido indagar mucho más en el mundo de la investigación científica, desde la búsqueda y recopilación de información, realización experimental y el posterior análisis y discusión de los resultados obtenidos. Aunque parezca obvio, el aprendizaje en profundidad y la mejora de habilidades para realizar estos puntos requiere de mucho tiempo y esfuerzo que hay que valorar.

A pesar de ser un tópico, he de agradecer en gran medida al gran apoyo otorgado por Joaquín Rodríguez León, mi tutor de tesis, Javier de Francisco Morcillo, codirector y a mi directora Yolanda Gañán Presmanes. Cada uno ha aportado generosamente su tiempo y sus grandes conocimientos para llevar a cabo este trabajo. Me han ayudado, además, a solventar no solo problemas de la propia investigación, sino aquellos burocráticos que desde casi el primer día no han sido pocos que, por distintos motivos, en varias ocasiones han llevado al límite mantenerme en el programa de doctorado.

Junto a ellos, otros compañeros muy importantes han colaborado en esta tesis aportando su granito de arena (o más de un grano), como Gervasio Martín Partido con su particular manera de analizar los resultados, Guadalupe Álvarez Hernán, mi gran compañera de laboratorio y desayunos durante la mayor parte del tiempo y, por último, a Violeta Calle Guisado que siempre está dispuesta a echar una mano.

Con el tiempo han ido pasando diferentes alumnos por el laboratorio para llevar a cabo sus TFG, TFM o ambos, por lo que no puedo olvidar de mencionar y destacar a Alejandro Arias Montecino aportando su alegría ;) y a Andrea de la Cruz con la que comencé el grado en biología. Además de ellos, ha habido más compañeros en los últimos años con los que he compartido cafés y risas durante el rato que tomábamos para descansar y relatar cómo llevábamos el día o cualquier cosa interesante que había sucedido, como Fran Espinosa, Nuria del Valle o Sergio Villa entre otros.

Finalmente agradecer a mi madre, a mi pareja, a mis hermanos y a los muchos colegas ciclistas que he conocido durante este periodo por darme su apoyo y a la vez permitirme desconectar del laboratorio en los ratos libres.

A todos ellos, muchísimas gracias de corazón.

ÍNDICE.

ÍNDICE.....	7
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN GENERAL.....	21
I.II. CAPÍTULO 1. ESTUDIO DE LA SENESCENCIA CELULAR PROGRAMADA EN EL DESARROLLO DE LA RETINA DE AVES.	23
I.III. CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE LA SENESCENCIA CELULAR PROGRAMADA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DEL EPITELIO OLFATORIO DE MAMÍFEROS.....	24
I.IV. CAPÍTULO 3. HISTOQUÍMICA DE B-GAL-PH6 EN ÁREAS DE DEGENERACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE EXTREMIDADES INFERIORES DE GALLINA.....	25
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	29
1. SENESCENCIA CELULAR: ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	29
2. CARACTERÍSTICAS DE LA SENESCENCIA CELULAR.....	30
2.1. Bloqueo permanente del ciclo celular.....	30
2.2. Alteraciones morfológicas y bioquímicas.....	30
2.3. Núcleo senescente.....	31
2.4. Metabolismo alterado.....	32
3. ETAPAS Y TIPOS DE SENESCENCIA.....	34
4. FENOTIPO DE SECRECIÓN ASOCIADO A SENESCENCIA: SASP.....	35
4.1. SASP a corto plazo (senescencia aguda).....	36
4.2. SASP a largo plazo (senescencia crónica).....	37
5. PRINCIPALES ESTÍMULOS INDUCTORES DE SENESCENCIA CELULAR.....	39
6. PRINCIPALES VÍAS INTRACELULARES ACTIVADAS EN LA SENESCENCIA CELULAR.....	41
6.1. Mecanismo de actuación de las vías intracelulares.....	42
7. REVERSIÓN DEL ESTADO SENESCENTE.....	45
8. ENVEJECIMIENTO.....	45
9. RELACIÓN ENTRE SENESCENCIA Y APOPTOSIS.....	47
10. SENESCENCIA, APOPTOSIS Y DESARROLLO EMBRIONARIO.....	48
11. ACTIVIDAD B-GAL-PH6 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	52
OBJETIVOS GENERALES.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
1. MODELOS ANIMALES.....	61
1.1 Especímenes de gallina.....	61
1.2 Especímenes de ratón.....	62
2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL.....	62
2.1 Obtención de embriones de aves.....	62
2.2 Fijación de tejidos con PFA de embriones de aves.....	62
2.3 Fijación y obtención de tejidos de ratón.....	63
3. CONGELACIÓN.....	63
4. REALIZACIÓN DE CRIOSECCIONES.....	63
5. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD B-GALACTOSIDASA.....	65
5.1. Detección de β -gal-pH6 en secciones histológicas.....	65
5.2. Detección de la actividad β -galactosidasa en extremidades inferiores enteras.....	65
6. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	66
6.1 Inmunofluorescencia simple.....	66
6.2 Inmunohistoquímica fluorescente doble.....	67
6.3 Inmunohistoquímica revelada con DAB.....	67
7. HISTOQUÍMICA CON DOLICHOS BIFLORUS AGGLUTININ (DBA).....	70
8. TINCIÓN ROJO NEUTRO.....	71
9. HISTOQUÍMICA DE TUNEL.....	71
10. SECCIONES DE RESINA.....	72
11. APLICACIÓN DE MOLÉCULAS MEDIANTE MICROESFERAS DURANTE EL DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES.....	72

12	ADQUISICIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES.	74
CAPÍTULO 1. SISTEMA VISUAL DE VERTEBRADOS.		77
I.	INTRODUCCIÓN.	77
1.	ANATOMÍA.	77
2.	RETINA EN VERTEBRADOS.	79
2.1	Estructura de la retina.	79
3.	DESARROLLO DEL SISTEMA VISUAL.	82
3.1	Retinogénesis.	85
1.	LA RETINA COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR ONTOGENÉTICA Y LA SENESCENCIA CELULAR.	87
II.	OBJETIVOS CAPÍTULO 1.	93
III.	RESULTADOS CAPÍTULO 1.	97
1.	RETINA NO ESTRATIFICADA.	97
2.	RETINA ESTRATIFICADA.	99
IV.	FIGURAS CAPÍTULO 1.	103
V.	DISCUSIÓN CAPÍTULO 1.	125
1.	ACTIVIDAD B-GAL-PH6 Y CÉLULAS EN APOPTÓTICAS.	125
2.	ACTIVIDAD B-GAL-PH6 EN LA CNB.	126
3.	ACTIVIDAD B-GAL-PH6 EN LA RETINA ESTRATIFICADA.	127
4.	ACTIVIDAD B-GAL-PH6 EN EL EPITELIO PIGMENTARIO.	127
VI.	CONCLUSIONES CAPÍTULO 1.	131
CAPÍTULO 2. SISTEMA OLFATORIO DE VERTEBRADOS.		135
I.	INTRODUCCIÓN.	135
1.	SISTEMA OLFATORIO.	135
2.	ESTRUCTURA DEL EPITELIO OLFATORIO (EO).	137
2.1.	Células neuronales sensitivas (CNS).	138
2.2.	Células de soporte (CS).	139
2.3	Células de envoltura olfatorias.	139
2.4	Células basales.	139
2.5	Glándulas de Bowman.	140
3.	DESARROLLO EMBRIONARIO DEL SISTEMA OLFATORIO.	142
3.1	Epitelio olfatorio durante el desarrollo embrionario.	143
4.	NEUROGÉNESIS POSTNATAL.	145
5.	SENESCENCIA EN EL EPITELIO OLFATORIO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.	148
II.	OBJETIVOS CAPÍTULO 2.	151
III.	RESULTADOS CAPÍTULO 2.	155
1.	HISTOQUÍMICA DE B-GAL-PH6 EN EL DESARROLLO POSNATAL DEL EPITELIO OLFATORIO DE RATÓN.	155
IV.	FIGURAS CAPÍTULO 2.	159
V.	DISCUSIÓN CAPÍTULO 2.	171
VI.	CONCLUSIONES CAPÍTULO 2.	175
CAPÍTULO 3. EXTREMIDAD DE VERTEBRADOS.		179
I.	INTRODUCCIÓN.	179
1.	EXTREMIDADES DE VERTEBRADOS.	179
2.	DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES.	180
2.1	Etapas del desarrollo de la extremidad e influencia de la AER.	180
2.2	Actividad apoptótica durante el desarrollo de las extremidades.	182
2.3	Senescencia durante el desarrollo de la extremidad.	183

II.	OBJETIVOS CAPÍTULO 3.	189
III.	RESULTADOS CAPÍTULO 3.	193
1.	HISTOQUÍMICA DE B-GAL-PH6 EN ÁREAS DE DEGENERACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE EXTREMIDADES INFERIORES DE POLLO.	193
2.	SECCIONES HISTOLÓGICAS DE EXTREMIDADES INFERIORES DE POLLO EN DESARROLLO.	194
3.	SOBREEXPRESIÓN E INHIBICIÓN DE MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS DURANTE EL DESARROLLO DEL AUTOPODIO.	196
IV.	FIGURAS CAPÍTULO 3.	199
V.	DISCUSIÓN CAPÍTULO 3.	213
1.	ACTIVIDAD B-GAL-PH6 EN LA EXTREMIDAD INFERIOR.	213
2.	MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS DE LAS ÁREAS SENESCENTES EN EL DESARROLLO DE LA EXTREMIDAD INFERIOR DE POLLO.	216
VI.	CONCLUSIONES CAPÍTULO 3.	221
	DISCUSIÓN GENERAL.	225
1.	EFICACIA DE LA TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE LA B-GAL-PH6 PARA IDENTIFICAR SENESCENCIA EN EL TEJIDO NERVIOSO.	225
2.	ACTIVIDAD B-GAL-PH6 EN TEJIDOS APOPTÓTICOS Y NO APOPTÓTICOS.	227
	FIGURAS DISCUSIÓN.	229
	CONCLUSIONES GENERALES.	237
	PARTE DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL HAN DADO LUGAR A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:	239
	ANEXOS.	241
	ANEXO 1.	243
	ANEXO 2.	244
	ANEXO 3.	245
	ANEXO 4.	248
	ANEXO 5.	249
	ANEXO 6.	250
	ANEXO 7.	251
	ANEXO 8.	252
	ANEXO 9.	253
	BIBLIOGRAFÍA.	257

ABREVIATURAS.

ABREVIATURAS.

A-P: anterior-posterior.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AER: *apical ectodermal ridge* (cresta ectodérmica apical).

ANZ: *anterior necrotic zone* (zona necrótica anterior).

B: bastón.

β-gal-pH6: β-galactosidasa asociada a senescencia a pH6.

BMP: *bone morphogenetic proteins* (proteínas morfogenéticas del hueso).

BO: bulbo olfatorio.

C: conos.

CA: células amacrinadas.

CatD: catepsina D.

CB: células bipolares.

CBG: células basales globosas.

CBH: células basales horizontales.

CCG: capa de células ganglionares.

CDK: *cyclin-dependent kinase* (cinasa dependiente de ciclina).

CDKI: *cyclin-dependent kinase inhibitors* (inhibidor de cinasa dependiente de ciclina).

CG: células ganglionares.

CH: células horizontales.

CM: células de Müller.

CN: cavidad nasal.

CNb: capa neuroblástica.

CNE: capa nuclear externa.

CNI: capa nuclear interna.

CNS: células neuronales sensitivas.

CO: copa óptica.

CPE: capa plexiforme externa.

CPI: capa plexiforme interna.

CPR: célula progenitora retinal.

CR: calretinina.

Cr: cristalino.

CS: células de soporte.

D-V: dorso-ventral.

DAB: 3,3'-diaminobenzidina.

DAPI: 4', 6'-diamidino-2-fenilindol.

DBA: *Dolichos Biflorus Agglutinin*.

DDR: *DNA-damage response* (respuesta al daño en el ADN).

DNA-SCARS: DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence
(Segmentos de ADN con alteraciones en la cromatina que refuerzan la senescencia).

DSB: double strand breaks.

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético.

EEO: espesor del epitelio olfatorio.

EFO: estrato de fibras ópticas.

EO: epitelio olfatorio.

EP: epitelio pigmentario.

EPp: epitelio pigmentario presuntivo.

Est: estadio.

FGF: *fibroblast growth factors* (factor de crecimiento fibroblástico).

Fig.: figura.

FO: fisura óptica.

Grem1: gremlin 1.

H: húmero.

HA: haces de axones.

HH: Hamburger y Hamilton (estadio de desarrollo de gallina).

ICr: invaginación cristalino.

LB: lámina basal.

LC: lámina cribosa.

LP: lámina propia.

MDM2: murine double minute 2.

MLE: membrana limitante externa.

MLI: membrana limitante interna.

NF-kB: factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas.

NGF: factor de crecimiento nervioso.

NO: nervio olfatorio.

NOS: neuronas olfatorias sensitivas.

OIS: *oncogene-induced senescence* (senescencia inducida por oncogenes).

OMP: *olfactory marker protein* (proteína marcadora olfativa).

OVN: órgano vomeronasal.

P-D: proximal-distal.

PBS: *phosphate buffered saline* (tampón fosfato salino).

PBS-G-S: PBS-gelatina-sacarosa.

PBS-G-T: PBS-gelatina-tritón.

PBS-T: PBS-tritón.

PBS-G-T-Lis: PBS-gelatina-tritón-lisina.

PC: placoda del cristalino.

PFA: paraformaldehído.

pHisH3: fosfohistona H3.

PML: *promyelocytic leukemia*.

PNZ: *posterior necrotic zone* (zona necrótica posterior).

pRB: retinoblastoma.

R: radio.

R.N.: rojo neutro.

RN: retina neural.

RO: receptor de olores.

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno).

SA- β -gal: *senescence-associated β -galactosidase* (β -galactosidasa asociada a senescencia).

SAHF: *senescence associated heterochromatin foci* (focos de heterocromatina asociados a la senescencia).

SASP: *senescence-associated secretory phenotype* (fenotipo secretor asociado a senescencia).

SHH: *sonic hedgehog*.

SNC: sistema nervioso central.

T: telencéfalo.

TA: temperatura ambiente.

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal.

TGF- β : *transforming growth factor β* (factores de crecimiento transformantes β).

TO: tallo óptico.

TUNEL: *TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*.

V: ventrículos.

VCr: vesícula del cristalino.

VO: vesícula óptica.

X-gal: sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido.

ZP: zona de progreso.

RESUMEN GENERAL.

RESUMEN GENERAL.

La senescencia celular es un estado inducido normalmente por envejecimiento o estrés y mediante el cual la célula se adentra en un estado de bloqueo del ciclo celular. Las células que se adentran en senescencia en muchas ocasiones pueden adquirir un fenotipo secretor asociado a senescencia (*Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP*), expulsando al medio externo exosomas, quimioquinas, citoquinas, proteínas específicas de la matriz extracelular o proteínas que remodelan dicha matriz. Estas moléculas secretadas tienen también diferentes funciones, entre las que podemos destacar el reclutamiento de células del sistema inmune para eliminar estas células disfuncionales. Por otra parte, este fenotipo SASP puede provocar que las células vecinas se adquieran el mismo fenotipo y se adentren en senescencia, lo que puede provocar una mala funcionalidad del tejido y, por tanto, una patología. Sin embargo, algunos autores han comprobado que la adquisición de este fenotipo puede ser beneficioso en el caso de las células cancerígenas para evitar su propagación.

En los últimos años se ha demostrado que no solamente se encuentran células senescentes en tejidos patológicos y de edad avanzada. Se ha comprobado que existen células senescentes en embriones de vertebrados de diferentes especies, contribuyendo a la correcta formación del tejido y órgano en el que se encuentran. Normalmente estas células senescentes co-localizan con células apoptóticas, por lo que su presencia suele estar vinculada a degeneración. Así, se ha comprobado la presencia de estas células en la cresta ectodérmica apical y en las regiones interdigitales de la extremidad, en la placa del techo del encéfalo, en el mesonefros y en el saco endolinfático del oído, es decir, estructuras que van a ser afectadas por un proceso degenerativo severo. Estos focos de células senescentes y apoptóticas atraen a células fagocíticas para eliminar estos tejidos degenerativos.

Las células senescentes, tanto en tejidos adultos como embrionarios, exhiben una serie de características fenotípicas que las distinguen, como un tamaño atípicamente grande, la presencia de fragmentos de cromatina en el citoplasma, dominios específicos de heterocromatina y lisosomas hipertrofiados y disfuncionales. Esta última característica ayuda a la identificación de las células senescentes ya que la actividad lisosomal β -galactosidasa ácida se ve fuertemente incrementada, pudiéndose detectar su

funcionalidad incluso a pH 6.0, por lo que se le conoce como actividad β -galactosidasa vinculada a senescencia (*Senescence-Associated β -Galactosidase, SA- β -gal*). En el presente estudio la denominaremos β -gal-pH6. Además, también aparecen activados otros factores inhibidores del ciclo celular provocando su parada en el ciclo, como son p53, p21, p16^{Ink4a} o p19^{Arf}.

El sistema nervioso de vertebrados también se ve sometido a diferentes oleadas de muerte celular que eliminan células indiferenciadas o poblaciones neuronales que no son funcionales. Estas oleadas afectan también a las neuronas que se encuentran en órganos de los sentidos y transcurren en periodos bien determinados del desarrollo embrionario. Por otra parte, la zona interdigital es un modelo experimental recurrente para el estudio del proceso apoptótico y las moléculas señalizadoras que controlan el mismo.

Este era el marco contextual del que partíamos para la realización del proyecto en el que se ha visto desarrollado esta tesis doctoral. Este hecho hizo poner como objetivo principal de la tesis el analizar la implicación del proceso de senescencia celular programada en tres modelos embrionarios en los que el proceso degenerativo está muy presente durante la diferenciación tisular: la retina, el epitelio olfatorio y el tejido interdigital, mostrando en este último su modulación mediante el uso de factores de secreción e inhibición. Esto ha generado una serie de resultados estructurados en tres capítulos que pasamos a resumir a continuación.

I.II. CAPÍTULO 1. Estudio de la senescencia celular programada en el desarrollo de la retina de aves.

La retina es un modelo de estudio recurrente para el estudio del desarrollo del sistema nervioso central. Durante el proceso de retinogénesis se han descrito oleadas de muerte que vienen acompañadas por sucesivas invasiones de células fagocíticas que eliminan los restos celulares originados, por lo que constituye un excelente modelo para establecer un paralelismo entre la muerte celular programada y la senescencia. Para ello, en el primer capítulo de esta tesis se ha llevado a cabo un estudio embrionario en la retina de dos especies de aves: la gallina (*Gallus gallus*) y el pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*). El patrón de muerte celular en la retina de ambas especies ha sido estudiado por nuestro grupo de investigación de manera recurrente. Sobre ellas se ha comparado el patrón de localización de la tinción β -gal-pH6 y de otros marcadores típicos de senescencia como p21. Los resultados obtenidos arrojan resultados similares en ambas especies modelo. Indican que, en la retina indiferenciada, la actividad β -gal-pH6 se localiza en regiones en las que se aprecia una elevada carga lisosomal. Una vez que comienza el proceso de retinogénesis, la actividad β -gal-pH6 aparece en diferentes tipos de neuronas postmitóticas, incluso en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Además, estas subpoblaciones de neuronas en proceso de diferenciación que son positivas para esta técnica histoquímica también expresan otros marcadores vinculados a la senescencia celular como es el caso del factor p21. Por otra parte, también comprobamos que existe una elevada actividad β -gal-pH6 en el epitelio pigmentario durante el desarrollo.

Estos resultados parecen indicar que la actividad β -gal-pH6 está fuertemente vinculada a la actividad β -galactosidasa ácida que se encuentra localizada en los lisosomas. La presencia de β -gal-pH6 en neuronas en proceso de diferenciación podría sugerir que esta actividad enzimática está vinculada al proceso de diferenciación neuronal. Además, la presencia de otros marcadores de senescencia en estas neuronas β -gal-pH6-positivas apunta a posibles mecanismos moleculares compartidos entre los procesos de diferenciación y de senescencia, ya que ambos comparten, en este tipo celular una característica común: la adquisición de un estado de no proliferación mantenida o de diferenciación terminal. Por lo tanto, se hace necesario tomar con cautela resultados

que utilicen estos marcadores de senescencia en procesos de envejecimiento del sistema nervioso y que describen una mayor senescencia en neuronas de animales seniles. Sería conveniente en estos estudios que abordan diferentes aspectos fisiológicos y patológicos en los que puede estar involucrada la senescencia neuronal utilizar el mayor número de marcadores de senescencia ya descritos e incluso intentar obtener nuevos marcadores específicos de este proceso en este tejido.

I.III. CAPÍTULO 2. Estudio de la senescencia celular programada durante la diferenciación del epitelio olfatorio de mamíferos.

Tras los resultados obtenidos en el capítulo 1, nos planteamos realizar un estudio similar en otro epitelio sensitivo que también esté afectado por procesos de degeneración neuronal durante su histogénesis. Para ello, elegimos el epitelio olfatorio de ratón como modelo y comprobar, así, si la actividad β -gal-pH6 también se encuentra aumentada en neuronas olfatorias, tanto durante el proceso de diferenciación como en tejido diferenciado, y si puede estar esta actividad típica de células senescentes vinculada al proceso de degeneración que ocurre en este tejido. Los resultados obtenidos muestran la presencia de una banda de marcaje de la actividad β -gal-pH6 en la región intermedia del epitelio olfatorio desde estadios iniciales de diferenciación en individuos recién nacidos, que con el avance del proceso de diferenciación aumenta de grosor. Esta banda de marcaje coincide plenamente con el patrón de expresión de la proteína marcadora de neuronas olfatorias diferenciadas (*olfactory marker protein*, OMP). Dentro de esta banda de marcaje de la actividad β -gal-pH6 también se localizan otros marcadores de neuronas olfatorias diferenciadas como la lectina DBA (*dolichos biflorus agglutinin*). Sin embargo, neuronas inmaduras GAP43-positivas localizan su soma fuera de la banda de marcaje histoquímico, lo que indica que estas neuronas jóvenes todavía no presentan elevada esta actividad enzimática. En ningún caso, la señal histoquímica de la β -gal-pH6 nunca se detecta en la región apical del epitelio donde se sitúan las células de soporte identificadas con la citoqueratina 8 ni en la región basal del mismo donde se sitúan los precursores proliferativos o las células horizontales basales identificadas con la citoqueratina 5. Por otro lado, las células apoptóticas no suelen tener un patrón de distribución similar al de las células β -gal-pH6-positivas, si bien el proceso degenerativo siempre afecta a neuronas diferenciadas. De esta forma, al igual que en la retina, el

incremento de la actividad β -gal-pH6 se detecta en poblaciones de neuronas maduras y totalmente sanas. Por el contrario, su actividad no es detectada en neuronas en proceso de diferenciación y no se detecta en subpoblaciones neuronales, sino que parece expresarse en la totalidad de las neuronas olfatorias diferenciadas.

Este segundo capítulo refuerza las conclusiones obtenidas en la retina en desarrollo de aves, comprobándose que esta actividad enzimática no está siempre vinculada a procesos de senescencia.

I.IV. CAPÍTULO 3. Histoquímica de β -gal-pH6 en áreas de degeneración durante el desarrollo de extremidades inferiores de gallina.

La formación de las extremidades en aves se ha utilizado como modelo embriológico desde los inicios de la biología del desarrollo. Las extremidades, aunque complejas, presentan un patrón esquelético fácil de observar. Durante su desarrollo aparece un centro regulador transitorio denominado cresta ectodérmica apical que controla la formación de la extremidad mediante la secreción de moléculas. Esta cresta va a controlar la formación de los dedos y proporciona un modelo muy útil para detectar la muerte celular programada implicada en la morfogénesis de la extremidad. Debido a esto, en los últimos años se ha estudiado la presencia de senescencia durante el desarrollo embrionario de la extremidad por medio de la detección de la actividad β -gal-pH6 y otros marcadores que la identifican, ya que se localiza en tejidos adultos en degeneración. Esto ha permitido observar la correlación en la localización de los procesos de muerte celular programada y de senescencia en el tejido interdigital y de esta manera esculpir la extremidad, además, la ausencia de senescencia implica problemas en el correcto desarrollo de la extremidad.

En este estudio se ha observado la coincidencia de la presencia de senescencia y apoptosis en regiones de la extremidad durante el desarrollo. Junto a eso, se ha descrito el progreso de la senescencia en diferentes estadios del desarrollo de la extremidad y por último se ha realizado una experimentación donde se pone de manifiesto como determinados factores implicados en el desarrollo de la extremidad, afectan a la presencia y distribución de la senescencia en el tercer espacio del tejido interdigital de la extremidad.

INTRODUCCIÓN GENERAL.

INTRODUCCIÓN GENERAL.

1. Senescencia celular: antecedentes históricos.

La senescencia celular es un importante evento identificado en las células al final de su vida útil replicativa consistente en la detención mantenida del ciclo celular (Hayflick, 1965). En las últimas décadas se ha comprobado que la senescencia celular guarda relación directa con el envejecimiento tisular. La senescencia puede ser inducida por diferentes estímulos que comparten vías moleculares similares, aunque hay diferencias sustanciales a niveles de expresión proteica (Dierick et al., 2002).

En un principio, la senescencia celular se definió por los autores (Hayflick and Moorhead, 1961) como un proceso por el que las células humanas cultivadas *in vitro* perdían la capacidad de replicación después de un número limitado de divisiones. Este número finito de replications fue denominado límite de Hayflick y es independiente de las condiciones de cultivo (Petersen and Niklason, 2007; Ghosh and Capell, 2016). La pérdida de capacidad replicativa, por tanto, ha de ser algo intrínseco a la célula. Se demostró que esto es debido principalmente al acortamiento progresivo de los telómeros de los cromosomas, secuencias formadas por repeticiones en tándem que se localizan en los extremos de los cromosomas. Estos extremos no se replican completamente por la ADN polimerasa, lo que provoca la exposición de regiones de ADN monocatenario que son eliminadas por actividades exonucleasas de la célula, provocando un acortamiento progresivo de dichos telómeros tras cada ciclo replicativo (Hayflick, 1965; Bernadotte et al., 2016). Estudios posteriores *in vivo* han demostrado este tipo de acortamiento de los telómeros causado por la senescencia replicativa en el hígado. Las células de estos estudios se mantuvieron vivas y metabólicamente activas, aunque detuvieron su replicación irreversiblemente, a pesar de que el medio donde crecían era rico en nutrientes y factores de crecimiento (Wiemann et al., 2002; Jpma and Greider, 2003).

Distintos estudios también han demostrado que células senescentes *in vivo* no muestran diferencias significativas en la longitud de los telómeros, pero sí advierten de la elevada presencia de proteínas reguladoras distintivas de senescencia (Melk et al., 2003; Wang et al., 2009; Bhat et al., 2012). Su principal diferencia con el estado quiescente es que

no existe una señal fisiológica natural conocida que haga retornar a la célula al ciclo celular (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007a).

2. Características de la senescencia celular.

2.1. Bloqueo permanente del ciclo celular.

Las células que entran en senescencia replicativa bloquean su mecanismo de replicación deteniendo su ciclo celular irreversiblemente en la fase G1 o fase S temprana, aunque se han observado en fase G2 (Mao et al., 2012). La replicación no prospera en las células senescentes debido a la expresión de proteínas reguladoras distintivas (Dimri et al., 1995; Kuilman et al., 2010; Matjusaitis et al., 2016). Al producirse la parada del crecimiento, la senescencia limita la replicación de células viejas o dañadas (Herranz and Gil, 2018), con lo que se evita la propagación del daño en el material genético a la siguiente generación celular, impidiendo posibles transformaciones dañinas en el ADN. Dicho proceso se ha observado en células tisulares mostrando así un rol esencial en la homeostasis de tejidos, apareciendo este daño en el ADN relacionado con patologías (Campisi, 2005; Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007a).

2.2. Alteraciones morfológicas y bioquímicas.

En un cultivo, las células senescentes suelen presentar cambios morfológicos celulares significativos: aumentan de tamaño, se aplanan, exhiben redes mitocondriales y lisosómicas y además sufren un reordenamiento cromosómico (Hayflick, 1965; Herranz and Gil, 2018). Las células senescentes también forman puentes citoplasmáticos que permiten enviar señales a las células vecinas por transferencia directa de proteínas intercelulares (Fig.1). Adicionalmente, presentan la membrana plasmática alterada (Hernández-Segura et al., 2018a). También se ha descrito que las células senescentes en tejidos de ratones adultos presentan un tamaño mayor a las no senescentes (Biran et al., 2017). Sin embargo, el significado funcional de los cambios morfológicos asociados con la senescencia no está claro. *In vivo*, las células senescentes parecen preservar la morfología dictada por la arquitectura tisular (Herranz and Gil, 2018). Por lo general, muestran focos de reordenamiento espacial heterocromático y acumulación de gránulos de lipofuscina (Funayama et al., 2006; Jeyapalan et al., 2007b; Vicencio et al., 2008). Destaca la exhibición de la elevada actividad enzimática beta-galactosidasa

asociada a senescencia (*senescence-associated beta-galactosidase*, SA-β-gal), reflejando, en parte, el aumento del número de lisosomas, con posibilidad de detectarse en células o tejidos someramente fijados (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006; Kuilman et al., 2010).

2.3. Núcleo senescente.

En el núcleo de una célula en senescencia aparecen complejos cambios tridimensionales y epigenéticos en la cromatina a gran escala (Adams, 2007). También ocurre la llamada respuesta a daño en el ADN (*DNA-damage response*, DDR) (D'Adda Di Fagagna, 2008) y la formación de cuerpos nucleares organizados por la proteínas PML (*Promyelocytic leukemia*) (Ferbeyre et al., 2000). El cambio en la cromatina más llamativo es la formación de complejos conocidos como focos de heterocromatina asociados a la senescencia (*senescence associated heterochromatin foci*, SAHF) (Freund et al., 2012; Parry and Narita, 2016). Su formación está orquestada por el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p16 (Ohtani et al., 2004). Los SAHF reflejan la remodelación de la cromatina que facilita la expresión de genes asociados a senescencia. Así, por un lado, se permite el acceso y unión de factores de transcripción a zonas del ADN que en condiciones normales no estarían accesibles. Por otro lado, se producen cambios en su metilación, sintetizando distintas proteínas características de este estado (Rose et al., 2012; Cruickshanks et al., 2013; Dominick and Krizhanovsky, 2014). Esto sugiere que genes que se expresen normalmente dejen de hacerlo y viceversa, provocando la represión de la proliferación transcripcional. Los SAHF son más prominentes en células humanas senescentes inducidas por oncogenes (Narita et al., 2003), silenciándose la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Campisi, 2011).

Algunas de las células senescentes contienen focos nucleares persistentes. Son los denominados segmentos de ADN con alteraciones en la cromatina que refuerzan la senescencia, DNA-SCARS (*DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence*), los cuales secretan una amplia gama de factores con actividades autocrinas y paracrinas (Young et al., 2009).

La morfología del núcleo senescente también sufre cambios. Están asociados a la pérdida de la señal de una de las láminas localizadas en la envoltura nuclear: la lámina B1 (Freund et al., 2012). La degradación mediada por la autofagia de la lámina B1

observada durante la senescencia puede comprometer la envoltura nuclear (Dou et al., 2015). La pérdida de integridad de la envoltura nuclear conduce a la aparición de fragmentos de cromatina citoplasmática. Esto se asocia con la formación de esferas densas de cromatina nuclear citoplasmáticas cruciales para iniciar una respuesta proinflamatoria en la senescencia y en el cáncer (Ivanov et al., 2013).

2.4. Metabolismo alterado.

El metabolismo de las células senescentes aparece alterado debido al aumento de la actividad enzimática a través de la vía glucolítica mitocondrial y del proceso autofágico (Dörr et al., 2013). Estas células presentan mayor número de mitocondrias, pero su potencial de membrana se ve alterado, lo que conlleva la liberación de enzimas mitocondriales y la intensificación en la producción de ROS (*reactive oxygen species*) (Passos et al., 2007; Studencka and Schaber, 2017). Se produce entonces una acumulación de mitocondrias antiguas y de funcionalidad defectuosa debido a la reducción de la mitofagia (Korolchuk et al., 2017). Esto se debe, en parte, a la disminución de la fisión mitocondrial y un aumento de la fusión como posible mecanismo para proteger a las mitocondrias de la mitofagia y, por tanto, a la propia célula del proceso apoptótico (Correia-Melo and Passos, 2015).

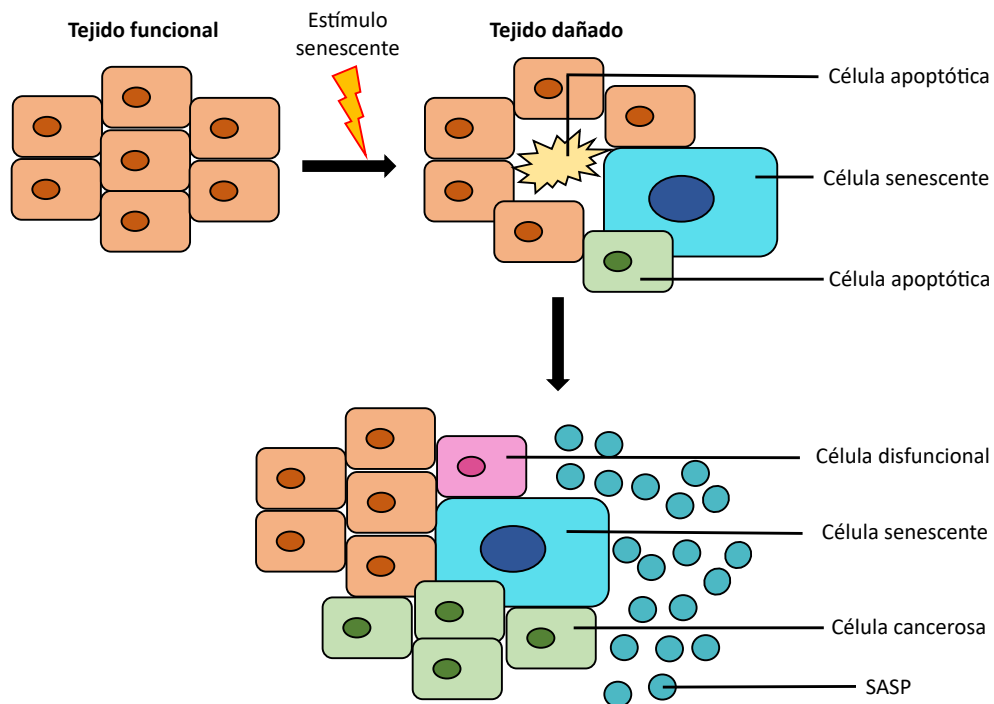


Figura 1. Esquema de los posibles efectos nocivos de las células senescentes. El daño celular en un tejido puede causar varios efectos, los cuales pueden ser completamente reparados devolviendo a la célula y al tejido a su estado anterior. Sin embargo, el daño excesivo o irreparable puede provocar apoptosis celular, senescencia o mutación oncogénica. La división de una célula vecina o de una progenitora suele reemplazar a la célula apoptótica. Por otro lado, la división celular aumenta el riesgo de provocar una mutación oncogénica, produciendo células potencialmente malignas. Sin embargo, las células senescentes pueden no ser reemplazadas y su número aumenta con la edad. Las células senescentes secretan factores SASP al medio extracelular que pueden alterar el funcionamiento de las células vecinas, dando lugar a células disfuncionales. A su vez, pueden provocar la proliferación de células malignas cercanas. Por lo tanto, una acumulación de células senescentes puede comprometer la función correcta del tejido y facilitar la progresión de tumores. Esquema adaptado de (Campisi y D’Adda Di Fagagna, 2007b).

3. Etapas y tipos de senescencia.

El estado senescente es un proceso dinámico en el que se pueden establecer diferentes etapas (Van Deursen, 2014). Como se ha comentado con anterioridad, las células que entran en senescencia comienzan a remodelar de forma progresiva su cromatina y simultáneamente activan otras moléculas que les conducen a un segundo paso de “senescencia completa”. Si las células senescentes persisten durante periodos prolongados y siguen evolucionando, entrarían en un tercer paso denominado “senescencia tardía”, lo que puede implicar la adaptación y diversificación del fenotipo senescente (Herranz and Gil, 2018).

Atendiendo a las moléculas que se activan durante el proceso de senescencia, podemos distinguir entre senescencia aguda y crónica. La **senescencia aguda** es un proceso programado que ocurre en respuesta a factores estresantes, con una cinética rápida que favorece la homeostasis y está estrechamente relacionada con SASP. Por otro lado, existe la **senescencia crónica** que puede ser el resultado de un daño a largo plazo en donde aparecen células en un estado de senescencia tardía y profunda. Se la relaciona con procesos como el envejecimiento. La senescencia crónica se asocia a un conjunto de proteínas reguladoras claves en las redes supresoras de tumores como son la p53/p21 y p16/RB que contribuyen a la irreversibilidad del estado senescente (Serrano et al., 1997; Narita et al., 2003). Aun así, no se han encontrado suficientes pruebas que relacionen irrefutablemente las distintas etapas de la senescencia en cultivo celular y las funciones fisiopatológicas del estado senescente, aunque se observa que la senescencia es una respuesta al estrés celular (Herranz and Gil, 2018). Hasta ahora se sugiere que *in vivo* las células senescentes son altamente dependientes del fenotipo SASP de su entorno, junto a las respuestas inmunes asociadas. No obstante, sus efectos son complicados de predecir, ya que la composición de moléculas secretadas es altamente variable y puede tener efectos pleiotrópicos (Fig.2).

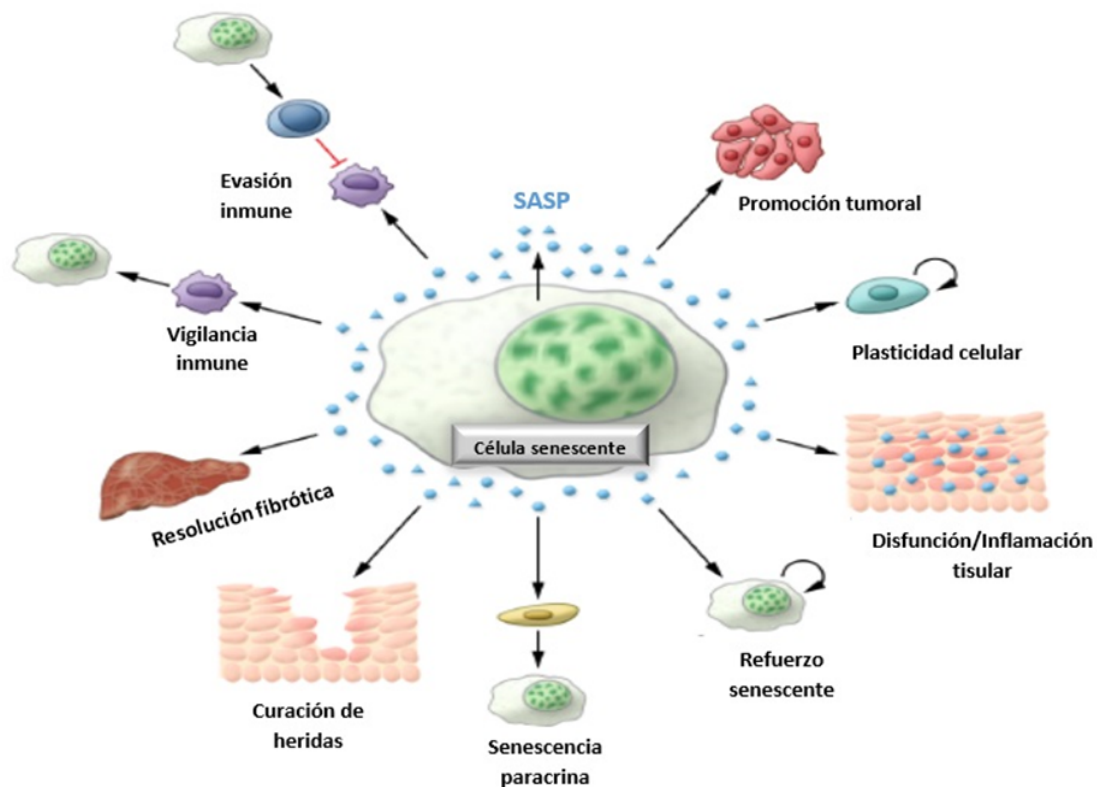


Figura 2. Esquema resumen de algunas de las funciones asociadas al SASP. Esquema adaptado de Herranz y Gil (2018).

4. Fenotipo de secreción asociado a senescencia: SASP.

Una célula senescente que ha detenido su proliferación tiene capacidad para mantenerse viva, presenta un metabolismo activo y experimenta cambios generalizados en la expresión y secreción de proteínas dando lugar al SASP, que es una de las principales características del estado senescente (Coppé et al., 2010).

Inicialmente la senescencia fue considerada un proceso celular intrínseco (Herranz and Gil, 2018). Sin embargo, este estado no afecta únicamente a la célula senescente, sino que, esta influye en las células de su entorno próximo pudiendo crear gradientes que promueven la migración y la invasión celular (Fig.1) (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008, 2010; Coppé et al., 2010; Campisi et al., 2011). Esto es debido a un secretoma adquirido muy heterogéneo formado por una complicada red de señalización celular que incluye varias familias de factores solubles e insolubles o no proteicos con efectos autocrinos, yuxtacrinos y paracrinos, incluyendo en algunos casos la estimulación del sistema inmune (Acosta et al., 2008, 2013; Coppé et al., 2010; Kuilman et al., 2010; Chien

et al., 2011; Nelson et al., 2012; Matjusaitis et al., 2016). Los efectos del SASP pueden ser difíciles de predecir, ya que su composición es dinámica y varía dependiendo del tipo celular, del agente inductor de la senescencia y de la etapa senescente en la que se encuentre la célula (Acosta et al., 2013; Hernández-Segura et al., 2017).

La regulación del SASP está controlada por diversos factores transcripcionales a múltiples niveles, incluida una importante regulación epigenética, aunque no se conoce cómo su coordinación difiere ante distintos estímulos (Coppé et al., 2008; Hernández-Segura et al., 2018a; Herranz and Gil, 2018). Se considera que el factor de transcripción NF- κ B en estado fosforilado (factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas) es el regulador principal del SASP (Chien et al., 2011; Freund et al., 2011), aunque hay otros factores de transcripción que también pueden estar implicados en la activación de este fenotipo como GATA4 y C/EBP β (CCAAT/ Enhancer-binding protein β) (Kuilman et al., 2008; Kang et al., 2015; Ghosh and Capell, 2016).

Por otra parte, el SASP participa en diferentes procesos biológicos como la curación de heridas y patológicos como la progresión del cáncer (Coppé et al., 2008, 2010; Demaria et al., 2014; Baker et al., 2016). En algunos casos regulan positivamente estos procesos mientras que en otras ocasiones lo hacen de forma negativa. El SASP se puede considerar como la respuesta general al daño asociada a senescencia, pero no necesariamente actúa de forma dirigida sobre un daño específico (Kuilman and Peeper, 2009; Campisi et al., 2011). A su vez, otra característica de la senescencia es que puede mantenerse más allá en el tiempo que el propio estado de detención del crecimiento (Coppé et al., 2010; Lecot et al., 2016), ya que la detención del ciclo celular asociada a la senescencia y el SASP pueden desacoplarse (Coppé et al., 2008).

Finalmente, podemos encontrar dos tipos de senescencia dependiendo del retardo en la adquisición del SASP:

4.1. SASP a corto plazo (senescencia aguda).

A corto plazo se ha demostrado que la senescencia actúa en diferentes tejidos como un mecanismo limitador del daño, iniciando la reparación tisular y devolviéndolos a su estado previo. El SASP aparece normalmente como una respuesta al daño al ADN (Ghosh and Capell, 2016), al mantenimiento de la detención del ciclo celular (Acosta et al., 2008;

Kuilman et al., 2008), a la eliminación de células senescentes por fagocitosis, a la activación de proteasas matriciales, a la alteración de la función de las células madre, a la liberación de moléculas oxidantes (Krizhanovsky et al., 2008; Freund et al., 2010; Hoenicke and Zender, 2012) o al reclutamiento de células inmunitarias (Xue et al., 2007). Por el contrario, la prematura o la no eliminación de estas células provoca el acúmulo de senescencia y fibrosis tisular, evitando la correcta cicatrización (Demaria et al., 2014). Por último, la senescencia es considerada principalmente como un importante mecanismo de prevención tumoral al limitar el riesgo de transformación neoplásica, además de contribuir a la reparación/remodelación de tejidos o la curación de heridas (Iannello et al., 2013). Permite, además, reforzar la parada del ciclo en células normales para evitar así su posible proliferación descontrolada (Acosta et al., 2008; Lujambio et al., 2013).

4.2. SASP a largo plazo (senescencia crónica).

El mantenimiento prolongado del SASP en las células senescentes puede tener efectos perjudiciales en la fisiología de los tejidos (Kang et al., 2011). Como ya se ha comentado, los factores que componen el SASP pueden provocar la entrada en senescencia de las células vecinas, pero también facilitar la dediferenciación y proliferación celular, promover la formación y progresión de tumores, aumentar la capacidad invasiva metastásica (Bavik et al., 2006; Coppé et al., 2010; Rodier and Campisi, 2011; Laberge et al., 2012; Storer and Keyes, 2014) o la aparición de otras enfermedades dependientes de la edad como la aterosclerosis o la neurodegeneración (Golde and Miller, 2009; Irvine et al., 2014; Leikam et al., 2015). A largo plazo, contribuye al envejecimiento del organismo al promover la inflamación crónica asociada al envejecimiento y limitar la capacidad proliferativa y de regeneración tras el daño, sobre todo si las células progenitoras comienzan a entrar en senescencia comprometiendo, por tanto, la viabilidad de los tejidos (Collins et al., 2005; Wu et al., 2007).

Ejemplo de ello es que la capacidad fagocítica de las células del sistema inmunitario se ve mermada, alterándose así la eliminación de células senescentes y su acumulación progresiva creando un bucle favorecedor del envejecimiento y patologías asociadas a la edad (Collins et al., 2005; Wu et al., 2007; Rodier et al., 2009; Kang et al., 2011; Van Deursen, 2014; Childs et al., 2015; Herranz and Gil, 2018). También se indica que su

papel es distinto dependiendo de la edad del organismo (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007a). Se ha observado que las células senescentes se acumulan a diferentes velocidades en los diversos órganos, encontrándose principalmente en tejidos renovables y aquellos que presentan inflamación prolongada (Paradis et al., 2001; Erusalimsky and Kurz, 2005; Herbig et al., 2006; Jeyapalan et al., 2007a; Coppé et al., 2010). Estos tejidos contribuyen significativamente al declive relacionado con la edad debido a la desregulación de mediadores implicados en la senescencia durante el envejecimiento cronológico (Dimri et al., 1995; Baker et al., 2011; Rhinn et al., 2019).

Se ha descrito que en algunas ocasiones las células senescentes son resistentes a los estímulos apoptóticos, hecho que contribuye a su supervivencia e implica un hallazgo en desacuerdo con su función supresora de tumores (Mooi and Peiper, 2006), descrita anteriormente como consecuencia de su función potencial en la reparación del daño (Sanders et al., 2013).

En resumen, los diferentes trabajos analizados muestran que la senescencia participa en distintos procesos biológicos aparentemente contradictorios entre sí. Los efectos malignos o beneficiosos en el proceso de senescencia van a depender del contexto celular, tisular o del propio inductor del estado senescente (Lecot et al., 2016; Herranz and Gil, 2018). El reto es comprender la respuesta senescente para aprovechar sus beneficios y evitar sus inconvenientes (Rodier and Campisi, 2011).

Por otro lado, también se ha descrito la presencia de senescencia durante el desarrollo embrionario normal al actuar como un mecanismo programado que contribuye al patrón y a la remodelación tisular (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013) (ver más adelante).

A través de la principal teoría evolutiva del envejecimiento denominada **pleiotropía antagónica**, se podrían explicar las funciones contradictorias de la senescencia celular. Gran parte de los organismos han evolucionado en ambientes con multitud de peligros fatales (inanición, infección, depredación...). Como consecuencia, la selección en contra de los procesos que promueven las discapacidades tardías de la vida es débil. Por tanto, la teoría evolutiva sostiene que los fenotipos de envejecimiento, así como enfermedades relacionadas con la edad, son consecuencia de la fuerza decreciente de la selección natural con la edad (Campisi, 2011).

Es necesario tener en cuenta la evolución de los tejidos somáticos que contienen células mitóticas. Estos tejidos tienen capacidad de renovación, reparación y reabastecimiento a través de la proliferación celular que, a su vez, es un paso temprano y esencial en el desarrollo tumoral. Con la replicación del ADN aumentan las posibilidades de aparición y propagación de mutaciones somáticas, que es una fuerza impulsora de carcinogénesis maligna. Como consecuencia, en la evolución de los organismos con tejidos renovables, el cáncer implica un peligro constante para el aumento de la longevidad. Tal peligro ha sido compensado con la coevolución de los mecanismos supresores de tumores. Por ende, los genes y los procesos pleiotrópicos que intervienen en la senescencia son beneficiosos para los organismos a edades tempranas, pero perjudiciales en la senectud. El envejecimiento, en parte, aparecería como consecuencia de los mecanismos supresores de tumores (Campisi, 2005). Por tanto, se observa que la senescencia es un ejemplo de pleiotropía antagónica evolutiva. Su evolución ha promovido la supervivencia de organismos jóvenes al suprimir la aparición de cáncer, pero limita su longevidad al impulsar el envejecimiento y patologías relacionadas con la edad en individuos más maduros que acumulan estas células disfuncionales en tejidos somáticos (Campisi, 2003).

5. Principales estímulos inductores de senescencia celular.

Salvo las células madre embrionarias (Miura et al., 2004), la gran parte de las células con capacidad de división, incluyendo algunas tumorales, pueden experimentar senescencia con el estímulo adecuado (Shay and Roninson, 2004; Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007a). Indistintamente del mecanismo por el que se induzca la senescencia, cuando la célula detecta un nivel crítico de daño o disfunción, se activa el programa senescente (Coppé et al., 2010).

La senescencia replicativa resulta, en parte, por el acortamiento progresivo o disfunción de los telómeros, como consecuencia de los ciclos de replicación del ADN (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007c). Sin embargo, en la mayoría de los tipos celulares, la senescencia replicativa tiene un origen no telomérico. Esto demuestra que este fenómeno no depende exclusivamente del número de ciclos replicativos que ha pasado la célula (López-Otín et al., 2013). Muchos de los tipos celulares son propensos a la senescencia en respuesta a distintos tipos de estrés entre los que destacan:

- **Estrés oxidativo:** La presencia de ROS provoca la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores (Toussaint et al., 2000; Adams, 2009).
- **Estrés genotóxico:** Debido, por ejemplo, a la disrupción de la cromatina epigenómica o el agotamiento de conjuntos tales como dATP, dGTP y dCTP (Mannava et al., 2013; Van Deursen, 2014; Herranz and Gil, 2018).
- **Disfunción mitocondrial:** Distintas irradiaciones nocivas o agentes quimioterapéuticos pueden provocar un mal funcionamiento de las mitocondrias (Narita et al., 2003; Kuilman et al., 2010; Zacarías-Fluck et al., 2015; Demaria et al., 2017).
- **Lesiones o remodelaciones tisulares agresivas** (Brusentsev et al., 2017).
- **Alteraciones metabólicas:** Expresión ectópica de CDKIs (*Cyclin-dependent kinase inhibitors*) o la presencia de estrés celular en cultivo (Rodier and Campisi, 2011).

Como se ha descrito con anterioridad, un daño leve en el ADN puede causar la detención transitoria de la proliferación celular. No obstante, un incremento del nivel de daño celular o la acumulación de señales iniciadoras de senescencia, provocan el aumento de la probabilidad de inducción a la senescencia. El origen más común para la detención del crecimiento es por una DDR provocada por un daño intrínseco. Este puede ser causado, entre otras afecciones, por daño oxidativo, atrofia telomérica, hiperproliferación o la rotura de la doble cadena de ADN (*double strand breaks*, DSB). La DDR implica el acortamiento progresivo de los telómeros, lo que termina exponiendo un extremo del cromosoma y es detectado por la maquinaria DDR como una ruptura de la doble cadena (D'Adda Di Fagagna et al., 2003; Collado et al., 2007; Kuilman et al., 2010; Suram et al., 2012). Por otro lado, en respuesta a señales mitóticas, un aumento en el uso de los orígenes de replicación del ADN conduce a una acumulación de daño genómico y a la activación de una DDR por horquillas de replicación estancadas (Bartkova et al., 2006; Demaria et al., 2014). La senescencia se asocia con una DDR persistente, que da como resultado un daño irreparable al ADN (Fumagalli et al., 2012).

No es sorprendente que todos estos los estímulos inductores de senescencia sean potencialmente oncogénicos (Campisi et al., 2011), ya que los diferentes factores que desencadenan la senescencia están asociados a funciones fisiológicas y patológicas (Adams, 2009). La célula, tras experimentar un estímulo potencialmente oncogénico, evalúa el estrés sufrido y valora si intenta reparar sus consecuencias o si se adentra en senescencia. Después de un periodo de decisión, la detención de la proliferación se hace permanente y la célula estresada suprime la capacidad de formar un tumor maligno (Rodier and Campisi, 2011). Si la senescencia es inducida por la activación de un oncogén, es denominada senescencia inducida por oncogenes (*oncogen-induced senescence*, OIS) (Adams, 2009; Lee and Lee, 2019). Sin embargo, independientemente del origen, la activación de la señalización del daño del ADN contribuye a la iniciación y al mantenimiento del programa senescente completo, contribuyendo al envejecimiento del organismo (López-Otín et al., 2013).

6. Principales vías intracelulares activadas en la senescencia celular.

Aunque su contribución puede variar dependiendo del desencadenante, se han documentado al menos cuatro vías señalizadoras que constituyen el núcleo de la maquinaria que controla la ejecución y el mantenimiento del programa senescente: **p53, p21, p16 y pRB** (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007c; Adams, 2009; Collado and Serrano, 2010; Kuilman et al., 2010). Estas moléculas son reguladores transcripcionales e incluyen gran cantidad de moduladores por encima de ellas y efectores en su cascada molecular (Sherr and McCormick, 2002). De hecho, en la detención del ciclo celular se detecta un intenso incremento de la expresión de estas proteínas reguladoras como se observa en procesos de senescencia (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007c; Collado et al., 2007; Levav-Cohen et al., 2012; Rai and Adams, 2012; Dominick and Krizhanovsky, 2014). Los defectos en cualquiera de estas vías comprometen la capacidad celular para adentrarse en senescencia y aumentan la susceptibilidad del organismo a desarrollar cáncer (Rodier and Campisi, 2011). También se han identificado otros mediadores de senescencia (Gorgoulis and Halazonetis, 2010) como, por ejemplo, los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina p21 y p27, independientes de las vías p53 y p16/Rb, que también contribuyen al fenotipo senescente (Collado and Serrano, 2010).

6.1. Mecanismo de actuación de las vías intracelulares.

En condiciones normales, el factor de transcripción p53 es degradado por el complejo proteico MDM2 (*murine double minute 2*). Sin embargo, cuando se produce estrés mitogénico o daño en el ADN, la actividad de MDM2 se suprime permitiendo que p53 active a la proteína p21 (también se le denomina CDKN1a, p21Cip1, Waf1 o SDI1), deteniéndose así el ciclo celular (Martínez-Salazar, 2009). Por otro lado, la proteína p16 activa al factor de transcripción pRB (retinoblastoma) después de que la célula sufra estrés o daño en el ADN para, más tarde, unirse a los miembros de la familia de factores transcripcionales E2F, los cuales regulan el ciclo celular (Vicencio et al., 2008; Adams, 2009). El tipo celular y el tipo de inducción van a ser factores claves para la activación de las diferentes cascadas. Algunos tipos celulares pueden retrasar la inactivación de p16, mientras otros requieren ser deficientes en p53. En otras ocasiones puede requerirse el déficit de p53 junto a p16 para inactivar el proceso senescente (Shay and Wright, 2005).

Se especifica que la vía p53/p21 media la senescencia producida principalmente por la disfunción telomérica y el daño en el ADN. Por otro lado, p16/pRB media aquella senescencia debida sobre todo a oncogenes o disrupción en la cromatina (Ben-Porath and Weinberg, 2004; Kuilman et al., 2010; Lee and Lee, 2019). Sin embargo, actualmente no existen marcadores inequívocos o completos para definir el estado senescente, por lo que es difícil saber hasta qué punto los estados senescentes inducidos por estas vías son distintos o similares (Caggiano et al., 1994; Calof et al., 1996; Kondo et al., 2010). No obstante, las células senescentes muestran varios fenotipos que, en conjunto, definen el estado senescente (Hernández-Segura et al., 2018a).

Las diferentes evidencias indican que la señalización de p53/p21 inicia la senescencia, mientras que la señalización de p16(INK4a) sería necesaria para el mantenimiento del estado senescente a largo plazo mediante la activación de la vía pRB (Dominick and Krizhanovsky, 2014; Herranz and Gil, 2018; Lee and Lee, 2019). En el caso de p16 a edades tempranas está asociado a la prevención tumoral (Campisi et al., 2011), mientras que en edades avanzadas tendría un rol principal en el mantenimiento del estado irreversible de la senescencia después de la inactivación de p53, pRB o ambos (Fig.3) (Schafer et al., 2017a). Dependiendo del tejido, el órgano y la especie modelo, las células

van a diferir tanto en su fenotipo como en la importancia de las rutas activadas para generar la respuesta senescente.

Se puede concluir que la detención de la proliferación depende de manera crítica de las vías p53/p21 y p16/pRB (Ohtani et al., 2004; Campisi, 2005). La oncogénesis maligna requiere de la inactivación genética (mutacional) o epigenética de, al menos, una de estas vías y normalmente de las dos debido a que comparten elementos que interactúan y se modulan entre sí (Zhang et al., 2006; Yamakoshi et al., 2009). Ambas vías supresoras de tumores son las que presentan un papel más relevante en esta función en las células de vertebrados. Por contra, la senescencia activa diferentes vías como la p38-MAPK, que es capaz de estimular la transcripción de genes que obligan a la detención del crecimiento durante la senescencia (Campisi, 2011). No obstante, la evidencia indica cada vez más que ambas rutas no son las reguladoras exclusivas de la senescencia como se creía (Blagosklonny, 2012; Lecot et al., 2016).

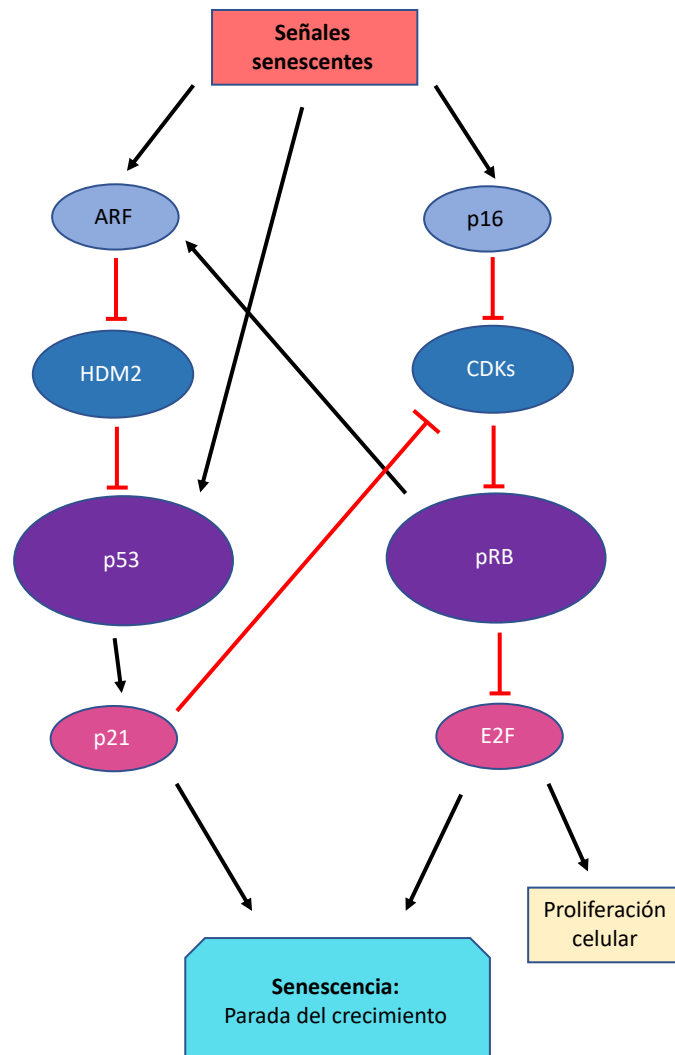


Figura 3. Vías de senescencia controladas por p53 y p16-pRB. Señales de inducción senescente provocadas por respuesta a daño en el ADN (DDR) y otros tipos de estrés que involucran generalmente a las vías supresoras de tumores p53 o p16-retinoblastoma (pRB). p53 está regulada negativamente por la ligasa E3 (HDM2), facilitando su degradación, mientras que HDM2 está regulada negativamente por ARF. La activación de p53 detiene la provocación parcial de la senescencia al inducir p21, que es un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (CDK), que tiene capacidad para suprimir la fosforilación y, por ende, la inactivación de pRB. Las señales que activan la vía p16-pRB lo hacen al inducir la expresión de p16, que es otro inhibidor de CDK al prevenir la fosforilación e inactivación de pRB. pRB detiene la proliferación celular suprimiendo la actividad de E2F, que es un factor de transcripción que estimula la expresión de genes necesario la progresión del ciclo celular. E2F puede reducir la proliferación al inducir la expresión de ARF, que se involucra en la vía p53. Por tanto, existe una regulación recíproca entre las vías p53 y p16-pRB. Esquema adaptado de Campisi y d’Adda di Fagnagna 2007.

7. Reversión del estado senescente.

Existen múltiples formas de revertir el estado senescente permitiendo así que las células puedan volver a entrar en el ciclo celular. Esto ocurre con la inactivación de la vía p53 que invierte el fenotipo senescente. Este efecto no puede considerarse universal ya que la eficacia de la inactivación va a depender del nivel de expresión de p16, como se ha demostrado en diferentes estudios *in vitro* (Beauséjour et al., 2003; Herbig et al., 2004; Campisi, 2005; Coppé et al., 2008; Kuilman et al., 2010). También hay que tener en cuenta que la activación de la proteína pRB induce el estado de heterocromatina represiva en los *loci* que contienen dianas E2F y en otros genes con función promotora de la proliferación. Sin embargo, el mantenimiento de estos dominios heterocromáticos no necesita de la actividad de p16 o pRB, por lo que una vez establecida la activación de la ruta pRB, la detención del ciclo celular no puede revertirse inactivando posteriormente a p53, a pRB o a ambos y tampoco se consigue con el silenciamiento de p16 (Beauséjour et al., 2003). Por lo tanto, el supresor tumoral p16 y la vía pRB a la que activa, proporcionan una barrera infranqueable a la proliferación celular, que no puede superarse mediante la pérdida de la función de p53 (Serrano et al., 1997; Campisi, 2005). Por último, se ha comprobado que el mantenimiento de una matriz extracelular adecuada y un microambiente formado por células proliferativas pueden ser factores que promuevan la reversión del estado senescente (Choi et al., 2011). Esto indica que eliminar células senescentes del microentorno a través de distintas estrategias pueden optimizar la fisiología del tejido y, por tanto, mejorar la salud y prevenir el envejecimiento (Chang et al., 2016; Baar et al., 2017; Schafer et al., 2017b; Xu et al., 2018).

8. Envejecimiento.

La acumulación de células con SASP provoca que los factores secretados expandan dicho fenotipo al microentorno induciendo el envejecimiento de los tejidos y, consecuentemente, el del individuo. El envejecimiento es un proceso bastante conservado en la filogenia y conlleva la disminución general de las capacidades funcionales de un organismo, lo que le genera un deterioro progresivo (López-Otín et al., 2013). La senescencia de las células madre y progenitoras puede obstaculizar la homeostasis tisular al interferir con la capacidad de los tejidos para repararse y

regenerarse tras estímulos dañinos asociados con el envejecimiento como son la inestabilidad genómica y el desgaste telomérico (McHugh and Gil, 2018). Como se ha comentado con anterioridad, la capacidad fagocítica del sistema inmunitario también se ve comprometida con la edad, lo que provoca que el aclaramiento de las células senescentes sea incompleto y se acumulen progresivamente, favoreciendo la aparición de patologías relacionadas con la edad (Van Deursen, 2014; Childs et al., 2015). La gran mayoría de enfermedades de este tipo son causadas por una inflamación crónica de bajo nivel provocada por las células senescentes sin una infección microbiana evidente, la cual es una característica típica de tejidos envejecidos (Franceschi et al., 2007; Chung et al., 2009).

Los microambientes tisulares normales pueden suprimir la capacidad de proliferar y sobrevivir a las células cancerosas. Sin embargo, el daño oxidativo inflamatorio puede iniciar carcinogénesis, y el medio inflamatorio creado por las células senescentes puede promover el cáncer por la supresión de la vigilancia inmune y/o fenotipos malignos estimulantes (Allavena et al., 2008; Grivennikov et al., 2011). El cáncer, como se ha visto con anterioridad, es una de las patologías promovidas por la inflamación.

Las funciones degenerativas de las células senescentes son objetivos potenciales para enfoques anti-envejecimiento, pero la existencia de programas senescentes beneficiosos complica el desarrollo de las intervenciones sin incurrir en toxicidades (Soto-Gómez and Demaria, 2017). Por ello, se debe tener en cuenta la dualidad del SASP ya que hay células senescentes relacionadas con la reparación tisular mientras que, por otro lado, existen aquellas asociadas a la edad o inducidas por terapias, asociadas con factores inflamatorios (Demaria et al., 2017). Los estudios realizados sobre células senescentes, envejecimiento, enfermedades relacionadas con la edad, cicatrización y terapias anticancerígenas se suelen centrar en la sobreexpresión o supresión de las principales vías conocidas: p16/pRB y p53 (Herranz and Gil, 2018). Como se ha comentado con anterioridad, estas vías tienen funciones pleiotrópicas al tener efectos tanto anti-proliferativos como pro-envejecimiento (Schafer et al., 2017b). En el caso de la carcinogénesis se requiere la inactivación genética (mutacional) o epigenética de una o ambas de estas dos vías.

Se ha visto que p16 apenas es detectable en individuos jóvenes sanos, pero su expresión aumenta con la edad (Campisi, 2005). Por otro lado, si p53 se sobreexpresa, se ha visto que ofrece resistencia al cáncer, pero presenta envejecimiento acelerado en ratones (Rodier and Campisi, 2011). En aquellos organismos donde las células no experimentan senescencia no viven más tiempo al morir prematuramente de cáncer (Rodier et al., 2007).

9. Relación entre senescencia y apoptosis.

La apoptosis es una forma de muerte celular programada y dirigida, dependiente de energía. Para su activación se necesitan movilizar una serie de enzimas proteolíticas entre las que podemos destacar las caspasas, que desencadenan cascadas intracelulares que conllevan la destrucción completa de la célula (Martínez-Salazar, 2009). Por el contrario, si la muerte celular es inducida en respuesta a errores, lesiones o situaciones patológicas se ha denominado “muerte celular no programada”, para reflejar su naturaleza accidental (Kourtis and Tavernarakis, 2007).

Morfológicamente, la célula en apoptosis se contrae y se vuelve más densa. En fases finales del proceso el núcleo se fragmenta junto a otros orgánulos celulares. Finalmente, los fragmentos celulares se separan formando los denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por fagocitos especializados o no especializados (Majno and Joris, 1995).

Aunque es un proceso celular distinto, la senescencia puede equipararse funcionalmente a la apoptosis como un mecanismo que actúa para detener o eliminar las células con riesgo de crecimiento aberrante que suponen un riesgo para el organismo (Da Silva-Álvarez et al., 2019). La apoptosis es la otra respuesta celular esencial frente a cualquier agresión que pueda sufrir la célula, y ambos procesos pueden compartir numerosos agentes inductores desencadenantes comunes, como el daño en el ADN o el estrés oncogénico. También comparten moléculas mediadoras como la expresión de genes supresores de tumores, entre los que destaca p53 (Campisi and D’Adda Di Fagagna, 2007a; Rodier et al., 2007; Lorda-Díez et al., 2015a). El hecho de que una célula entre en senescencia o en apoptosis no está totalmente aclarado, pero deben existir mecanismos para bloquear las distintas decisiones (Herranz and Gil, 2018). El tipo celular, el origen y la intensidad del daño parecen tener relevancia, incluso una misma

célula es capaz de producir ambas respuestas (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007a). Se cree que la decisión de una célula para llevar a cabo la respuesta apoptótica depende del equilibrio de sus moléculas de supervivencia y muerte. Se considera, por tanto, que la senescencia y la apoptosis son las principales respuestas frente a cualquier tipo de daño celular.

Gran cantidad de células degeneran por apoptosis. Este hecho está muy presente durante el desarrollo embrionario donde la apoptosis también juega un papel esencial. Se produce de manera bien definida en respuesta a determinadas señales moleculares y se conoce clásicamente como muerte celular ontogenética (Fuchs and Steller, 2011). La relación entre senescencia y apoptosis ha hecho que se indague sobre el proceso de la senescencia celular durante el desarrollo embrionario, donde se ha visto su presencia e incluso juega un papel clave (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015b).

10. Senescencia, apoptosis y desarrollo embrionario.

Estudios emergentes desarrollados en la última década han determinado que existe una clara relación entre el fenómeno apoptótico y el de senescencia durante el proceso de morfogénesis de diferentes estructuras embrionarias en los mamíferos, es decir, que ambos procesos no están vinculados durante este periodo a procesos patológicos en mamíferos (Chuprin et al., 2013; Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Zhao et al., 2018; Wanner et al., 2021), aves (Nacher et al., 2006; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015b; Gibaja et al., 2019; Sánchez-Fernández et al., 2019, 2020, 2021), anfibios (Davaapil et al., 2017; Villiard et al., 2017) y peces (Villiard et al., 2017; Da Silva-Álvarez et al., 2020).

La muerte celular ontogénica sigue un patrón cronotopográfico muy establecido en respuesta a inducciones paracrinas de tejidos adyacentes (Kourtis and Tavernarakis, 2007; Fuchs and Steller, 2011; Francisco-Morcillo et al., 2014). En los últimos tiempos, la senescencia durante la ontogenia ha sido observada gracias al conocimiento previo de algunas de las vías reguladoras que comparte con las observadas en senescencia adulta (Banito and Lowe, 2013). Las células senescentes encontradas durante el desarrollo embrionario presentan una actividad β -galactosidasa a pH 6, normalmente

vinculada a senescencia, por lo que es denominada actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (β -gal-pH6) y marcadores de heterocromatina también asociados a la senescencia (HP1g y H3K9me3), mostrando una reducción de la expresión de Ki67 (un marcador de proliferación) debido al mantenimiento de la célula en fase G1 (Rhinn et al., 2019).

El análisis de la senescencia en el embrión con el uso de la técnica de la actividad β -gal-pH6, demuestra que, al igual que la muerte celular ontogenética, aparece en células que se concentran en regiones puntuales durante un intervalo de tiempo muy definido, pero desaparece antes del nacimiento (Da Silva-Álvarez et al., 2019; Rhinn et al., 2019). Más aún, las regiones con células senescentes coinciden con áreas de intensa actividad apoptótica descritas durante la ontogenia en la extremidad en desarrollo (cresta ectodérmica apical), aparato urinario (conducto de Wolff femenino), oído interno, tubo neural (en la placa del techo durante su cierre), extremo de la cola, la vesícula del cristalino, saco endolinfático, arcos faríngeos, corazón o endodermo intestinal (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015b, 2019; Gibaja et al., 2019; Rhinn et al., 2019). A este tipo de senescencia le sigue la infiltración de macrófagos, el aclaramiento de células senescentes y apoptóticas permitiendo la remodelación tisular. Como se ha descrito, la senescencia se ha identificado en los principales centros de regulación como son la cresta ectodérmica apical y la placa del techo neural. Su alteración haría permutar significativamente el desarrollo embrionario normal (Lee et al., 2000; Chizhikov and Millen, 2004; Mariani et al., 2008). También se ha encontrado en tejidos extraembrionarios de la placenta al ser inducida por la fusión celular que genera el sincitio, adquiriendo resistencia a la apoptosis y manteniendo su viabilidad (Chuprin et al., 2013). Estos hallazgos sugieren que la senescencia es una característica conservada y esencial en el desarrollo embrionario de los vertebrados, teniendo un rol secretor en estas estructuras que contribuyen a la especificación del destino celular y al patrón tisular (Pérez-Garijo and Steller, 2014; Czarkwiani and Yun, 2018).

Sin embargo, existen estudios donde se muestra claramente que la actividad β -gal-pH6 no indica presencia de senescencia. Ejemplo de ello es que la actividad β -gal-pH6 refleja la intensa biogénesis de lisosomas durante la actividad autofágica (Young et al., 2009). También se ha descrito en el desarrollo temprano del endodermo visceral de ratón una

fuerte señalización histoquímica de β -gal-pH6 (Huang and Rivera-Pérez, 2014a) y en las células del lumen del duodeno (Going et al., 2002). Además, la actividad β -gal-pH6 se detecta en macrófagos y osteoclastos maduros (Bursucker et al., 1982; Kopp et al., 2007; Hall et al., 2017). Recientemente, se ha demostrado que las células de Purkinje, el plexo coroideo, el músculo cardíaco, el intestino y células pancreáticas en tejidos de mamíferos también poseen una fuerte actividad β -gal-pH6 (Raffaele et al., 2020). En el caso del SNC se propuso que la actividad β -gal-pH6 se detecta en neuronas diferenciadas (Piechota et al., 2016). Como se puede observar, estos estudios cuestionan a la actividad β -gal-pH6 utilizada como indicador asociado a la senescencia en el envejecimiento o en estructuras que van a degenerar, por lo que esta técnica se debería combinar con otros marcadores de senescencia.

Por otro lado, durante este proceso se ve bastante mermada la capacidad proliferativa de las células (Muñoz-Espín et al., 2013). Diferentes genes supresores de tumores aumentan su actividad durante el proceso de senescencia, especialmente p21, p27 y p15, atribuyéndose a p21 el papel más relevante durante el desarrollo embrionario. Resulta llamativo que la expresión del principal regulador de la senescencia en los tejidos adultos y en condiciones patológicas, p53, no se ve alterada en estas regiones senescentes durante la ontogenia (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Estos mismos autores tampoco detectan la expresión de marcadores de daño del ADN que normalmente se activan en condiciones patológicas, como las quinasas ATM o ATR que ayudan a reparar el ADN. Así como tampoco se ve alterada la expresión de p16^{INK4A}, que es el marcador senescente más universal de detención de proliferación por daño (He and Sharpless, 2017), o de p19^{ARF} (Storer et al., 2013). Por consiguiente, parece que la senescencia a corto plazo que ocurre durante el desarrollo embrionario depende de p21 y que en dichas células no existe daño alguno en el ADN. Esto hace que la senescencia durante el desarrollo sea un proceso distinto o menos complejo. El número de moléculas involucradas en senescencia identificadas va en aumento, de hecho, se ha descrito un aumento en la presencia de numerosos factores paracrinos que se secretan desde las células en senescencia cuando adquieren el fenotipo secretor SASP, como interleucinas, factores de crecimiento, metaloproteasas y miembros de moléculas relacionadas con el TNF en el desarrollo de la extremidad (Lorda-Díez et al., 2015b).

La expresión de mediadores clave y características comunes sugiere que la senescencia podría haber surgido principalmente como un mecanismo ontogenético. Representaría una forma más primitiva de senescencia celular, prevista como un proceso de señalización temporal durante determinadas etapas del desarrollo y que luego se adaptó durante la evolución para realizar una función esencial en la homeostasis del tejido adultos (Storer et al., 2013; Brusentsev et al., 2017). Esto es debido a que los aspectos patológicos de la senescencia inducida por OIS o el envejecimiento, requieren del establecimiento de una regulación más compleja, que precisa mediadores adicionales (Serrano et al., 1997; Kuilman et al., 2010).

Más allá, algunos hallazgos muestran que la ausencia de p21 durante el desarrollo embrionario provoca alteraciones en estructuras adultas, haciendo que procesos compensatorios, como la apoptosis, no reemplacen completamente esa ausencia de senescencia programada durante la ontogenia (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Por tanto, se vuelve a poner de manifiesto que la senescencia durante el desarrollo embrionario está mediada por p21, pero en este caso de manera independiente de p53, aunque controlada por las vías de señalización TGF β / SMAD y PI3K / FOXO y ERK (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Davaapil et al., 2017; Gibaja et al., 2019). También se ha puesto de manifiesto una interrelación entre ambos mecanismos, ya que al anular uno se produce un incremento en el número de células que sufren el otro proceso y viceversa (Da Silva-Álvarez et al., 2019).

Además, se ha identificado una superposición significativa de las vías activadas durante la senescencia detectada durante el desarrollo y la senescencia inducida por oncogenes, incluida la expresión de p21, p15 y una serie de componentes del SASP (Kuilman et al., 2010). En los centros de señalización mencionados, las proteínas secretadas son componentes comunes del fenotipo SASP de la senescencia inducida por estrés en adultos. Por esta razón, se sugiere que algunas de las funciones del SASP en OIS (proliferación, angiogénesis, transición epitelio-mesénquima o plasticidad) podrían implicar una reactivación de los procesos de desarrollo, como ocurre en la extremidad (Saiz-López et al., 2017). Es aquí donde se han visto ejemplos de reentrada al ciclo de células positivas a p21 (Li et al., 2018). En conjunto, la senescencia ontogénica es un proceso fisiológico y programado que está altamente controlado para la inducción,

balance y eliminación de células y/o estructuras que actúa complementariamente a la apoptosis (Da Silva-Álvarez et al., 2019). Esto permite ejercer un efecto remodelador y beneficioso de los tejidos en desarrollo, pero con la edad es reemplazado por los mecanismos senescentes supresores de tumores (Rhinn et al., 2019).

11. Actividad β -gal-pH6 durante el desarrollo embrionario.

La técnica histoquímica de detección de la actividad β -gal-pH6 es uno de los principales marcadores de senescencia en los estudios de desarrollo embrionario. β -gal-pH6 permite identificar visualmente los centros senescentes en diferentes estructuras del embrión durante el desarrollo normal, lo que ha permitido analizar si otros marcadores de senescencia también se expresan en esas zonas (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015b).

Las células presentan en sus lisosomas una actividad enzimática hidrolasa β -D-galactosidasa ácida (EC 3.2.1.23). Su actividad es óptima a pH4 y escinde residuos de galactosa terminales unidos a diversas moléculas como gangliósidos y glicoproteínas, al igual que una serie de sustratos artificiales testados de forma experimental. Uno de estos sustratos artificiales es el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoil β -D-galactopiranosido (X-gal) que al ser catalizado genera un precipitado azul cuando está presente (Dimri et al., 1995).

El ensayo histoquímico con β -gal-pH6 se ha utilizado en una gran variedad de células y tejidos para demostrar el inicio de la senescencia replicativa en cultivos celulares e *in vivo* en condiciones fisiológicas. Sin embargo, a pesar de su uso generalizado, la especificidad y la selectividad de este ensayo han sido discutidas debido a que la naturaleza de β -gal-pH6 ha sido poco estudiada y su origen y función en la senescencia son poco conocidos. Existen resultados que demuestran que la actividad β -gal-pH6 detectada en células senescentes puede atribuirse a un aumento en el nivel de la enzima lisosómica clásica (Kurz et al., 2000). Esto es consecuencia de un aumento en la masa lisosomal, tanto en tamaño como en número, que parece ser un cambio disfuncional que acaece en las células senescentes (Young et al., 2009). A pH6 la actividad específica de esta enzima es muy baja en células jóvenes cayendo por debajo del nivel de detección del ensayo citoquímico, mientras que las células senescentes con un contenido

aumentado de masa lisosómica muestran tinción positiva (Hernández-Segura et al., 2018b).

Como se ha comentado con anterioridad, se ha demostrado que el marcaje con β -gal-pH6 durante el desarrollo de vertebrados se muestra coincidente en regiones que van a degradarse por apoptosis, como ocurre en el tejido interdigital entre otros (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Sin embargo, se ha comprobado que la actividad β -gal-pH6 no se encuentra restringida a las células que están sufriendo el proceso de senescencia y degeneración. Así, esta actividad se detecta en macrófagos (Hall et al., 2017). Además, algunos tejidos marcados con β -gal-pH6 en el embrión, no parecen expresar otros marcadores de senescencia como p21 (Huang and Rivera-Pérez, 2014a). Por tanto, algunos autores cuestionan la efectividad de la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 como marcador de senescencia en tejidos embrionarios, incluido el sistema nervioso central (Piechota et al., 2016). Este hecho implica que se debe ir con cautela a la hora de identificar las células en senescencia, ya que si en realidad lo son deberían mostrar una combinación de marcadores y características senescentes (Rhinn et al., 2019).

OBJETIVOS GENERALES.

OBJETIVOS GENERALES.

1. Describir la distribución de la actividad β -gal-pH6 durante el desarrollo embrionario en aves y ratón joven.
2. Comprobar la presencia de la actividad β -gal-pH6 durante la retinogénesis en aves y su relación con la apoptosis y senescencia.
3. Establecer una relación entre el patrón de distribución de la actividad enzimática de la actividad β -gal-pH6 y el de diferentes marcadores específicos de diferenciación celular en el epitelio olfatorio de ratón joven.
4. Comprobar la presencia de la actividad β -gal-pH6 durante el desarrollo de la extremidad inferior de *Gallus gallus* y su relación con la senescencia.
5. Describir como se ve afectada la distribución de la actividad β -gal-pH6 en la extremidad inferior de *Gallus gallus* en desarrollo interviniendo sobre la actividad de diferentes moléculas señalizadoras.

MATERIALES Y MÉTODOS.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Modelos animales.

En el presente trabajo, hemos analizado la presencia de células senescentes en determinadas estructuras embrionarias y para ello hemos utilizado dos modelos animales recurrentes en estudios de biología del desarrollo: la gallina y el ratón. Por otra parte, para comparar los resultados obtenidos en gallina, introdujimos una serie de criosecciones de codorniz (*Coturnix coturnix*) y pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*) procedentes de un estudio paralelo desarrollado en nuestro laboratorio, por lo que dichos embriones no fueron manipulados para este estudio. También incluimos secciones de cabezas de ratón en estadios P0, P1, P3, P7 y P15 procedentes de estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación.

1.1 Especímenes de gallina.

En el presente estudio se han utilizado individuos en estadios embrionarios y recién eclosionados de gallina pertenecientes a la variedad *White Leghorn* (*Gallus gallus*, Linnaeus 1758). Los individuos fueron procesados de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y del gobierno de España (Real decreto 53/2013). El uso de los embriones y postnatales de esta especie para la experimentación en la presente tesis ha sido aprobado por el Comité de Bioética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (Anexo 1). Los huevos fertilizados de *G. gallus* procedían de la Granja Santa Isabel (S.A. Selección Avícola, Córdoba, España). Estos fueron introducidos en un incubador con volteo a una temperatura controlada en un intervalo de 37°C y 38°C, con humedad relativa constante (80-95%). Fueron incubados las horas necesarias hasta alcanzar los estadios requeridos para su manejo en el estudio, comprendiendo entre 3 (≈HH18) y 21 días (día postnatal 0, P0) de incubación, de acuerdo con las tablas Hamburger y Hamilton, 1951 (Anexo 2). Los huevos fertilizados se incubaron en posición vertical con su extremo romo hacia arriba.

1.2 Especímenes de ratón.

En esta investigación se han utilizado un total de 22 ratones albinos Swiss/ICR postnatales de 30 y 60 días de vida. Todos los individuos fueron cedidos por el grupo BIMOCAN (Biología Molecular del Cáncer) que realizan sus investigaciones en cáncer de hígado. Una vez sacrificaban los animales, eran decapitados y la cabeza nos la cedían para la realización de este estudio. Los individuos fueron procesados de acuerdo con las recomendaciones de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y del gobierno de España (Real decreto 53/2013). El uso de estos individuos postnatales de esta especie para la experimentación en la presente tesis ha sido aprobado por el Comité de Bioética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura.

2. Preparación del material.

2.1 Obtención de embriones de aves.

Para la extracción de los embriones de *G. gallus* se realizó una abertura en la cáscara en la parte roma del huevo. A continuación, éstos fueron extraídos y trasladados a una placa de Petri con tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS, solución 0,1 M, pH 7,4) donde se retiraron las membranas cuidadosamente con unas pinzas de disección. A continuación, se realizó el estadiaje de los especímenes en la lupa siguiendo las tablas de Hamburger y Hamilton (1951), basadas en criterios morfológicos.

2.2 Fijación de tejidos con PFA de embriones de aves.

Los embriones de hasta 14 días (2/3 del desarrollo embrionario) se les seccionó la cabeza y las extremidades y se fijaron en tres soluciones distintas: paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, glutaraldehído y metanol. La fijación se realizó durante 12 horas a 4°C. Tras unas primeras pruebas para optimizar la histoquímica de la β -gal-pH6 (ver más adelante), se comprobó que la histología se preservaba muy defectuosa con el glutaraldehído y con el metanol, por lo que se decidió fijar la mayor parte del material con PFA 4%.

Los embriones de estadios tardíos y el recién eclosionados fueron sobre-anestesiados con isofluorano, perfundidos trascardíacamente con una solución de PBS para eliminar

la sangre y posteriormente con PFA 4%. Las cabezas fueron seccionadas y postfijadas tres horas a 4°C en la misma solución fijadora.

2.3 Fijación y obtención de tejidos de ratón.

Las cabezas fueron fijadas por inmersión en PFA 4% durante 12 horas. Tras eliminar la piel, las cabezas fueron nuevamente sumergidas en una solución de descalcificación saturada de EDTA al 20% en agua destilada (pH 7.4) con agitación a 4°C durante una semana hasta comprobar que el hueso estaba blando y maleable. La solución era renovada cada dos días durante el proceso.

3. Congelación.

Una vez que los especímenes de gallina y ratón fueron fijados en PFA 4%, se incluyeron en la solución crioprotectora PBS-MgCl₂-15% sacarosa donde se mantuvieron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, fueron incluidos en moldes con una solución previamente calentada a 37°C de PBS-gelatina (15%)-sacarosa (15%) (PBS-G-S). Estos moldes se transfirieron posteriormente a una placa de Petri con hielo para que la solución gelificara alrededor de los especímenes. Los moldes fueron retirados una vez que la gelatina estaba solidificada para, a continuación, tallar con una cuchilla el cubo de PBS-G-S con el espécimen en su interior. Las piezas fueron pegadas con *Tissue-Tek* a una lámina de corcho para su recuperación y a continuación, fueron introducidas durante tres minutos en un baño de 2-propanol (alcohol isopropílico) al que se le añadió CO₂ congelado, mientras que las cabezas de ratón se mantuvieron sumergidas cinco minutos. Esto permitió una congelación rápida llegando a temperaturas de entre -70°C y -80°C. Una vez las piezas se retiraron del baño fueron secadas con papel secante y envueltas en papel de aluminio con una etiqueta identificativa. Finalmente, las piezas se almacenaron congeladas a -80°C, al menos toda la noche, hasta su uso.

4. Realización de criosecciones.

Los bloques congelados fueron extraídos del arcón y atemperados en la cámara de un micrótopo criostático (Leica CM 1900) a una temperatura de -22°C. Tras su montaje en el cabezal, se obtuvieron secciones de 20 µm de grosor. Los cortes fueron recogidos en series alternas de 3-9 portaobjetos Superfrost® Plus (Menzel-Gläsner, Alemania), dependiendo del tamaño de la muestra procesada. Este grosor es óptimo para la

realización de la técnica histoquímica de la β -gal-pH6, que marcará las células que tengan esta actividad enzimática incrementada en un tono azul-verdoso (Fig. 4). Los portaobjetos se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Los cortes para la histoquímica enzimática de la β -gal-pH6 y la inmunohistoquímica fueron los mismos, aunque los obtenidos de extremidades de gallina tenían un grosor de $50\ \mu\text{m}$.

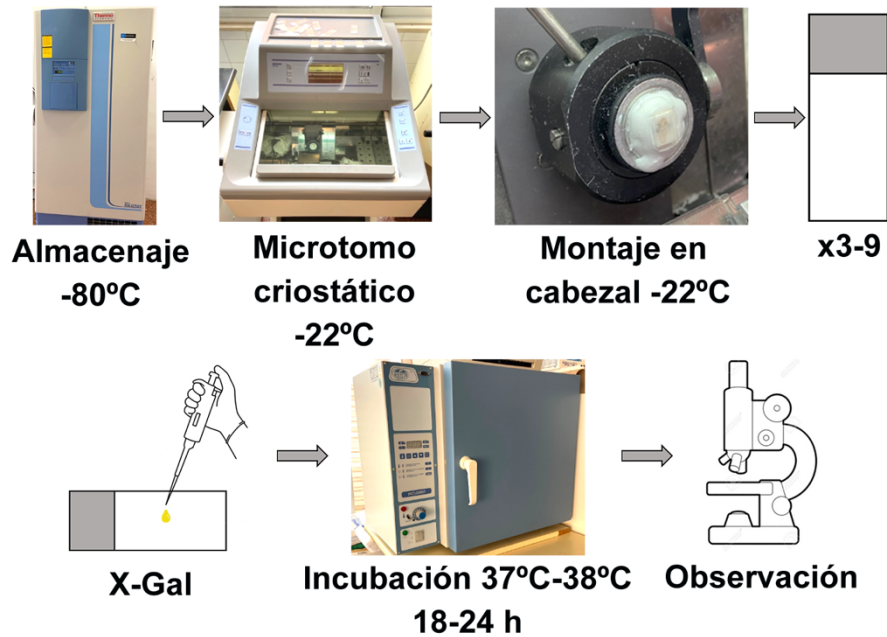


Figura 4. Esquema de la obtención de criosecciones para la detección de β -gal-pH6 en tejido.

5. Detección de la actividad β -galactosidasa.

Como ya se ha comentado, la detección histoquímica de la β -gal-pH6 es la principal técnica utilizada para identificar células senescentes. Existe también la técnica histoquímica que detecta la β -gal, pero realizada a pH 4.0, que ayuda a identificar la actividad enzimática lisosomal (Lorda-Díez et al., 2015).

5.1. Detección de β -gal-pH6 en secciones histológicas.

Los portaobjetos con las secciones de tejido, una vez atemperados, fueron lavados dos veces en pases de diez minutos en tampón PBS-MgCl₂ a pH 6.0. Para la detección de la actividad β -gal-pH6 se requiere la incubación del tejido a 37°C-38°C en cámara húmeda con 350 μ L del sustrato de cromogénico denominado X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, BCIG) en tampón PBS-MgCl₂ a pH6.0 durante 18-24 horas (Piechota et al., 2016). Durante este tiempo, el líquido revelador era constantemente repuesto y, de manera progresiva, aquellas células β -gal-pH6 positivas, desarrollaron un precipitado de color azulado. La intensidad del marcaje era constantemente monitorizada en un microscopio de luz transmitida. Una vez que se alcanzó la coloración óptica, se eliminó el X-gal y se procedió a un lavado de diez minutos de nuevo con tampón ácido PBS-MgCl₂ pH6. En otras ocasiones, las secciones eran posteriormente tratadas con técnicas inmunohistoquímicas (ver más adelante).

5.2 Detección de la actividad β -galactosidasa en extremidades inferiores enteras.

Las extremidades inferiores, una vez fijadas durante una noche, fueron a continuación sumergidas en PBS- MgCl₂ pH6 durante 24 horas. De esta forma se prepara al tejido para la mejor asimilación del sustrato cromogénico X-gal. Las extremidades inferiores se introdujeron en alícuotas con la suficiente cantidad de sustrato para mantenerlas sumergidas. Éstas se incubaron a 37°C-38°C durante un tiempo que oscilaba entre las cuatro y ocho horas hasta la obtención de la intensidad de coloración azul óptima. A continuación, se fijaron en PFA 4% a 4°C durante 12 horas para evitar que la enzima β -galactosidasa continuara actuando y tiñera en exceso el tejido.

6. Inmunohistoquímica.

Para analizar la presencia de distintos antígenos en retina y epitelio olfatorio de gallina y ratón respectivamente, se han realizado técnicas de inmunofluorescencia simple y doble. Las criosecciones se atemperaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) favoreciendo una mejor adhesión del tejido al portaobjetos. Antes de iniciar las técnicas inmunofluorescencia, se realizó un protocolo de rescate antigénico. Para llevarlo a cabo se introdujeron los portaobjetos en un recipiente con tampón citrato 0'1M y citrato sódico ($H_5C_6O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) 0'1M a pH6 al baño maría a 90°C durante 30 minutos. Después, se dejaron enfriar sumergidos en el mismo tampón citrato a TA durante 20 minutos. A continuación, se dio comienzo al protocolo de inmunofluorescencia.

6.1 Inmunofluorescencia simple.

Los portaobjetos se lavaron una vez en PBS-Tritón X-100 al 0,05% (PBS-T) durante diez minutos. Tras dos lavados de diez minutos en PBS con gelatina (2 g/litro) y Tritón X-100 (0,25%) (PBS-G-T), se incubaron en PBS-G-T con lisina 1M (PBS-G-T-Lis) durante al menos 1 hora para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a antígenos no deseados. A continuación, se incubaron las secciones con el anticuerpo primario diluido en PBS-G-T en una cámara húmeda y a TA durante 12 horas (Tabla 1).

Pasado este tiempo se realizaron dos lavados en PBS-T de cinco minutos cada uno y después un lavado en PBS-G-T de diez minutos. Tras estos lavados se procedió a incubar las secciones con el anticuerpo secundario unido a un fluorocromo diluido en PBS-G-T en la cámara húmeda durante dos horas a TA. Todas las etapas de incubación, lavados y manipulación posteriores a este punto se realizaron en condiciones de oscuridad. Posteriormente, tras dos lavados en PBS-T de diez minutos cada uno y un lavado en PBS-G-T durante diez minutos, se incubaron las secciones con 300µl de DAPI (4' 6' diamidino-2-fenilindol, Sigma) por cada portaobjetos durante diez minutos a TA. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados en PBS 1x durante diez minutos cada uno.

A continuación, se montaron los portaobjetos con un cubreobjetos y Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium, Sigma-Aldrich, F4680. Para ello, se dejó caer unas gotas del

mismo y se un colocó un cubreobjetos encima, con cuidado y atención para evitar las burbujas. Finalmente, se almacenaron los portaobjetos montados a 4°C en oscuridad.

Los experimentos control fueron desarrollados sin agregar los anticuerpos primarios (Anexo 6).

6.2 Inmunohistoquímica fluorescente doble.

Para identificar diferentes subpoblaciones celulares y caracterizar de manera más eficiente los tipos celulares, se recurrió al doble marcaje inmunohistoquímico. El protocolo seguido para realizar la técnica de doble marcaje inmunohistoquímico fue el mismo que se siguió para la inmunohistoquímica simple. Sin embargo, se realizó combinando un anticuerpo monoclonal con otro policlonal desarrollados en especies diferentes para evitar posibles reacciones cruzadas. El suero estaba formado por una mezcla al 50% de los dos anticuerpos, tanto en el caso de los anticuerpos primarios como secundarios (Tabla 1). También debemos destacar que tras la incubación con el anticuerpo secundario y una serie de lavados con PBS-T, las muestras se incuban con el colorante DAPI (2µM en PBS) durante diez minutos en oscuridad para poner de relieve los ácidos nucleicos y especialmente el núcleo celular. Pasado este tiempo, se lavan con PBS 1x y se procedió al montaje con medio de montaje acuoso como se ha descrito anteriormente. Tras esto, se conservaron los portaobjetos en una bandeja en el frigorífico a 4°C (Anexo 6).

6.3 Inmunohistoquímica revelada con DAB.

Para identificar mejor alguno de los marcadores se decidió revelar con 3,3'-diaminobenzidina (DAB), lo que permite ver la localización del antígeno con luz transmitida. Para ello, una vez más las criosecciones fueron atemperadas y sometidas a la técnica de rescate antigénico (visto anteriormente). Se realizó un lavado de diez minutos en PBS-T previo a la inactivación de la peroxidasa endógena con una solución con una alta concentración de agua oxigenada (0,5% H₂O₂ en PBS-T) durante 45 minutos. Se lavó con PBS-G-T dos veces cinco minutos. Seguidamente, se bloquearon los lugares inespecíficos mediante PBS-G-T-Lis (300µl porta) una hora para, a continuación, incubar con el anticuerpo primario diluido en PBS-G-T (200µl porta) toda la noche (Tabla 1).

Al día siguiente se realizaron dos lavados con PBS-T de diez minutos y otro también de diez minutos con PBS-G-T. Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario biotinilado diluido en PBS-G-T durante dos horas. Se procedió después a dos lavados con PBS-T y otro de PBS-G-T de diez minutos cada uno, para de nuevo incubar con una solución de Extravidin-peroxidasa (Sigma, SA-5004) diluido en PBS-G-T a 1:200 durante dos horas. Se hicieron dos lavados de PBS-T de cinco minutos. A continuación, se aplicó el sustrato DAB como se ha indicado anteriormente, monitorizando la intensidad de la reacción en un microscopio hasta conseguir la coloración deseada. Para detener la reacción se hicieron tres lavados con PBS-T de cinco minutos. Finalmente, los portaobjetos se deshidrataron hasta llevarlos a xileno para su posterior montaje con Eukitt (Kindler, Freiburg, Alemania) de manera similar a como se procedía con el medio de montaje acuoso (Anexo 7).

Anticuerpos Dilución Proveedores		
Anticuerpos primarios	Dilución	Casa comercial
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-Islet1.	1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) (clon 40.2D6)
Anticuerpo policlonal de conejo anti-fosfohistona H3 (pHisH3).	1:200	Millipore (Ref. 06-570)
Anticuerpo policlonal de conejo anti-CR.	1:200	Swant (Ref. 7699-4)
Anticuerpo policlonal de cabra anti-catepsina D.	1:200	Santa Cruz Biotechnology, C-20, SC-6486
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-p21.	1:200	Abcam (Ref. ab109199)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -tubulina III.	1:200	SIGMA-ALDRICH (Ref. T8578)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-QH1.	1:200	(Navascués et al., 1995)
Anticuerpo policlonal de cabra anti-OMP.	1:100	Wako Chemicals, Neuss, Alemania (Ref. 544-10001/IUP1001)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-citokeratina 8 (CyK8).	1:50	Novusbio, Centennial, CO, USA (Ref. NB120-9287)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA.	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania (Ref. SC 56)
Anticuerpo policlonal de conejo anti-citokeratina 5 (CyK5).	1:200	BioLegend, San Diego, CA, USA (Ref.06-570)

Anticuerpo policlonal de conejo anti-GAP43.	1:200	Millipore, Darmstadt, Alemania (Ref. AB5220)
Anticuerpos secundarios	Dilución	Casa comercial
Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo, desarrollado en cabra.	1:200	Molecular Probes (Ref. A11008)
Alexa Fluor 488 anti-IgG de ratón, desarrollado en cabra.	1:200	Molecular Probes (Ref. A11029)
Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo, desarrollado en cabra.	1:200	Molecular Probes (Ref. A11037)
Alexa Fluor 568 anti-IgG de cabra, desarrollado en burro.	1:200	Molecular Probes (Ref. AB_2534104)
IgG Biotinilado anti-ratón de cabra.	1:200	Invitrogen, Madrid, España (Ref. 62-6540)
IgG Biotinilado anti-cabra de conejo.	1:200	Sigma-Aldrich (Ref. B 7014)

Tabla 1. Tabla que muestra los anticuerpos utilizados, las diluciones de cada uno de ellos y el proveedor donde fueron adquiridos. **Abreviaturas:** *IgG*, inmunoglobulina G; *Ref*, referencia.

7 Histoquímica con Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA).

Se llevó a cabo un análisis de la lectina DBA que tiene afinidad por residuos de azúcar N-acetil-D-galactosamina. Permite la identificación de subpoblaciones de neuronas diferenciadas en el epitelio olfatorio de ratón (Plendl and Schmahl, 1988). Al inicio los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS-T durante cinco minutos para después incubar con H₂O₂ al 3% para inactivar la peroxidasa endógena en PBS. A continuación, se hicieron dos lavados con PBS de cinco minutos y otro con PBS-G-T de diez minutos. Posteriormente se incubaron con PBS-G-T-Lis durante una hora, para después incubarse con DBA biotinilada durante 12 horas a TA. Al día siguiente, se realizaron dos lavados de diez minutos con PBS. Después, se incubó con Extravidin-peroxidasa (Sigma, SA-5004)

durante dos horas a TA (200µl porta). Se lavaron dos veces con PBS durante cinco minutos. Seguidamente, se reveló con DAB como se ha descrito con anterioridad. Una vez obtenido la coloración deseada se lavaron los portaobjetos tres veces durante cinco minutos para ser finalmente deshidratados y montados con Eukitt (Kindler, Freiburg, Alemania) (Anexo 8).

8 Tinción rojo neutro.

Esta tinción se lleva a cabo para detectar células en proceso de muerte. Se utilizó una placa de Petri de 35mm, a la cual se le añadió 2ml de PBS + 100µl de rojo neutro (R.N.). Las extremidades se embebieron en la placa y se incubaron a 37°C -38°C. Después de 20 minutos se revisa hasta conseguir la tinción deseada y, a continuación, se lava en PBS dos o tres veces. Posteriormente se fija con Formol/Cálcico (Formol 4% (100 ml) + 1gr de CaCl₂) toda la noche a 4°C. Para conseguir la diferenciación se dan dos pases de alcohol isopropílico (2-propanol) a 4°C (una hora cada uno). Su almacenado se hace mediante xilol a 4°C. La toma de imágenes se hace en el día, ya que el R.N. se pierde rápidamente (Anexo 9).

9 Histoquímica de TUNEL.

Las células apoptóticas se detectaron mediante la técnica histoquímica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*) (Gavrieli et al., 1992), utilizando el kit de detección de células *in situ* POD (Roche®). La técnica TUNEL es ampliamente utilizada por nuestro grupo para el análisis del proceso apoptótico en peces (Bejarano-Escobar et al., 2010, 2013), reptiles (Francisco-Morcillo et al., 2004), aves (Kawakami et al., 2003; Álvarez-Hernán et al., 2021a) y mamíferos (Rodríguez-Gallardo et al., 2005a; Bejarano-Escobar et al., 2011b). La realización de esta técnica ha sido desarrollada como se describe en Francisco-Morcillo et al., (2004). Brevemente, se comenzó sumergiendo los portaobjetos en PBS a 40°C durante 15 minutos para eliminar la gelatina y, a continuación, fueron lavados dos veces en PBS durante diez minutos a TA. Los tejidos fueron incubados diez minutos en 10µg/ml de proteinasa K en PBS a 21°C y se post-fijaron diez minutos con PFA 4%. Después de dos lavados en PBS las secciones fueron incubadas 15 minutos a TA en una solución de bloqueo (H₂O₂ 3%), para inactivar la peroxidasa endógena y después se lavó en PBS. Posteriormente, sobre las secciones se

añadió entre 65µl de solución mezcla de reacción de TUNEL, fueron cubiertas con *parafilm* para evitar la evaporación durante la incubación de 90 minutos en una cámara húmeda a 37°C. A continuación, los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS para después añadir 200µl a cada porta de anticuerpo anti-fluoresceína unido a peroxidasa y se cubrieron de nuevo con *parafilm* para la incubación a 37°C durante 30 minutos. Tras tres lavados en PBS se añadió una solución de DAB y se realizó en revelado y montaje como se ha comentado con anterioridad. En las secciones de control en las que se omitió la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) de la solución de reacción, no se observaron núcleos teñidos. Para de doble marcaje, la histoquímica β-gal-pH6 se realizó primero seguida de la técnica TUNEL (Anexo 9).

10 Secciones de resina.

Para hacer un mejor seguimiento del proceso de muerte en el sistema visual de aves, se han incluido secciones amablemente cedidas por el Dr. Gervasio Martín Partido, Catedrático del área de Biología Celular. Se trata de secciones semi-finas de resina, unas teñidas con azul de toluidina y otras con los colorantes azul de toluidina y safranina (Martín-Partido et al., 1986). En ambos casos, los cuerpos picnóticos originados durante el proceso apoptótico aparecen teñidos de un color azul intenso (Francisco-Morcillo et al., 2014).

11 Aplicación de moléculas mediante microesferas durante el desarrollo de las extremidades.

Para analizar como la distribución de la β-gal-pH6 era afectada por la sobreexpresión o inhibición de diferentes moléculas implicadas en el desarrollo de la extremidad, se decidió intervenir *in ovo* en embriones de pollo en el estadio HH28. Este estadio es óptimo puesto que a las pocas horas comienza a detectarse el inicio de la cascada apoptótica en el mismo. Se utiliza el tercer espacio interdigital de la extremidad inferior derecha ya que su acceso es más fácil para la experimentación al estar girado el embrión hacia su flanco derecho, dejando la extremidad izquierda como control. El huevo se abre por su parte roma y se accede al embrión realizando una pequeña abertura en el saco vitelino. En el espacio interdigital se realiza un pequeño corte poco profundo e introduce una microesfera que previamente ha sido embebida en la proteína o droga que se desea estudiar. Según la molécula de estudio se utilizan un tipo u otro de microesferas y la

concentración de la molécula varía dependiendo de su afinidad por la microesfera (Tabla 2). Una vez realizada la intervención, la parte abierta del huevo es cubierta con cinta adhesiva y se vuelve de nuevo a incubar. La incubación tuvo lugar desde las 8 horas hasta 48 horas, dependiendo de la molécula utilizada en el experimento. Alcanzado el tiempo de incubación necesario, los embriones eran extraídos de los huevos como se hace referencia en el apartado de obtención de embriones.

Molécula	Referencia	Concentración	Tipo de microesfera
FGF2	100-18B (Prepotech)	1mg/ml	Heparina (Sigma)
SU5402 (inhibidor de FGF)	SML0443 (Sigma)	4 mg/ml	AG1-X2 (Bio-rad)
CAS 853220-52- 7 (Agonista de Wnt)	681665 (Merck-Millipore)	10mg/ml	AG1-X2 (Bio-rad)
Antagonista de Wnt	681672 (Sigma- Aldrich)	2mg/ml	AG1-X2 (Bio-rad)
BMP4	120-05ET (Prepotech)	0.1mg/ml	Heparina (Sigma)
Noggin	120-10C (Prepotech)	1mg/ml	Heparina (Sigma)
TGF- β 1	100-21 (Prepotech)	50 μ g/ml	Affi-gel blue beads (Bio- rad)

Tabla 2. Moléculas utilizadas en los espacios interdigitales de embriones en HH28, su referencia, la concentración a las que fueron utilizadas y el tipo de microesfera necesaria para su uso.

12 Adquisición y procesamiento de las imágenes.

Para la observación de las secciones del sistema visual y de las extremidades de embriones de *G. gallus* se utilizó un fotomicroscopio Nikon Eclipse-80i equipado con microscopía de campo claro y con microscopía de fluorescencia, que permite la obtención de imágenes digitales gracias a la cámara Nikon DXM1200F que lleva acoplada al mismo y el programa informático de procesamiento de imágenes (ACE-1).

Las imágenes de embriones o extremidades *in toto* se obtuvieron a través de una lupa Nikon C-BD230 a la que estaba unida una cámara Nikon Digital Sight DS-Fi1 y utilizando el software NIS-Elements F 2.30.

El montaje de las imágenes obtenidas con distintos juegos de filtros de fluorescencia, con luz transmitida y en la lupa, se realizó con Adobe Photoshop CS4.

13 Análisis estadístico.

Se ha cuantificado los anchos de la banda de marcaje de β -gal-pH6 frente al del epitelio olfativo se utilizando ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/> consultado el 17 de diciembre de 2021, paquete de software (Versión 1.38). Para ello se analizaron un total de 20 imágenes seleccionadas al azar por espécimen (tres especímenes por etapa de desarrollo), se realizaron tres mediciones por corte en el eje apical-basal del epitelio a diferentes niveles del tabique nasal y cornetes y en diferentes regiones del extensión anteroposterior. Cada medida de ancho de la banda de etiquetado de β -gal-pH6 se dividió por el ancho del epitelio olfativo y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de aumento en el ancho de etiquetado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una muestra t de dos muestras asumiendo varianzas iguales, las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

CAPÍTULO 1:

Sistema visual de vertebrados.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Anatomía.

El ojo es el órgano fotorreceptor del sistema visual de los vertebrados superiores. A través de él se perciben estímulos luminosos procedentes del medio externo que son transformados en señales químicas que desencadenan impulsos nerviosos que serán interpretados por centro integradores del cerebro. El globo ocular es una estructura esférica donde se pueden distinguir distintas capas y estructuras (Edward and Kaufman, (2003):

- Esclerótica: Es la capa fibrosa externa del globo ocular. Se compone de haces de tejido conjuntivo y fibras elásticas que facilitan el mantenimiento de la forma del ojo. En su parte anterior se transparenta dando lugar a la córnea, estructura curva que constituye la principal lente del ojo.
- Coroides o úvea: Se encuentra subyacente a la esclerótica. Posee multitud de vasos sanguíneos y su función principal es nutrir a la retina. Está formada por el iris y el cuerpo ciliar anterior. El iris es una estructura pigmentada que se encuentra por detrás de la córnea y delante de una lente accesoria que es el cristalino (ver más adelante), determinando el color de ojos de un individuo. En su centro se encuentra la pupila que es un orificio circular por donde entra la luz. Su diámetro puede variar gracias a la musculatura de su esfínter, controlando así la cantidad de luz que entra en el ojo. Por otra parte, el cuerpo ciliar está formado por proceso ciliar que genera el humor acuoso, que da turgencia y ayuda a mantener la morfología de la parte anterior del ojo. Por otro lado, el músculo ciliar modifica la morfología del cristalino acomodando el proceso de la visión.

- Retina: Es la parte sensitiva del ojo y uno de los modelos tisulares incluidos en el presente estudio. Muestra una estructura compleja estratificada formada por distintos tipos celulares (ver más adelante). Su región central se denomina fovea central y dentro de ella se encuentra la foveola que es la región con mayor sensibilidad. En la foveola encontramos una alta densidad de conos (ver más adelante). Junto a la fovea se encuentra el punto ciego, que es el lugar donde confluyen todos los axones de las células ganglionares (ver más adelante) dando lugar al nervio óptico.
- Cristalino: Es una lente transparente biconvexa situada por detrás del iris y que está formado por laminillas concéntricas. Aparece anclado a los músculos ciliares y funciona como segunda lente por detrás de la córnea, permitiendo el ajuste fino del enfoque de la imagen sobre la retina.
- Finalmente, entre el cristalino y la retina se encuentra la cámara ocular de mayor tamaño, que está ocupada por el humor vítreo, de consistencia gelatinosa que ayuda al mantenimiento de la estructura ocular y a mantener la retina pegada a la coroides para evitar su desprendimiento (Cabrerizo et al., 2017).

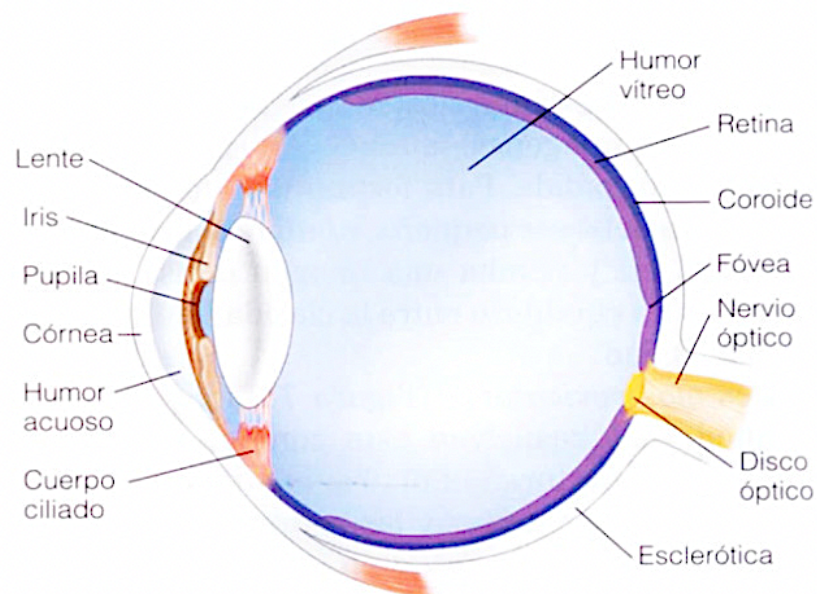


Figura 5. Esquema de las estructuras anatómicas que forman el ojo de los vertebrados. Tomado de Moyes, 2007.

2. Retina en vertebrados.

La retina, como se ha descrito con anterioridad, es la parte sensitiva del ojo. Su función principal es la de percibir los estímulos luminosos procedentes del medio externo. La luz atraviesa una serie de estructuras oculares (ver más arriba) antes de alcanzar la retina, y allí son transformados en señales químicas que viajan en forma de estímulo nervioso al cerebro, donde la información es procesada (Fig.5) (Moyes, 2007).

La retina supone un modelo excelente donde estudiar las interacciones entre diferentes tipos neuronales y sobre el que establecer inferencias para entender mejor las complejas conexiones que encontramos en el sistema nervioso central (SNC). Es un modelo recurrente, debido a que muestra una neuroanatomía bastante sencilla y conservada, y también debido a su accesibilidad (Fig.5).

2.1 Estructura de la retina.

La retina de vertebrados presenta una estructura estratificada muy definida y conservada (Fig.6). Los somas neuronales se localizan en las capas nucleares, mientras que sus prolongaciones (axones y dendritas) y las conexiones entre ellas se encuentran en las capas plexiformes (Moyes, 2007). Las capas dispuestas desde la región más externa (escleral) a la más interna (vítrea) son:

- **Epitelio pigmentario (EP):** Formado por una monocapa polarizada de células cuboideas pigmentadas. Se encuentra externa al epitelio neural y esta zona es la región en la que tienen lugar los cambios químicos provocados por la luz debido a que los segmentos externos de los fotorreceptores se adentran entre expansiones digitiformes, cargadas de abundantes vesículas de melanina, que emergen de estas células cuboideas del EP. Estos segmentos externos están en continua formación-destrucción desde el soma del fotorreceptor. El EP a su vez actúa absorbiendo el exceso de luz que los fotorreceptores no pueden procesar. Posee otras funciones tan importantes como el transporte de nutrientes, iones y agua, la eliminación del material de desecho acumulado al nivel de los fotorreceptores, la protección en contra de la fotooxidación, la secreción de factores esenciales para mantener la integridad estructural de la retina o la continua regeneración de los fotorreceptores gracias a su capacidad fagocítica.

- **Capa nuclear externa (CNE):** Formada por las células fotorreceptoras de luz, que en vertebrados se subdividen en conos y bastones, diferenciados por su morfología y función. Ambos presentan un segmento interno formado por el núcleo y la mayoría de los orgánulos, y un segmento externo especializado que se adentra entre las prolongaciones digitiformes de las células del EP. Los conos, con un segmento externo corto y cónico, presentan una serie de pigmentos denominados opsinas que captan luz a diferentes longitudes de onda y que están involucrados en la percepción de la visión en color, lo que se denomina visión fotópica. En cambio, los bastones disponen de un segmento externo largo y cilíndrico que contiene un pigmento denominado rodopsina, siendo los responsables de la visión escotópica, es decir, la que se da en baja intensidad lumínica. Debido a esta estructura compleja de los fotorreceptores, la CNE puede subdividirse en subcapa externa, en contacto con el EP, en el que se encuentra el segmento externo de los fotorreceptores. Por otra parte, la subcapa interna, donde se localiza el segmento interno de los fotorreceptores que alberga el núcleo y el citoplasma. Entre ambas subcapas se encuentra la MLE (Membrana Limitante Externa) formando una lámina continua constituida por los pies de las células de Müller (Fig.6). En ella, las células de Müller y fotorreceptores establecen uniones intercelulares de tipo adherente.
- **Capa Plexiforme Externa (CPE):** Constituida exclusivamente por prolongaciones neuronales (axones y dendritas). En esta región se establecen sinapsis entre fotorreceptores y células horizontales y bipolares (ver más adelante) (Fig.6).
- **Capa Nuclear Interna (CNI):** Se localizan los somas de diversos tipos de interneuronas. Desde la parte más externa a la más interna se encuentran: células horizontales, bipolares y amacrinas (Amini et al., 2018). Están implicadas en el transporte y la modulación de la información procedente de los fotorreceptores. Además de estas interneuronas, también se encuentran presentes los somas de células de Müller, que son consideradas como un tipo de glía radial (Reichenbach and Bringmann, 2013). En algunas ocasiones también se pueden encontrar células ganglionares desplazadas en la región más interna de esta capa.

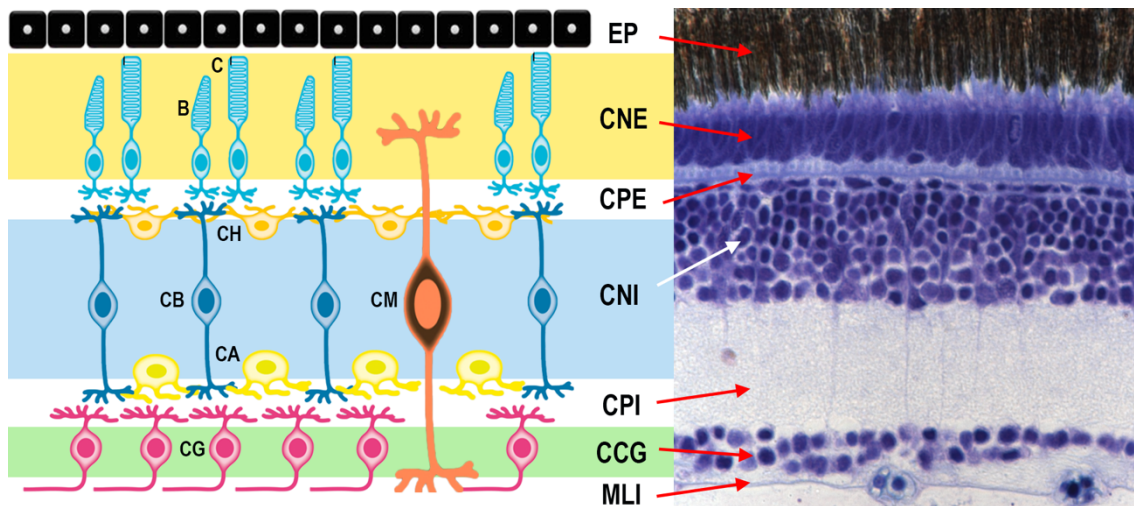


Figura 6. Esquema y sección histológica semifina teñida con azul de toluidina. Se muestran las capas y tipos celulares característicos de la retina de vertebrados. Desde la capa más externa a la más interna podemos encontrar: fotorreceptores, conos (C) y bastones (B), células horizontales (CH), células de Müller (CM), células bipolares (CB), células amacrinas (CA) y células ganglionares (CG). **Abreviaturas:** CCG, capa de células ganglionares; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna; EP, epitelio pigmentario; MLE, membrana limitante externa; MLI, membrana limitante interna.

- **Capa plexiforme interna (CPI):** Carece de somas neuronales. En esta región se establecen las sinapsis entre los axones de bipolares y amacrinas y las dendritas de las células ganglionares (Fig.6) (Amini et al., 2018).
- **Capa de células ganglionares (CCG):** En ella se encuentran los somas de las células ganglionares, capa donde también es posible encontrar células amacrinas desplazadas de forma ocasional (Fig.6) (Kolb et al., 2001). Las células ganglionares captan la información modulada por las interneuronas de la CNI (Nguyen-ba-charvet and Rebsam, 2020).
- **Estrato de fibras ópticas (EFO):** Es la capa más interna de la retina. Está formada por los axones de las células ganglionares que se asocian para abandonar la retina formando el nervio óptico. Estos axones cruzan al lado contralateral en el quiasma óptico y, por los tractos ópticos se dirigen a centros integradores del cerebro. La región de esta capa que está en contacto con el vítreo se encuentra

tapizada por una superficie continua constituida por los pies de las células de Müller, conformando la MLI (Reichenbach and Bringmann, 2013). En ella se establece contacto entre los pies de las células de Müller y los elementos que forman parte de la membrana basal, que actúan aislando a la retina neural del humor vítreo, creando así una barrera selectiva para los metabolitos que van a difundir entre ambas estructuras (Moyes, 2007).

Dentro de los diferentes tipos celulares descritos en la retina neural se han identificado a su vez distintas subpoblaciones de cada uno que atienden a criterios funcionales, moleculares o morfológicos (Nguyen-ba-charvet and Rebsam, 2020). Junto a los tipos celulares descritos, en la retina se pueden encontrar otros tipos celulares que no derivan del neuroepitelio de la retina neural presuntiva (ver más adelante). Proceden de diferentes regiones del embrión y, por un proceso de migración, se van introduciendo en la retina conforme avanza el desarrollo. Entre estos tipos celulares accesorios destacamos la microglía, los astrocitos y los oligodendrocitos (O'Koren et al., 2019; Prinz et al., 2019).

3. Desarrollo del sistema visual.

La retina es una estructura que deriva ontogenéticamente del SNC. La primera evidencia morfológica apreciada durante el desarrollo del sistema visual de los vertebrados, son dos evaginaciones laterales del prosencéfalo, ubicadas en el límite entre diencéfalo y telencéfalo, conocidas como vesículas ópticas (Fig.7 A, 8 A), que van a contactar con el ectodermo cefálico (Heavner and Pevny, 2012). En la zona de contacto, el ectodermo induce la formación de la placoda del cristalino (Fig.7 A, 8 B). Posteriormente, las vesículas ópticas sufren una segunda invaginación en su superficie distal para formar las copas ópticas (Fig.7 B, 8 B). Al mismo tiempo, la placoda del cristalino también se invagina, formando así, la vesícula del cristalino (Fig.7C). El progreso de invaginación de las vesículas ópticas continúa hasta que la hoja distal contacta con el epitelio proximal, de tal forma que la luz que existía entre ambas hojas de tejido desaparece. La hoja de tejido situada más internamente dará lugar a la retina neural mientras que las células epiteliales de la capa más externa adquieren morfología cuboidea, se pigmentan mediante la síntesis de melanina y constituyen el EP (Fig.7 D, 8 C). La vesícula y la copa ópticas permanecen unidas por el tallo óptico al encéfalo. Una vez que el tallo óptico es

invadido por los axones de las células ganglionares, entonces pasa a denominarse nervio óptico (Adler and Canto-Soler, 2007).

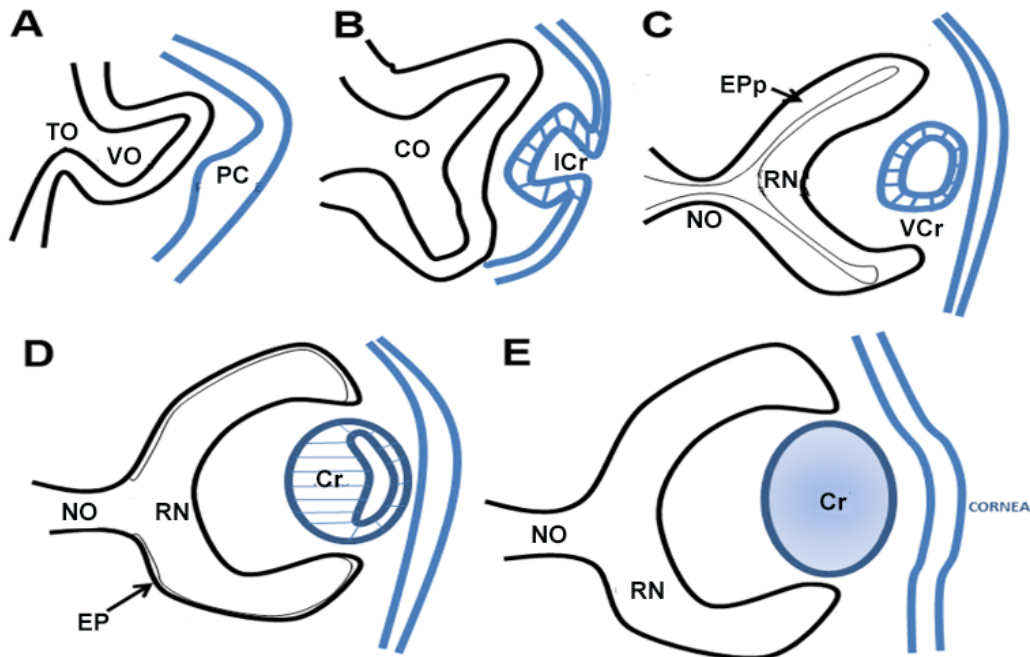


Figura 7. Dibujos esquemáticos del desarrollo del ojo de vertebrados (A-F) y del proceso de retinogénesis (G, H). **A:** La vesícula óptica se forma como una evaginación del diencefalo. El ectodermo superficial que recubre la vesícula óptica se puede ver como una placoda del cristalino engrosada. **B:** La vesícula óptica comienza la invaginación para dar lugar a la copa óptica. **C:** La invaginación progresa y las dos capas que van a formar la copa óptica se aproximan. **D:** La copa óptica da origen a la retina neural presuntiva, al epitelio pigmentario presuntivo, y al tallo óptico. **E:** Ojo maduro. El tallo óptico da lugar al nervio óptico cuando los axones ópticos invaden esta estructura. Adaptado de Bejarano-Escobar y cols. (2014). **Abreviaturas:** TO, tallo óptico; VO, vesícula óptica; PC, placoda del cristalino; CO, copa óptica; ICr, invaginación del cristalino; Epp: epitelio pigmentario presuntivo; NO, nervio óptico; RN, retina neural; VCr, vesícula del cristalino; EP, epitelio pigmentario; Cr, cristalino.

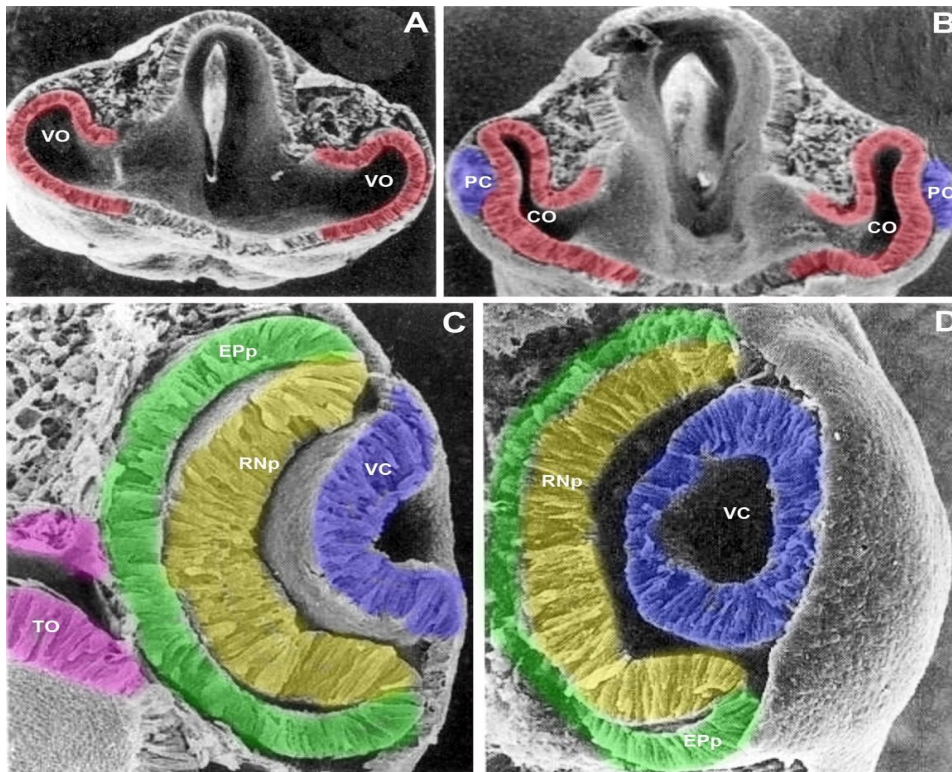


Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica del desarrollo del ojo en vertebrados. **A:** Las vesículas ópticas se forman a partir de dos evaginaciones del diencéfalo. **B:** Las vesículas ópticas inician la invaginación para formar las copas ópticas. El ectodermo superficial que cubre la vesícula óptica forma un engrosamiento viéndose como una placoda. **C:** Las copas ópticas han dado lugar a la retina neural presuntiva, al epitelio presuntivo y al tallo óptico. **D:** La VC se ha cerrado por completo, mientras que la capa retina neural presuntiva y el epitelio presuntivo aún siguen inmaduros. Figura adaptada de Gilbert 7ª Edición. **Abreviaturas:** VO, vesícula óptica; PC, placoda del cristalino; CO, copa óptica; EPp: epitelio pigmentario presuntivo; RNp: retina neuronal presuntiva; VC, vesícula del cristalino; TO, tallo óptico.

3.1 Retinogénesis.

La hoja interna de la copa óptica está compuesta por las denominadas células neuroepiteliales que sufren un proceso de diferenciación que concluye con la formación de la mayor parte de los distintos tipos celulares presentes en la retina neural (Fig.9). Las células neuroepiteliales son consideradas las células madre de la retina al ser multipotentes y proliferativas. Son células que se disponen en forma de epitelio pseudoestratificado, contactando por sus dos extremos con las superficies vítrea y escleral. Su núcleo está en continuo movimiento, transitando desde la región escleral (apical) hasta la región vítrea (basal) de la célula (Fig.9). Resulta llamativo que, el ciclo celular está vinculado a dicho movimiento, lo que se denomina migración nuclear intercinética. Así, cuando el núcleo transita desde la región apical a la basal, la célula se encuentra en la fase G1. Al llegar a la región basal, se produce la fase S, adentrándose en G2 en el traslado nuevamente hasta la región apical (Fig.9). Una vez que llega el núcleo a esta región, la célula se adentra en mitosis (Baye and Link, 2007; Heavner and Pevny, 2012). Durante los estadios iniciales del desarrollo, estas mitosis son simétricas, es decir, generan dos células neuroepiteliales.

En estadios más avanzados, comienza el proceso de diferenciación celular, produciéndose mitosis asimétricas, generando una célula neuroepitelial, que se mantiene en ciclo y continúa como célula progenitora, y un neuroblasto migratorio ya determinado a generar un tipo celular determinado (Nagashima et al., 2013). Este último utiliza a la propia célula neuroepitelial para desplazarse hasta su ubicación definitiva. Todo este proceso de retinogénesis debe estar altamente coordinado por factores yuxtacrinos y paracrinos, y factores de transcripción que dirijan los procesos de proliferación, migración y diferenciación. La expresión de estos factores externos e internos está altamente regulada y orquestada a lo largo del desarrollo embrionario (Nguyen-ba-charvet and Rebsam, 2020).

El proceso de retinogénesis ocurre en forma de gradientes que se extienden desde una región determinada de la retina hacia el resto del tejido. El primer gradiente descrito y más evidente es el gradiente de diferenciación centro-periférico. (Álvarez-Hernán et al., (2013), (2018), (2020), (2021); Bejarano-Escobar et al., (2009), (2010); Ruth Bejarano-Escobar et al., (2012); Candal et al., (2005), (2008); Francisco-Morcillo et al., (2006);

Pavón-Muñoz et al., (2016); Prada et al., (1991); Vecino et al., (1993). Esto implica que las regiones centrales de la retina van a diferenciarse antes que aquellas de la periferia. Podemos así encontrar en estadios de desarrollo intermedios una región central con estructura multilaminar de las capas descritas anteriormente, mientras que en la periferia aún muestra histología de capa neuroblástica que va generando células diferenciadas en forma de anillos concéntricos.

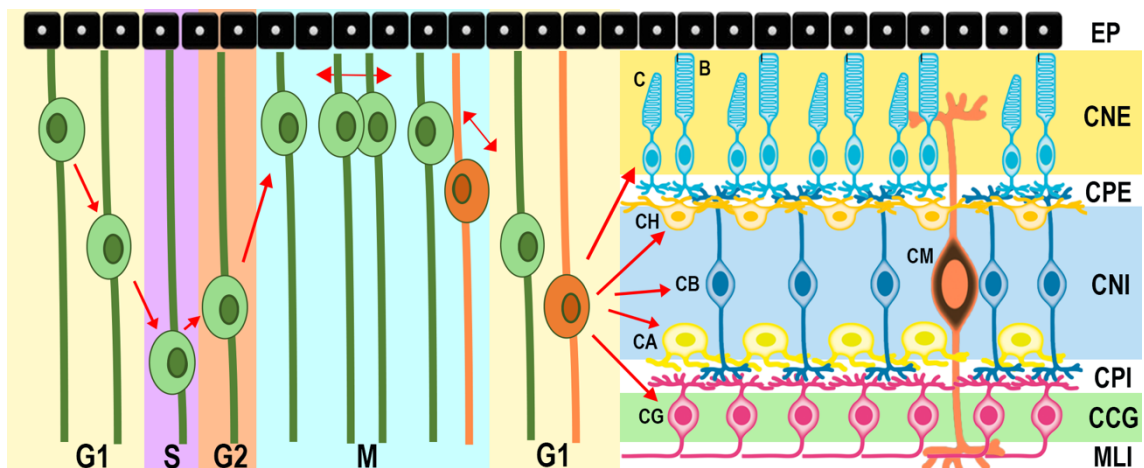


Figura 9. Proceso de retinogénesis en vertebrados. Las células neuroepiteliales de la retina neural presuntiva sufren migración nuclear intercinética desde la región vítrea (fase S) a la ventricular (fase M). Al salir del ciclo, las células neuroepiteliales se diferencian, localizándose en las distintas capas de la retina según su destino. Las primeras células que se diferencian son las ganglionares y las últimas las células bipolares y las de Müller.
Abreviaturas: EP, epitelio pigmentario de la retina; CA, células amacrinas; CB, células bipolares; CCG, capa de células ganglionares; CG, células ganglionares; CH, células horizontales; CM, células de Müller; C, conos; B, bastones; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna; MLI: membrana limitante interna.

También se aprecia a un patrón dorso-ventral y otro temporo-nasal, es decir, las regiones dorsales y temporales de la retina presentan un patrón de neurogénesis e histogénesis más adelantado que las regiones ventral y nasal, respectivamente (Holt et al., 1988; Prada et al., 1991; Reese et al., 1996; Francisco-Morcillo et al., 2006). Por último, algunos autores identifican un cuarto gradiente vítreo-escleral en la histogénesis y diferenciación celular retiniana en algunas especies de peces (Bejarano-Escobar et al., 2012b), aves (Drenhaus et al., 2007); (Álvarez-Hernán et al., 2018a, 2020a) y mamíferos (Young, 1985; Reese et al., 1996; Rapaport et al., 2004).

Por otra parte, el orden cronológico de esta diferenciación celular se encuentra bastante conservado en la filogenia de vertebrados (Prada et al., 1991; Rapaport et al., 2004; Francisco-Morcillo et al., 2006; Bejarano-Escobar et al., 2009, 2011a; Giudice et al., 2019). Así, las células ganglionares son las primeras en diferenciarse, seguidas de las amacrinas, horizontales y conos. En una última oleada se diferenciarían las células bipolares, bastones y finalmente, las células de Müller (Xiang and Li, 2013) (Fig. 10). No obstante, este orden que es el más conservado en vertebrados, puede verse ligeramente alterado, como se ha demostrado en algunas especies de condriictios (Harahush et al., 2009; Ferreiro-Galve et al., 2010b; Bejarano-Escobar et al., 2012a; Amini et al., 2018).

1. La retina como modelo de estudio de la muerte celular ontogenética y la senescencia celular.

Concomitante al proceso de diferenciación en la retina de vertebrados, se han descrito diferentes oleadas de muerte celular que ocurren en determinados intervalos de tiempo y coincidiendo con determinados eventos morfogénéticos (Francisco-Morcillo et al., 2014). Así, una primera oleada de muerte celular denominada morfogénética afecta a células situadas en estructuras que están sometidas a importantes cambios morfológicos como la fisura óptica, la copa óptica, el tallo óptico o el tejido afectado por la separación de la vesícula del cristalino desde el ectodermo, al igual que se ha descrito en peces (Bejarano-Escobar et al., 2013), aves (Martín-Partido et al., 1988; Esteve et al., 2001) y mamíferos (Esteve et al., 2001; Rodríguez-Gallardo et al., 2005b; Nishitani and Sasaki, 2006).

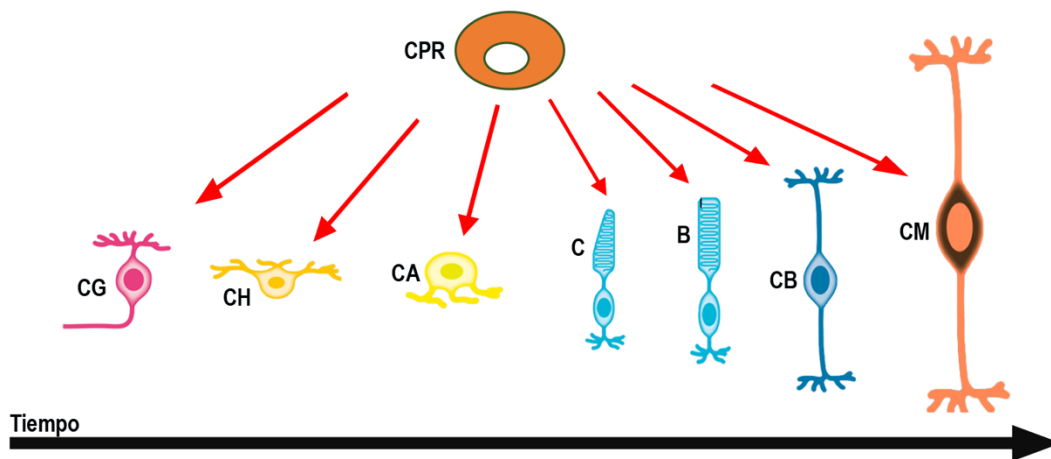


Figura 10. Se muestra el orden de diferenciación de los diferentes tipos celulares de la retina en formación. Las células ganglionares son las primeras en diferenciarse, seguidas de las amacrinas, horizontales y conos. En la última oleada de diferenciación aparecen las células bipolares, bastones y células de Müller. Adaptado de Xiang, (2013). **Abreviaturas:** CPR: *Célula progenitora retiniana*.

Una segunda oleada de muerte celular denominada muerte celular temprana, afectaría a los primeros neuroblastos migratorios que se están diferenciando en la retina neural presuntiva, con el fin de crear espacios por los que puedan avanzar los primeros axones de las células ganglionares recién diferenciadas en su camino al tallo óptico. Tiene una notable incidencia en la retina de aves (Martín-Partido et al., 1988; Mayordomo et al., 2003; Chavarría et al., 2007, 2013) y descrita en menor medida en retina de peces (Bejarano-Escobar et al., 2013) y mamíferos (Péquignot et al., 2003). Por último, la tercera oleada es la denominada muerte celular neurotrófica, quizás la que afecta a un mayor número de neuronas y la que más se prolonga en el tiempo. Tiene lugar durante el periodo de sinaptogénesis y afecta a aquellas células que no establecen contacto con células diana. Se ha descrito esta oleada en todos los vertebrados estudiados (Cook et al., 1998; Marín-Teva et al., 1999b; Biehlmaier et al., 2001; Hutson and Bothwell, 2001; Péquignot et al., 2003; Francisco-Morcillo et al., 2004, 2006; Candal et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2013), demostrándose en todos ellos que la frecuencia y la distribución de las células apoptóticas en la retina de aves siguen unos patrones muy establecidos y su incidencia transcurre en una determinada ventana de tiempo.

Todos los desechos celulares originados en la retina durante este proceso degenerativo son retirados por fagocitosis, siendo el proceso que muchos autores consideran como el último estadio de la muerte celular. La fagocitosis es realizada por fagocitos no especializados y fagocitos especializados (Marín-Teva et al., 2004; Francisco-Morcillo et al., 2014). Los no especializados son células estáticas que no realizan ningún tipo de migración hasta el foco de muerte y que, por tanto, se encuentran en regiones adyacentes. En el caso de la retina indiferenciada destacamos las células neuroepiteliales (García-Porrero and Ojeda, 1979; Martín-Partido et al., 1988; Navascués and Martín-Partido, 1990; Mellén et al., 2008) mientras que en el caso de la retina estratificada esta función es realizada por las células de Müller (Egensperger et al., 1996; Francisco-Morcillo et al., 2004; Bejarano-Escobar et al., 2012a, 2013). Por su parte, los fagocitos especializados inicialmente son macrófagos que penetran en el sistema visual en estadios iniciales del desarrollo (Navascués and Martín-Partido, 1990; Rodríguez-Gallardo et al., 2005b; Bejarano-Escobar et al., 2011c). En una segunda oleada, ya en estadios más avanzados de diferenciación retiniana, precursores microgliales se adentran en la retina para colonizarla y diferenciarse a células de la microglía (Marín-Teva et al., 1999a; Bejarano-Escobar et al., 2013). Los fagocitos especializados suelen tener una coincidencia temporo-espacial con el proceso de muerte celular, lo que sugiere una posible implicación de la muerte celular en la quimiotaxis de estos tipos celulares (Egensperger et al., 1996; Knabe et al., 2000; Santos et al., 2008; Bejarano-Escobar et al., 2013). Sin embargo, en algunas especies, la colonización de la microglía ocurre una vez que el fenómeno apoptótico ha concluido (Marín-Teva et al., 1999a; Bejarano-Escobar et al., 2013). Es por ello que en el sistema visual en desarrollo no siempre está clara la posible relación entre el proceso degenerativo y la llegada de fagocitos especializados.

Por el contrario, el proceso de senescencia celular en la retina ha sido poco caracterizado. Gracias a la histoquímica de la β -gal-pH6, se ha comprobado que el EP presenta alta actividad enzimática en la retina adulta de rata (Lamoke et al., 2015) y primates (Mishima et al., 1999), incluido el hombre (Hjelmeland, 1999; Matsunaga et al., 1999). De hecho, algunas patologías oculares vienen vinculadas a procesos de senescencia en el epitelio pigmentario (Kozlowski, 2012). La misma actividad enzimática

se ha comprobado que está aumentada en vasos retinianos, principalmente en las células endoteliales y en las células musculares lisas que se encuentran en la pared de los mismos (Lamoke et al., 2015; López-Luppo et al., 2017). En lo que respecta a su expresión en el tejido neural de la retina, la actividad β -gal-pH6 se detecta en células ganglionares en la retina en desarrollo de ratón, al igual que en algunas neuronas dispersas por la CNI (Oubaha et al., 2016). De la misma forma, si la presión intraocular se incrementa en individuos adultos, el número de células ganglionares que expresan esta enzima se incrementa (Li et al., 2017). También se ha comprobado que, en retinopatías vinculadas a la diabetes, diversos tipos neuronales entran en senescencia (Sapieha and Mallette, 2018). De este modo, se ha demostrado que las neuronas de la retina se adentran en senescencia en determinadas patologías, y que el epitelio pigmentario tiene también elevada actividad β -gal-pH6, pero no existen estudios en los que se describa el proceso de senescencia celular durante el desarrollo embrionario. Además, debido a que durante la ontogenia se ha comprobado que la muerte celular y la senescencia están fuertemente vinculadas en estructuras como el mesonefros, la extremidad y el corazón (Nacher et al., 2006; Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015a, 2019; Davaapil et al., 2017; Villiard et al., 2017) incluyendo órganos de los sentidos como el oído interno (Gibaja et al., 2019; Magariños et al., 2020), resulta tremendamente interesante comprobar si el fenómeno apoptótico y la senescencia guardan relación durante la retinogénesis e histogénesis retinianas.

OBJETIVOS CAPÍTULO 1.

II. OBJETIVOS Capítulo 1.

1. Investigar la presencia de senescencia celular mediante el uso de tinción para la actividad de β -gal-pH6 durante el desarrollo de la retina aviar.
2. Identificar las poblaciones de células que exhiben altos niveles de actividad de β -gal-pH6.
3. Estudiar si β -gal-pH6 se correlaciona con la progresión de la muerte celular en la retina en desarrollo.

RESULTADOS CAPÍTULO 1.

III. RESULTADOS Capítulo 1.

1. Retina no estratificada.

En las secciones de retinas de *G. gallus* de HH18, de orientación paralela al plano dorsoventral a nivel del nervio óptico (Fig. 11 A-D), se observó que la actividad β -gal-pH6 se localiza en las regiones vítrea y escleral de la capa neuroblástica (CNb) (Fig. 11 A, C). La señal en la región escleral fue más intensa en regiones periféricas de la retina (Fig.11A). También se apreció señal histoquímica en el cristalino (Fig.11A). En secciones de retina adyacentes a la salida del nervio óptico, bien pertenecientes a la región nasal (no mostrados) o a la temporal (Fig. 11 E-H), se detectó el marcaje histoquímico escleral, pero no el observado con anterioridad en la región vítrea (Fig. 11 E, G). Adicionalmente, el epitelio pigmentario presuntivo de la retina (EPp) también se mostró débilmente teñido con β -gal-pH6 (Fig. 11 A, C, E, G).

En células de mamífero se ha descrito que la actividad β -gal-pH6 corresponde a la actividad enzimática de la β -gal-pH6 que se encuentra en los lisosomas (Lee et al., 2006). Para comprobar si en la retina en desarrollo de aves también hay un paralelismo entre la actividad β -gal-pH6 y la distribución de los lisosomas en las células del tejido, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos frente catepsina D (CatD), una enzima que identifica la distribución de estos orgánulos en la retina de vertebrados en desarrollo (Bejarano-Escobar et al., 2011c, 2011a). Así, encontramos que el patrón de la tinción histoquímica β -gal-pH6 se correlaciona fuertemente con la presencia de lisosomas en la CNb de la retina central (Fig. 11 I-K).

El siguiente paso fue caracterizar las células que presentaban esta intensa actividad β -gal-pH6 en estadios tempranos de diferenciación retiniana. Algunos trabajos han descrito una actividad intensa de β -gal-pH6 en células apoptóticas durante el desarrollo embrionario (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015a). La presencia de células apoptóticas ha sido descrita en los tejidos de la retina de *G. gallus* alrededor del nervio óptico en el estadio HH18 (Martín-Partido et al., 1988; Francisco-Morcillo et al., 2014). De hecho, en esta misma región, se detectaron núcleos picnóticos dispersos al emplear la tinción con DAPI (Fig.11D) y la técnica de azul de toluidina/safranina (Fig. 12 A, B). El patrón tan disperso de estos cuerpos picnóticos,

comparado con el marcaje continuo de la actividad β -gal-pH6, nos lleva a pensar que esta actividad enzimática no se correlaciona con el fenómeno apoptótico, al menos en estos estadios iniciales del desarrollo.

A continuación, se comprobó si la actividad β -gal-pH6 está vinculada con el proceso de diferenciación celular. TUJ-1 e Isl1 han sido descritos como excelentes marcadores tempranos de diferenciación neuronal en la retina de aves (Snow and Robson, 1994, 1995; Bejarano-Escobar et al., 2015). En el estadio HH18, una débil señal histoquímica fue observada en la CCG presuntiva, colocalizándose con la inmunoreactividad frente a TUJ-1 en neuronas recién diferenciadas (Fig. 12 C-D). En este mismo estadio y en la misma región también detectamos núcleos Isl1-inmunorreactivos (Fig. 12 E, F). En lo que respecta al marcaje escleral, en esta región se concentraron abundantes figuras mitóticas pHisH3 inmunorreactivas (Fig. 12 G-I).

En el estadio HH21, la intensidad de la tinción de β -gal-pH6 se incrementó en las regiones vítreas y esclerales de la CNb en las regiones central y centro-periféricas de la retina (Fig. 13 A, C). En este estadio nos planteamos comprobar si la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 podría coincidir con la distribución de otros marcadores de senescencia conocidos, tales como p21 (inhibidor de ciclina dependiente de quinasas) y p53 (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015a). Así, en secciones doblemente marcadas, se encontró que el patrón de marcaje histoquímico de la β -gal-pH6 se correlacionó fuertemente con la inmunoreactividad frente a p21 en la retina central (Fig. 13 C, D). Sin embargo, no se detectó ningún tipo de inmunoreactividad frente a p53 en este estadio (no mostrado). Si se atiende al marcaje histoquímico frente a β -gal-pH6 en la región periférica, este se intensificó en la región más periférica de la retina (Fig. 13E) y en el Epp (Fig. 13 A, C, E). En el caso de la fisura óptica, se comprobó que el marcaje era similar al descrito en la región central de la retina y que había abundante mesénquima en su interior, en el que de manera ocasional se detectó alguna célula esférica positiva frente a β -gal-pH6 (Fig. 13 G, H).

En el estadio HH21, se detectaron abundantes núcleos picnóticos alrededor de la cabeza del nervio óptico (Fig. 14 A, B), lugar donde no se encontró una señal histoquímica más intensa frente a β -gal-pH6. En este estadio, el marcaje histoquímico siguió correlacionándose con la presencia de abundantes mitosis pHisH3 inmunorreactivas en

la mitad escleral de la retina (Fig. 14 C, D), y con diferentes marcadores de diferenciación en la región vítrea, como Isl1 (Fig.14E) y calretinina (CR) (Fig.14F), proteína de unión a calcio que se localiza en células ganglionares en estos estadios de desarrollo (Ellis et al., 1991). Los resultados descritos hasta el momento muestran que en estos estadios tempranos (HH18-HH21) en los que la retina neural de *G. gallus* está constituida por una CNb, la actividad β -gal-pH6 detectada coincide con la distribución de lisosomas y, además, con la localización de abundantes figuras mitóticas en la superficie escleral y con células recién diferenciadas en la región vítrea. Por otra parte, el EP también presenta marcaje.

En el estadio HH29 la señal histoquímica de la β -gal-pH6 en la región escleral fue menos intensa (Fig. 15 A, C) a pesar de que las figuras mitóticas inmunorreactivas frente a pHisH3 seguían siendo abundantes (Fig.15B). Por el contrario, el marcaje de la región vítrea se intensificó (Fig. 15 A, C), detectándose en la misma región un mayor número de elementos celulares inmunorreactivos frente a los marcadores de diferenciación empleados, es decir, Tuj1, Isl1 y CR (Fig. 15 D-F). En la parte más periférica de la retina la señal de β -gal-pH6 solo se detectó en la mitad escleral de la CNb (Fig.15G). En este estadio, a pesar de que el EP presentó una mayor pigmentación, se apreció una intensa señal frente a β -gal-pH6 en el mismo (Fig.15I).

2. Retina estratificada.

En el estadio HH36, tanto en la CPI como en la CPE son claramente visibles en la retina en desarrollo de pollo (Drenhaus et al., 2007) (Fig. 16 B, E). La actividad β -gal-pH6 se detecta principalmente en la CCG y en la capa de células amacrinas (Fig. 16 A, D, I), aunque también se observó un marcaje más tenue en la capa de células horizontales (Fig. 16 A, D, I). En este estadio, el patrón de marcaje de β -gal-pH6 y la inmunoreactividad frente a p21 fueron plenamente coincidentes (Fig.16C). Por otro lado, las células positivas para la actividad β -gal-pH6 presentaron un fenotipo plenamente diferenciado y distintas subpoblaciones fueron marcadas con anticuerpos frente a TUJ1 (Fig.16F), Isl1 (Fig.16G) y CR (Fig.16H). De nuevo, la retina estratificada no mostró inmunoreactividad frente a p53 (no mostrado).

Debido a que ha sido descrito que la muerte celular neurotrófica es intensa entre HH36 y HH40 en la retina de pollo en desarrollo (Cook et al., 1998), creímos conveniente realizar técnicas de doble marcaje para comprobar si existe una correlación entre la senescencia y la muerte celular ontogenética. Así, en HH36 se detectaron núcleos TUNEL positivos mayoritariamente en la CCG y en la mitad interna de la CNI (Fig.16I). En lo que respecta a la retina periférica, la señal histoquímica de la β -gal-pH6 se hace especialmente intensa en la región vítrea de la CNb, lugar donde se aprecian abundantes células ganglionares inmunorreactivas frente a Isl1 (Fig. 17 A-E). Por su parte, el marcaje histoquímico escleral frente a β -gal-pH6 siguió siendo intenso en este estadio (Fig.17A). Además, una densa banda β -gal-pH6 positiva fue observada en la CNE (Fig.17F) y en las células del EP (Fig.17F).

En el estadio HH39, la señal de la tinción histoquímica se intensifica en la CCG, la capa de células amacrinas y la capa de células horizontales (Fig. 18 A, B). En este estadio, la muerte celular fue intensa en la CNI, afectando mayoritariamente a las células amacrinas y bipolares, aunque también se detectó de forma esporádica en la CCG (Fig.18C).

En el estadio HH41, la intensidad de marcaje de la β -gal-pH6 fue heterogénea en las diferentes subcapas y que no todas las células ganglionares, amacrinas y horizontales se tiñeron con la técnica histoquímica, tanto en la retina central (Fig. 18 D, E) como la retina periférica (Fig. 18 F, G). Un patrón de marcaje similar se observó en el día de la eclosión (HH46, día postnatal 0, P0) (Fig.18H). A pesar de que en estadios anteriores el marcaje β -gal-pH6 de la CNE aparecía enmascarado por el EP, en este estadio pudo comprobarse una fuerte señal en esta capa (Fig.18H).

Finalmente, para comprobar si este patrón de marcaje se muestra conservado en la retina en desarrollo de diferentes especies de ave, se decidió realizar la histoquímica de β -gal-pH6 en tejido de pinzón cebra (*Taenopygia guttata*), un ave altricial que hemos utilizado como modelo de estudio en nuestro laboratorio (Álvarez-Hernán 2021, Tesis Doctoral). Utilizando las tablas de desarrollo descritas por Murray et al. (2013) para esta especie, elegimos dos estadios diferentes: el estadio 34, en el que la retina está compuesta por una CNb y el estadio 43, en el son identificables los diferentes estratos de la retina (Álvarez-Hernán et al., 2018b, 2020b, 2022b). Un débil marcaje se detectó

en las dos bandas localizadas cercanas a las superficies vítrea y escleral en la retina central del estadio 34 (Fig. 19 A, B). En el caso de la región periférica, la señal de la β -gal-pH6 se localizó principalmente en la región escleral (Fig. 19 C, D). En el estadio 43 una fuerte señal histoquímica β -gal-pH6 se detectó tanto en la CCG como en la capa de células horizontales coincidiendo en gran medida con el marcador p21 (Fig. 19 E-G), mientras que la capa de células amacrinas presentó un marcaje más débil en el estadio 43 (Fig.19F). En P7, el marcaje de β -gal-pH6 sigue el mismo patrón anterior, pero con mayor intensidad al igual que el detectado con p21 (Fig. 19 H-J). De igual manera, existe una correlación entre las células positivas para esta técnica histoquímica y las células apoptóticas detectadas en la retina en desarrollo en esta especie (no mostrado).

Por tanto, se puede concluir que la actividad β -gal-pH6 presenta un patrón de marcaje bastante similar durante el desarrollo de la retina de diferentes especies de aves. Además, parece que su distribución se correlaciona con la localización de los lisosomas en las células y, en los primeros estadios de la retinogénesis, parece vinculada al proceso de diferenciación neuronal. En estadios más avanzados se localiza principalmente en las capas de células ganglionares, amacrinas y horizontales, y también en la capa de los fotorreceptores y en el EP. Por otra parte, el marcaje histoquímico parece que no se correlaciona con la distribución de células apoptóticas en la retina en desarrollo.

FIGURAS CAPÍTULO 1.

Figura 11. Distribución de la actividad β -gal-pH6 y de lisosomas en la retina de *G. gallus* en el estadio HH18. Criosecciones obtenidas en el plano sagital del ojo, a nivel de la cabeza del nervio óptico (A-D; I-K) y de regiones más temporales (E-H), fueron tratadas con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 (A-H) o con anticuerpos frente a CatD (I-K). La tinción DAPI mostró que la retina neural estaba compuesta por una CNb (B, D, F, H, I, K), y la existencia de núcleos picnóticos (doble cabezas de flechas en D). La tinción β -gal-pH6 fue detectada en las regiones escleral (flechas en A, C, E, G) y vítrea (cabezas de flechas en A, C) de la retina. También se detectó un débil marcaje en el EP (asteriscos en C, G). La inmunoreactividad frente a CatD se distribuyó principalmente en la superficie escleral (flechas en J, K) y en la vítrea (cabezas de flechas en J, K) de la CNb. **Abreviaturas:** *CatD*, catepsina D; *Cr*, cristalino; *CNb*, capa neuroblástica; *NO*, nervio óptico; *Epp*, epitelio pigmentario presuntivo. Barras de escala: 100 μ m (A, B, E, F); 50 μ m (C, D, G, H, I-K).

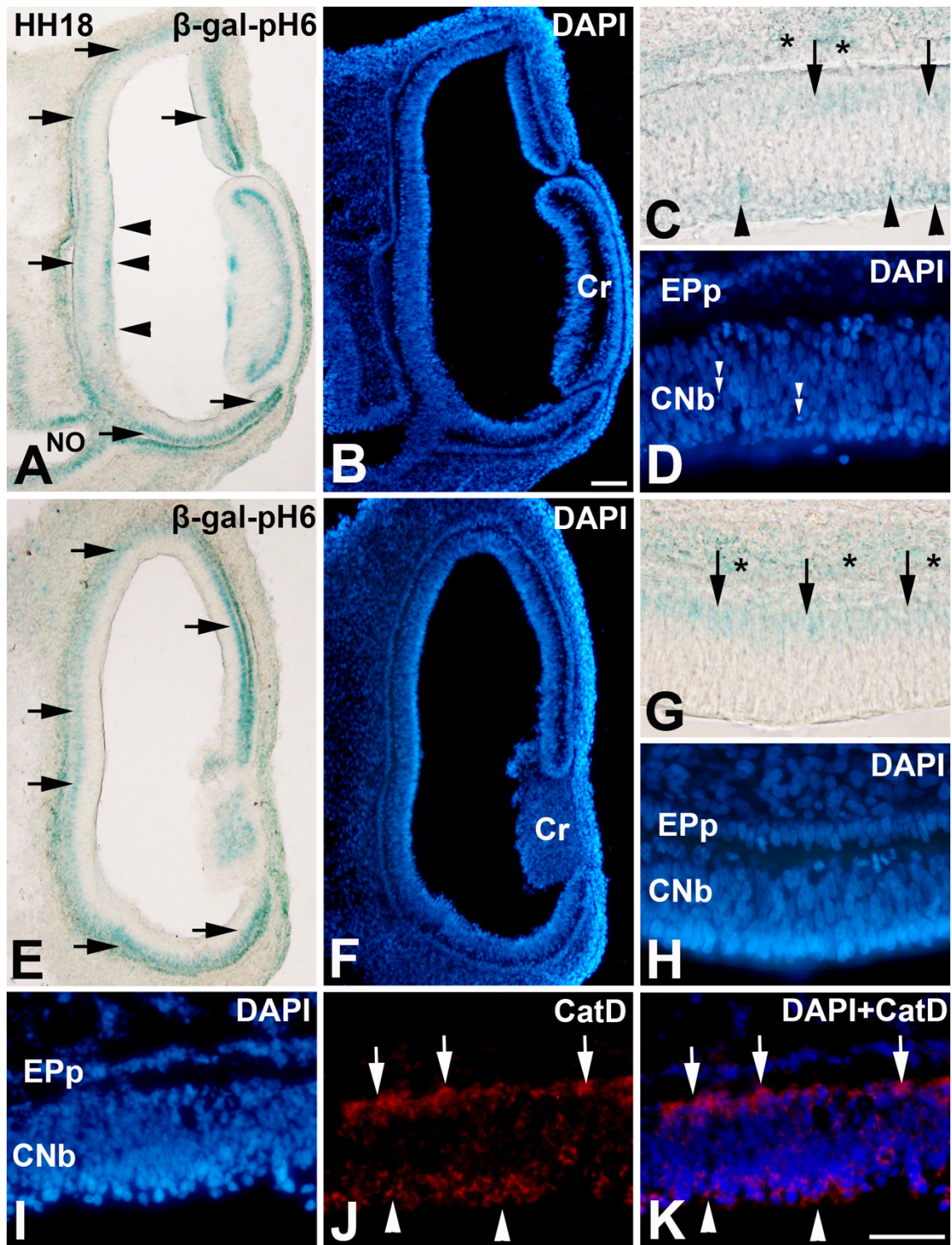


Figura 12. Distribución de la muerte celular, de diferentes marcadores de diferenciación celular y de la división celular en la retina de *G. gallus* en HH18. Secciones semifinas teñidas con la técnica de azul de toluidina/safranina (A, B). Criosecciones marcadas doblemente con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 e inmunohistoquímica con el anticuerpo TUJ1 (C, D) o tratadas individualmente con anticuerpos frente a Isl1 (E, F) y pHisH3 (G-I). El colorante nuclear DAPI mostró que la retina neural estaba compuesta por un CNb (D-I). Se detectaron núcleos picnóticos en la CNb (puntas de flecha dobles en B). La tinción de vítrea de la β -gal-pH6 identificó precursores neuronales recién diferenciados positivos para TUJ1 (puntas de flecha en C, D). Se observaron células Isl1-positivas en la región vítrea (E, flechas en F), y mitosis inmunorreactivas pHisH3 en la superficie escleral (puntas de flecha en H, I). **Abreviaturas:** Cr, cristalino; CNb, capa neuroblástica; NO, nervio óptico; Epp, epitelio pigmentario presuntivo. Barras de escala: 100 μ m (A, E); 25 μ m (C, D, F-I).

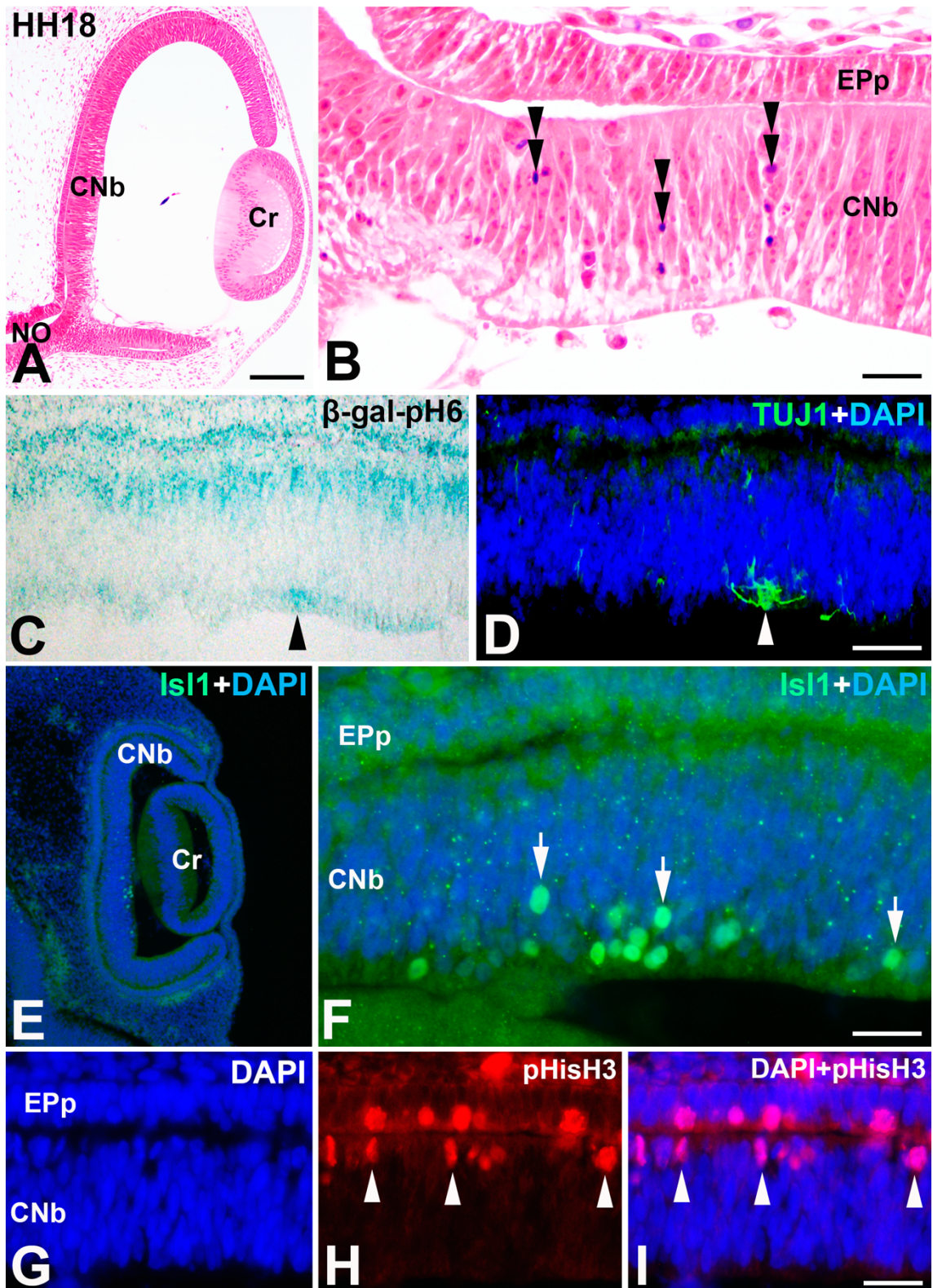


Figura 13. Distribución de la actividad β -gal-pH6 en la retina de *G. gallus* en el estadio HH21. Criosecciones de retina tratadas con histoquímica β -gal-pH6 (A, C, E, G), y con anticuerpos frente a p21 (C, D). La tinción DAPI mostró que la retina neural estaba compuesta por una CNb (B, D, F, H). Se detectó tinción de β -gal-pH6 en el Epp (asteriscos en A, C, E, G) y en las regiones escleral (flechas en A, C, E, G) y vítrea (puntas de flecha en A, C, G) de la retina. Se observó inmunorreactividad frente a p21 en la región escleral de la CNb y en núcleos dispersos ubicados en CCG presuntiva (puntas de flecha dobles en D). También aparecieron células esféricas con una fuerte actividad β -gal-pH6 en el meten ocular (dobles puntas de flechas en G) **Abreviaturas:** CNb, capa neuroblástica; FO, fisura óptica; Epp, epitelio pigmentario presuntivo. Barras de escala: 50 μ m (A-D; E-H).

Figura 14. Distribución de la muerte celular, actividad enzimática de la β -gal-pH6, división celular y de diferentes marcadores de diferenciación celular en la retina de *G. gallus* en el estadio HH21. Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina (A, B). Crio secciones doblemente marcadas con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 y anticuerpos frente a pHisH3 (C, D) o tratadas individualmente con anticuerpos frente a Isl1 (E) y CR (F). La tinción con DAPI mostró que la retina neural estaba compuesta por una CNb (D). Se detectaron abundantes núcleos picnóticos en la CNb situada en las proximidades de la salida del nervio óptico (puntas de flecha dobles en B). Se distinguieron mitosis inmunorreactivas frente a pHisH3 en la superficie escleral (puntas de flecha dobles en D), coincidiendo topográficamente con una tinción intensa de β -gal-pH6. Se observaron abundantes células Isl1-positivas (E) o CR-positivas (F) diferenciadas en la región vítrea. **Abreviaturas:** *cg*: células ganglionares; *Cr*, cristalino; *CNb*, capa neuroblástica; *pHisH3*, fosfohistona H3; *Epp*, epitelio pigmentario presuntivo. Barras de escala: 100 μ m (A), 25 μ m (B), 50 μ m (C-F).

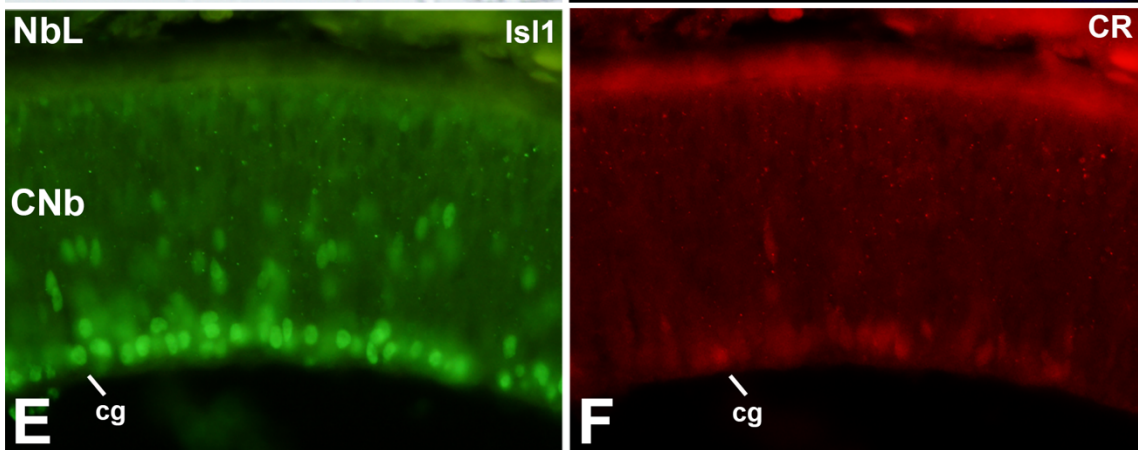
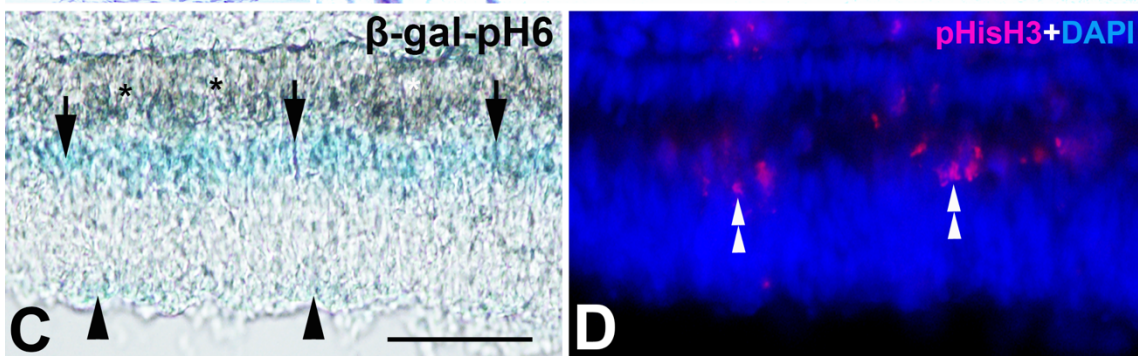
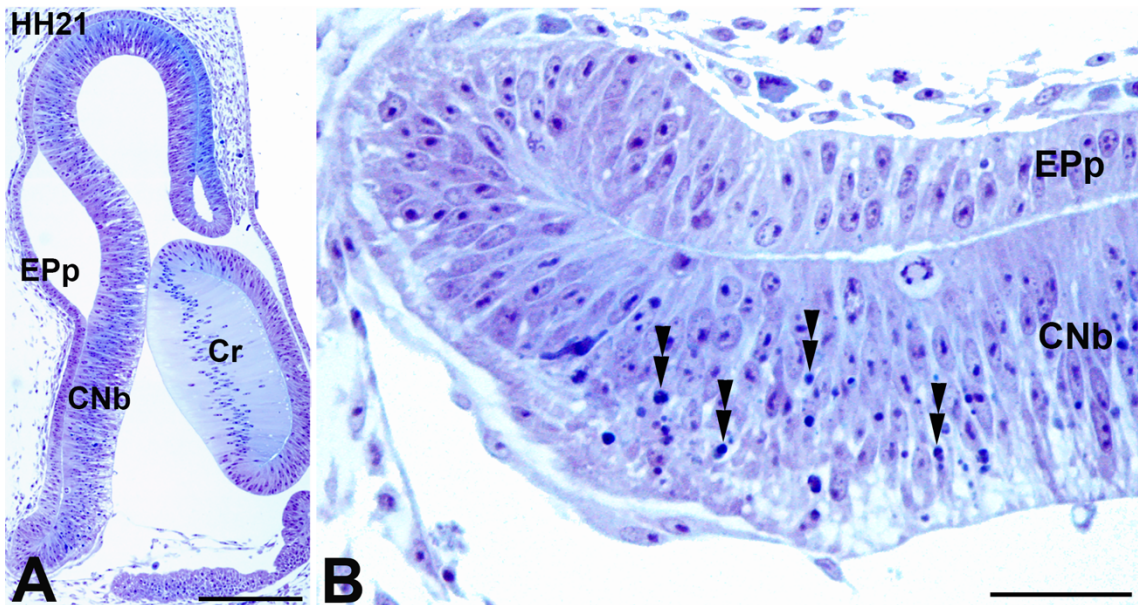


Figura 15. Distribución de la actividad de β -gal-pH6, división celular y de diferentes marcadores de diferenciación celular en la retina de *G. gallus* en el estadio HH29. Criosecciones teñidas doblemente con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 y anticuerpos frente a pHisH3 (A, B) y TUJ1 (C, D) o doblemente marcadas con anticuerpos frente a Isl1 (verde) y CR (rojo) (E, F). La tinción con el colorante nuclear DAPI mostró que la retina neural estaba compuesta por una CNb (B, D, H). Una intensa banda de marcaje histoquímico de la β -gal-pH6 se detectó en la región vítrea de la retina central (puntas de flecha en A, C). En la región escleral de la retina central y periférica (flechas en A, C, G) la señal histoquímica fue menos intensa. También se detectó actividad β -gal-pH6 en el EP (asteriscos en I). Se distinguieron mitosis inmunorreactivas frente a pHisH3 en la superficie escleral (puntas de flecha dobles en B). Cercanas a la superficie vítrea se distinguen abundantes células inmunorreactivas frente a TUJ1 (puntas de flecha dobles en D), Isl1 (E) o CR (F). **Abreviaturas:** *cg*, células ganglionares; *CNb*, capa neuroblástica; *pHisH3*, fosfohistona H3; *EP*, epitelio pigmentario. Barras de escala: 50 μ m (A-F; G, H), 25 μ m (I).

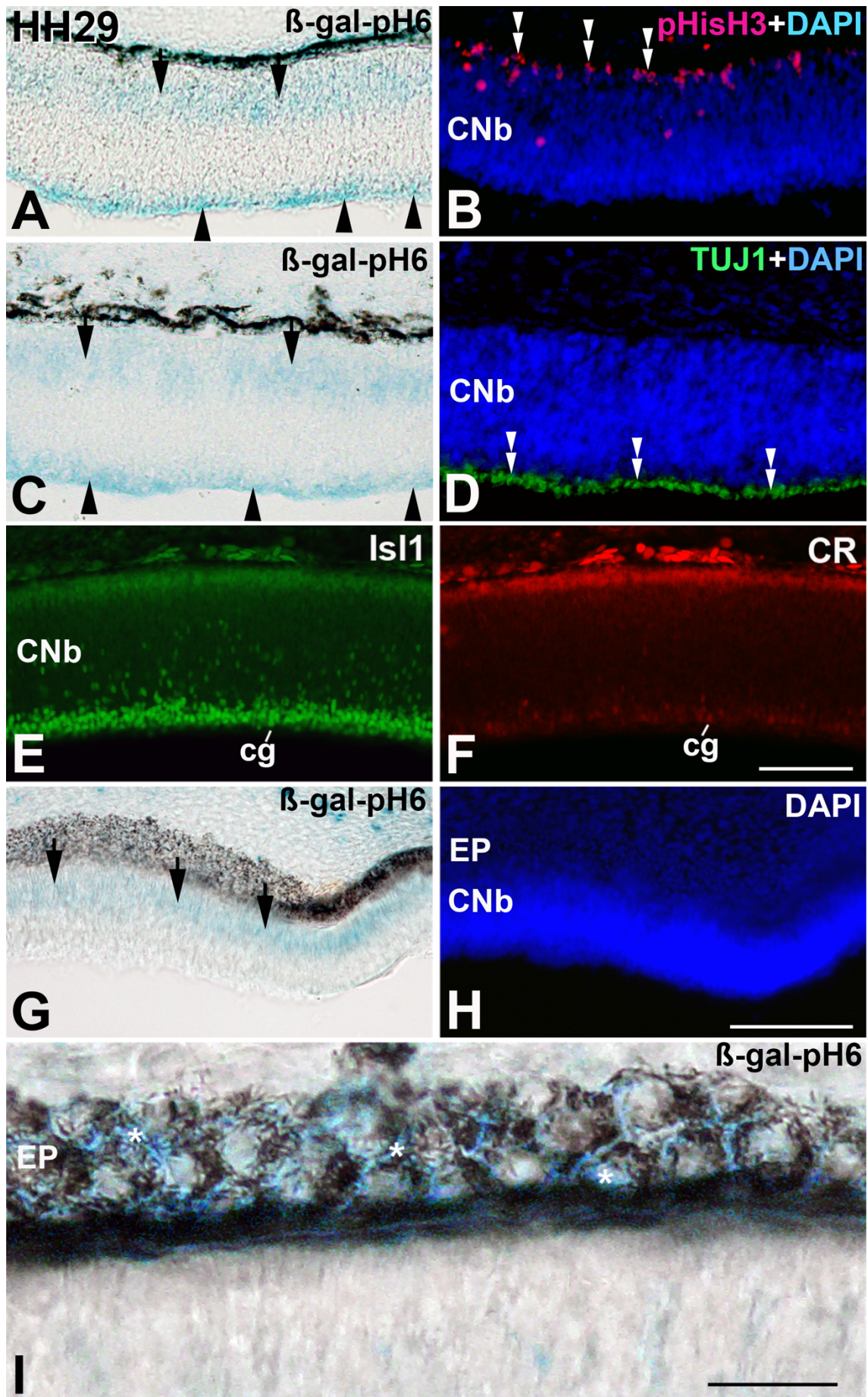


Figura 16. Distribución de la actividad de la β -gal-pH6, de diferentes marcadores de diferenciación celular y de la muerte celular en la retina central del estadio HH36 de *G. gallus*. Crio secciones teñidas doblemente con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 y anticuerpos frente a p21 (A-C), TUJ1 (D-F) e histoquímica TUNEL (I) o doblemente marcadas con anticuerpos frente a Isl1 (verde) (G) y CR (rojo) (H). La tinción con el colorante nuclear DAPI mostró que la retina neural compuesta por una CNb (B, E). La tinción de β -gal-pH6 se detectó principalmente en las capas retinianas donde se distribuyen las células ganglionares, amacrinas y horizontales (A, D). Se observó inmunorreactividad frente a p21 en la CCG, capa de células amacrinas y capa de células horizontales (C). Se detectó una intensa inmunorreactividad frente a TUJ1 en la CFO, CCG y CPI (F), al igual que en somas dispersos localizados en la capa de células amacrinas (F). Se detectaron células ganglionares, amacrinas, bipolares y horizontales diferenciadas con anticuerpos anti-Isl1 (G) y anti-CR (H). Los núcleos apoptóticos TUNEL-positivos se detectaron principalmente en la CCG, y también en la mitad interna del INL (puntas de flecha en I). **Abreviaturas:** ca, célula amacrina; cb, célula bipolar; cg, células ganglionares; CCG, capa de células ganglionares; ch, célula horizontal; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; Isl1, islet-1; CNb, capa neuroblástica; CFO, capa de fibra óptica; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; EP, epitelio pigmentario. Barra de escala: 50 μ m.

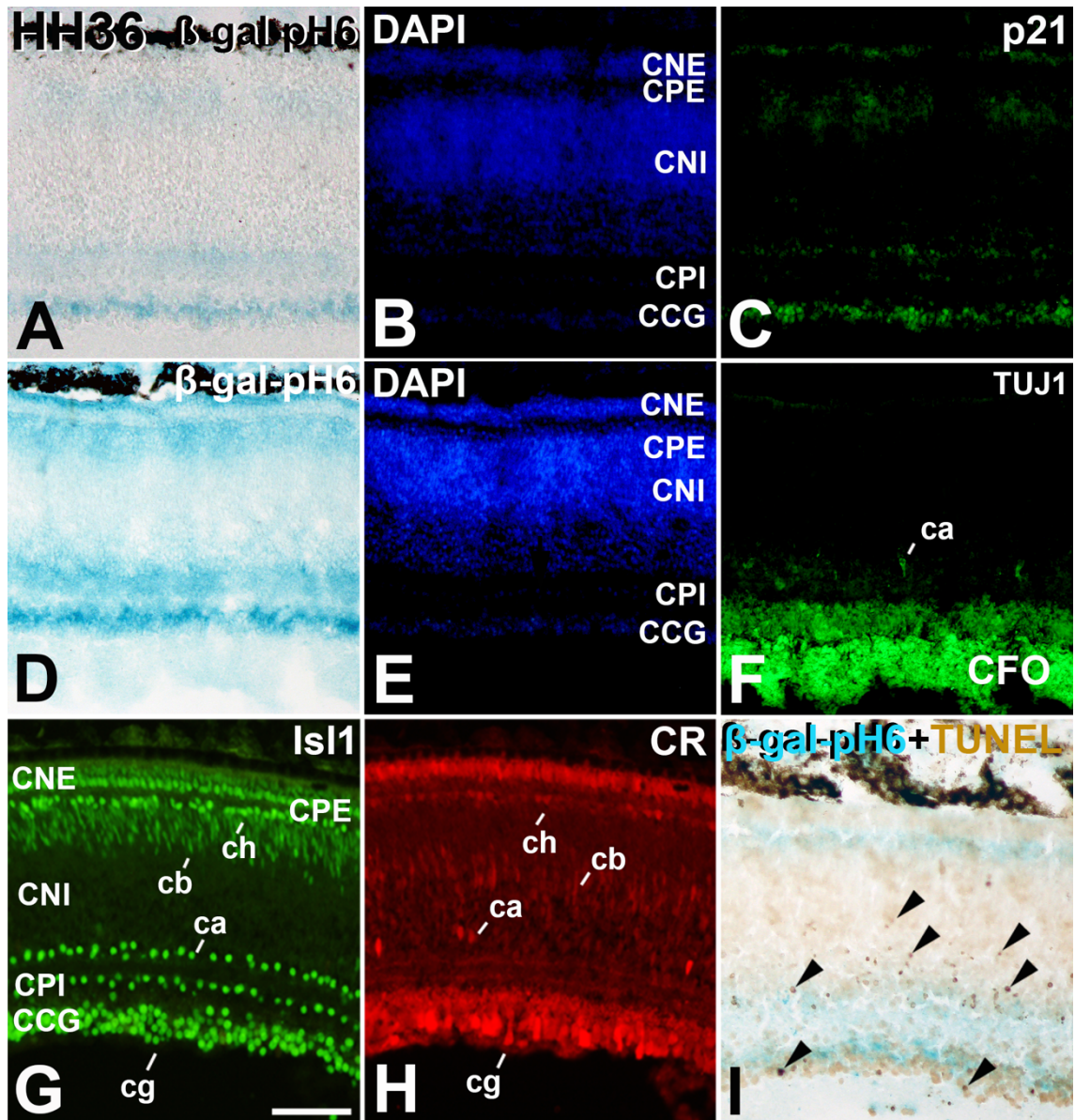


Figura 17. Distribución de la actividad de la β -gal-pH6 y de marcadores de diferenciación celular en la región más periférica de la retina del estadio HH36 de *G. gallus*. Crio secciones teñidas con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 (A, B, F) y anticuerpos frente a Isl1 (C-E). La tinción con el colorante nuclear DAPI mostró aspecto indiferenciado en la retina más periférica (B, C, E). La señal histoquímica de la β -gal-pH6 fue muy intensa en las regiones vítrea y escleral en la retina más periférica (A) y en el EP (asteriscos en F). Se detectaron células ganglionares, amacrinas y horizontales diferenciadas con anticuerpos anti-Isl1 (C-E). **Abreviaturas:** *ca*, célula amacrina; *cg*, células ganglionares; *CCG*, capa de células ganglionares; *ch*, célula horizontal; *CNI*, capa nuclear interna; *Isl1*, islet-1; *CNb*, capa neuroblástica; *CNE*, capa nuclear externa; *CPE*, capa plexiforme externa; *EP*, epitelio pigmentario. Barras de escala: 50 μ m (A-E), 25 μ m (K).

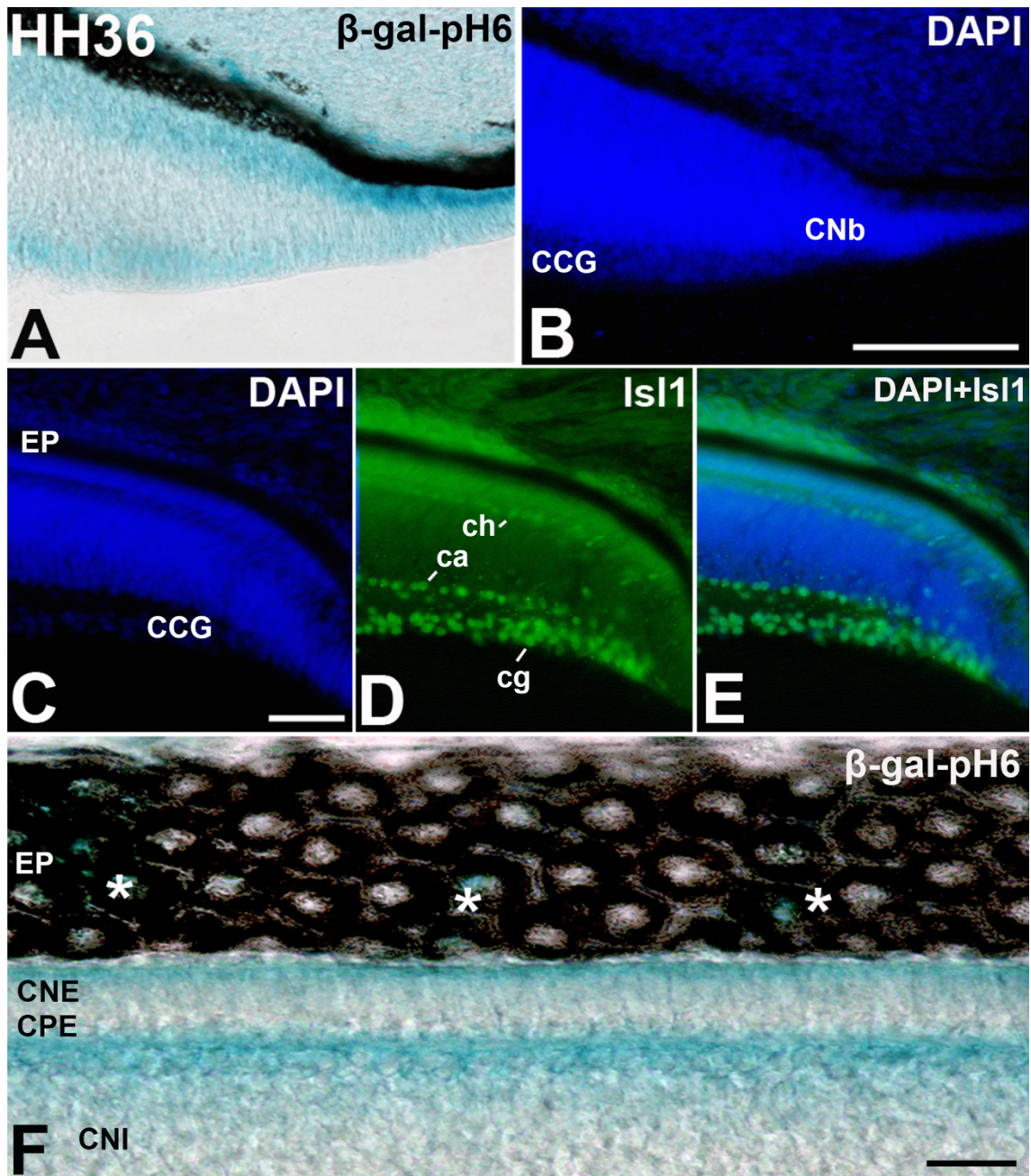


Figura 18. Crio secciones de retina de embriones de *G. gallus* en los estadios HH39 (A, B), HH41 (D-G) y HH46-P0 (H) tratadas únicamente con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 (A, B, D-H) o en combinación con la técnica histoquímica de TUNEL que identifica muerte celular (C). La tinción DAPI mostró la organización histológica de la retina central (B, E) y periférica (G). En el estadio HH39 se detectó una banda continua de marcaje histoquímico en las capas de células ganglionares, amacrinas y horizontales (A). Los núcleos positivos para TUNEL se detectaron principalmente en la CNI y también en la CCG (puntas de flecha en C). En etapas más avanzadas de desarrollo y en individuos recién eclosionados, la actividad de β -gal-pH6 se restringió a subpoblaciones de células ganglionares, amacrinas y horizontales (D, F, H). **Abreviaturas:** *ca*, célula amacrina; *cb*, célula bipolar; *cg*, células ganglionares; *CCG*, capa de células ganglionares; *ch*, celda horizontal; *CNI*, capa nuclear interna; *CNE*, capa nuclear externa. Barras de escala: 100 μ m (A-C), 50 μ m (D-H).

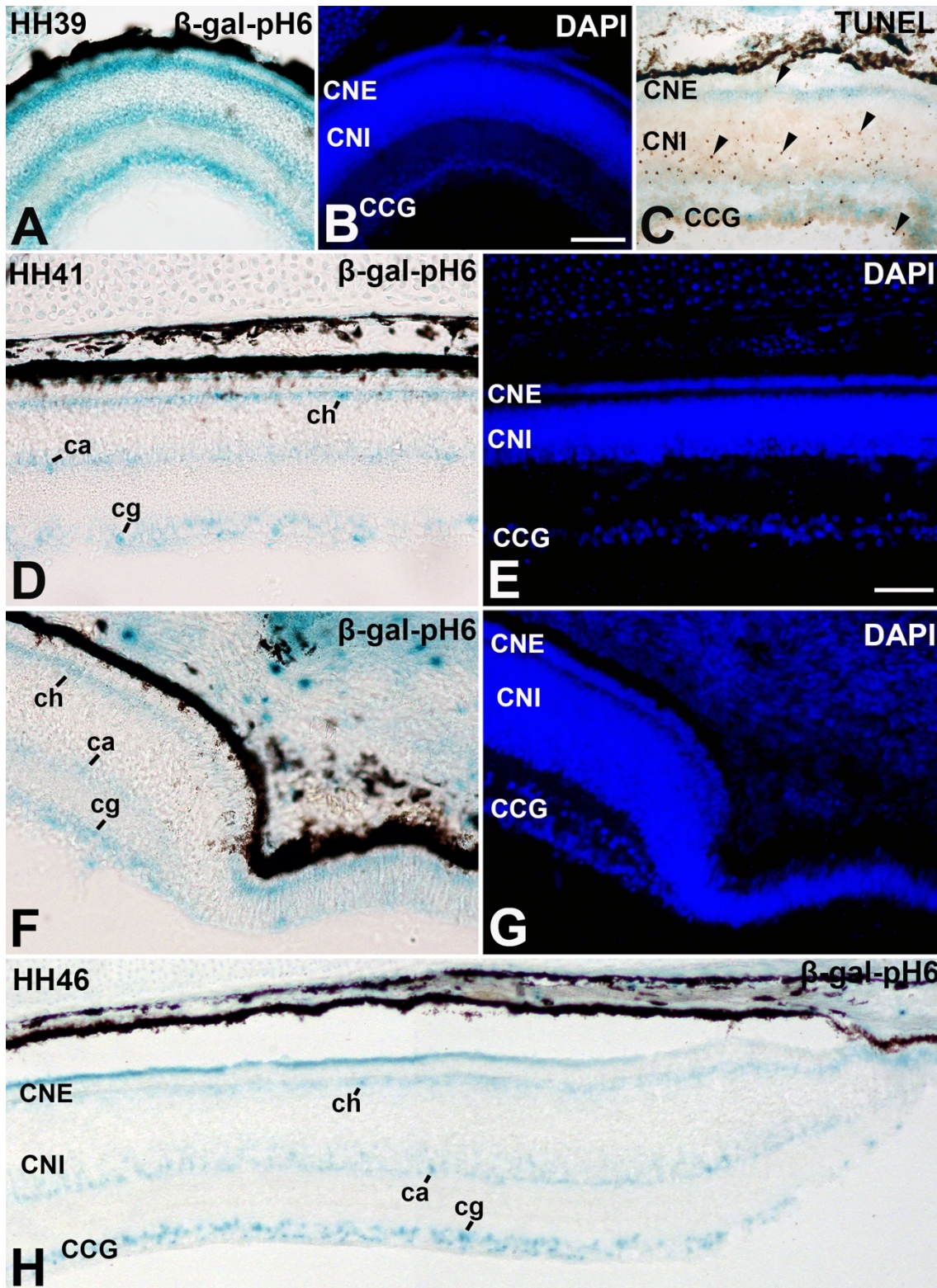
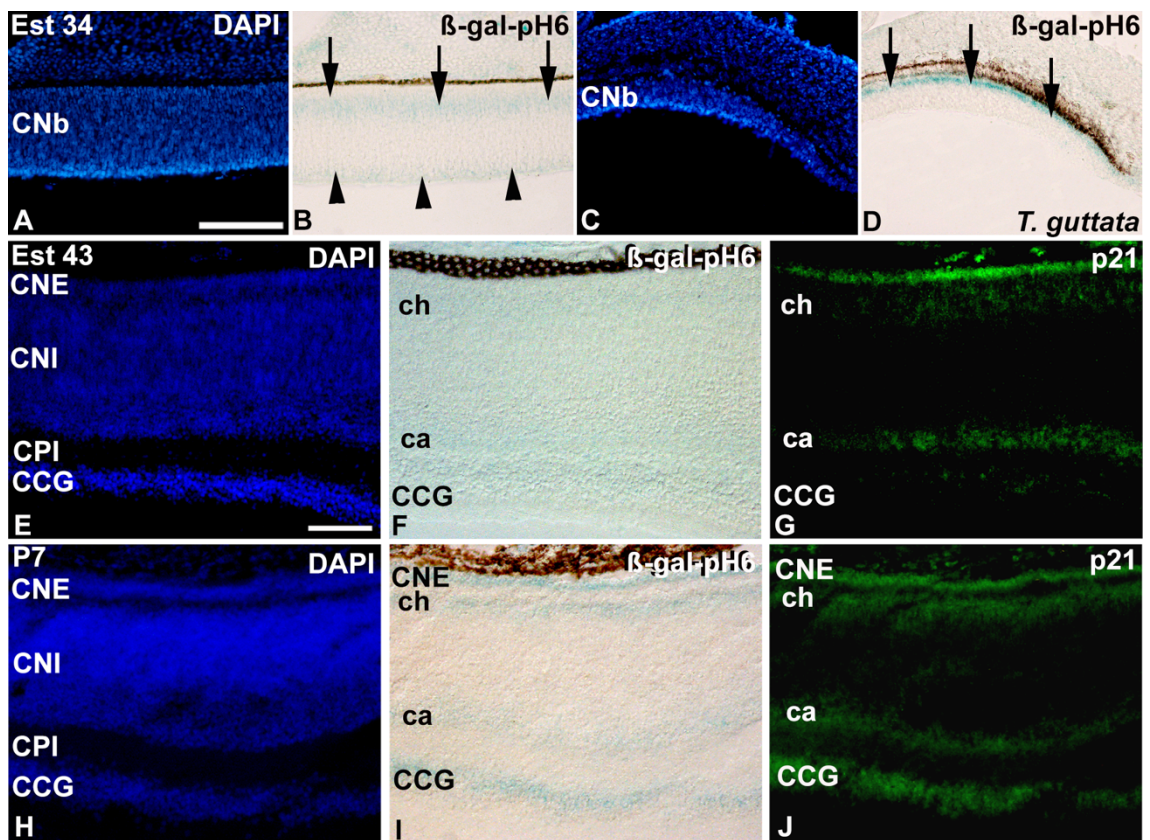


Figura 19. Distribución del marcaje de β -gal-pH6 y la inmunorreactividad de p21 en criosecciones retinales de embriones (A–G) y especímenes posteriores al nacimiento (H–J) de *T. guttata*. Todas las secciones se contrastaron con DAPI. La tinción DAPI mostró que en Est34, el tejido retiniano comprendía un CNb (A, C). La actividad de β -gal-pH6 presentó dos bandas de marcaje ubicadas en las regiones vítrea y escleral de la CNb en la retina central (B), pero en una sola banda ubicada escleralmente en la retina periférica (D). En Est43 y P7, la tinción DAPI reveló que la retina central presentaba una estructura multilaminada (E, H). La actividad de β -gal-pH6 se detectó principalmente en la CCG, la capa de células amacrinas, la capa de células horizontales y la capa de células fotorreceptoras (F, I). La inmunoseñal de p21 coincidió en gran medida con la tinción de β -gal-pH6 (G, J). **Abreviaturas:** *ca*, células amacrinas; *CCG*, capa de células ganglionares; *ch*, células horizontales; *CNI*, capa nuclear interna; *CPI*, capa plexiforme interna; *CNb*, capa neuroblástica; *CNE*, capa nuclear exterior. Barras de escala: 50 μ m.



DISCUSIÓN CAPÍTULO 1.

V. DISCUSIÓN Capítulo 1.

En este capítulo se ha descrito la expresión espaciotemporal de la actividad β -gal-pH6 en criosecciones de tejido retinal a lo largo del desarrollo embrionario. Hasta ahora, tras la revisión bibliográfica realizada, no se había hecho una descripción de este tipo, ni tampoco se había descrito la expresión de la actividad β -gal-pH6 en determinadas subpoblaciones neuronales durante el periodo embrionario, incluso en etapas de diferenciación tempranas.

Como se demuestra en el apartado de resultados, la actividad β -gal-pH6 presenta un patrón dinámico a través del desarrollo retinal. El marcaje de dicha actividad coincide espacio-temporal con la actividad β -galactosidasa lisosomal y con células que se están diferenciando o que ya se han diferenciado. Sin embargo, no se aprecia una coincidencia cronotopográfica con la distribución de núcleos apoptóticos en el tejido retinal, por lo que no podemos atribuir únicamente a la actividad β -gal-pH6 a una senescencia programada en este modelo.

1. Actividad β -gal-pH6 y células en apoptóticas.

Se sabe que, durante el desarrollo embrionario la muerte celular programada juega un papel esencial en el sistema visual de vertebrados (Valenciano et al., 2009; Francisco-Morcillo et al., 2014). Como se ha podido observar, se han encontrado núcleos picnóticos en la región central de la retina en estadios tempranos de su desarrollo, concretamente en la mitad interna de la CNb cercana al nervio óptico, al igual que ha sido descrito previamente (Mayordomo et al., 2003). Sin embargo, el marcaje de β -gal-pH6 en estos estadios se ha detectado en las superficies escleral y vítrea. Por otro lado, en estadios más avanzados como el HH36 donde la retina comienza a presentar sus características capas, existe una intensa acumulación de muerte de células neurotróficas en CCG, pero el marcaje de β -gal-pH6 en este caso es homogéneo para CCG, la capa de células amacrinas y la capa de células horizontales. En el HH39, β -gal-pH6 presenta la misma distribución, no obstante, los núcleos positivos para TUNEL se encontraban localizados en la capa de células bipolares donde β -gal-pH6 estaba ausente. De esta forma, este análisis demuestra que la actividad β -gal-pH6 no está correlacionada con la distribución espacio-temporal de los núcleos apoptóticos en tejido retinal en desarrollo.

2. Actividad β -gal-pH6 en la CNb.

En el estadio más joven analizado, HH18, la actividad β -gal-pH6 se restringió principalmente a la región escleral de toda la retina y a la región vítrea en el fondo de la retina. En regiones más temporales/nasales, no se observó tinción vítrea. El marcaje aparece de forma de banda continua en la región apical de las células neuroepiteliales, coincidiendo topográficamente con la actividad mitóticas que tiene lugar en la retina de vertebrados en diferenciación (Francisco-Morcillo et al., 2006; Ferreiro-Galve et al., 2010a; Bejarano-Escobar et al., 2012a; Pavón-Muñoz et al., 2016; Álvarez-Hernán et al., 2018b).

Además, la actividad β -gal-pH6 se correlaciona intensamente con la localización de lisosomas, como se ha demostrado con la inmunohistoquímica de CatD, que es un marcador lisosomal en tejido ocular (Rakoczy et al., 1997, 1999; Wassélius et al., 2003; Ahuja et al., 2008; Bejarano-Escobar et al., 2011b, 2011a). Se detectó una abundante inmunoseñal de CatD en la región apical de las células neuroepiteliales en la superficie escleral y en las neuronas en diferenciación que se encuentran presentes en el polo posterior de la retina de pollo en estos estadios (Prada et al., 1991; Snow and Robson, 1994; McCabe et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2015). Por ende, en estos estadios tempranos del desarrollo de la retina, la actividad β -gal-pH6 está estrechamente relacionada con los lisosomas en la región apical de las células neuroepiteliales y en aquellas neuronas recientemente diferenciadas.

Por otro lado, el marcaje de β -gal-pH6 se ve incrementado en HH21, coincidiendo con una gran cantidad de células ganglionares en diferenciación estadios. También se extiende a las regiones más periféricas de la retina siguiendo un gradiente centro-periférico, similar al gradiente de diferenciación descrito por otros autores en la retina de pollo (Prada et al., 1991; Snow and Robson, 1994; McCabe et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2005; Bejarano-Escobar et al., 2015).

En lo que respecta al marcaje apical, se ha demostrado que la mitad de las células horizontales y fotorreceptoras son postmitóticas en HH29 (Prada et al., 1991), y hay abundantes fotorreceptores que están expresando determinados marcadores de diferenciación como la visinina (Fischer et al., 2008). Por lo tanto, desde el HH29 en adelante, existen un gran número de células en diferenciación localizadas en la región

escleral de la retina de pollo en desarrollo. Esto podría promover la redistribución de lisosomas en las células neuroepiteliales, provocando la desaparición del marcaje β -gal-pH6 en la parte escleral de la retina.

3. Actividad β -gal-pH6 en la retina estratificada.

Entre HH29 y HH39, el marcaje de β -gal-pH6 la retina laminada de pollo se restringe a los somas celulares de las capas de células ganglionares, amacrinas y horizontales en la CNE en forma continua. Sin embargo, desde HH41 hasta el día del nacimiento, el marcaje de β -gal-pH6 se detecta solo en somas de subpoblaciones de estas mismas capas, coincidiendo con la distribución de lisosomas en retina madura descrita en estudios anteriores (Abraham et al., 1969; Wassélius et al., 2003). No obstante, en la capa de células bipolares el marcaje de la actividad β -gal-pH6 está completamente ausente, de forma contraria a lo descrito por Abraham et al. (1969), aunque puede ser debido a las técnicas más específicas de detección de estos orgánulos. Además, las células de Müller tampoco presentan tal actividad, como sí se ha descrito en otros trabajos (Hori et al., 1980).

4. Actividad β -gal-pH6 en el epitelio pigmentario.

El epitelio pigmentario debido a su papel en la digestión lisosomal de los segmentos externos de los fotorreceptores en continuo crecimiento presenta una gran masa de lisosomas y enzimas lisosomales como CatD (Abraham et al., 1969; El-Hifnawi, 1995; Wassélius et al., 2003; Ahuja et al., 2008). La actividad β -gal-pH6 en este estudio también aparece en el epitelio pigmentario en todos los estadios analizados de pollo, incluso en momentos donde la pigmentación de este epitelio no está presente.

Finalmente, la eficacia de la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 en este estudio para detectar la presencia de células senescentes en tejido retinal en desarrollo se pone en duda (Este hecho será discutido más adelante). Sin embargo, con el objetivo de investigar la presencia de β -gal-pH6 en otro modelo del sistema nervioso, se ha realizado un análisis posterior de este marcaje en el epitelio olfatorio, el cual aparece recogido en el siguiente capítulo.

CONCLUSIONES CAPÍTULO 1.

VI. CONCLUSIONES Capítulo 1.

1. Durante la retinogénesis, la actividad β -gal-pH6 muestra un patrón dinámico en la retina de aves en forma de banda continua, correlacionándose esta actividad con las células en proliferación y recién diferenciadas.
2. En la retina indiferenciada la actividad β -gal-pH6 aparece en las regiones escleral y vítrea y se correlaciona fuertemente con la localización de lisosomas y células recién diferenciadas.
3. En la retina laminada la actividad β -gal-pH6 aparece localizada de forma continua en los somas de las capas de células ganglionares, amacrinas y horizontales de la CNE. Sin embargo, en estadios previos al nacimiento se restringe a subpoblaciones de esas células, sugiriendo esto que la actividad β -gal-pH6 parece correlacionarse con fases más indiferenciadas de estas poblaciones.
4. La actividad β -gal-pH6 no muestra indicios de marcaje de células en senescencia.

CAPÍTULO 2

Sistema olfatorio de vertebrados.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Sistema olfatorio.

Dentro de los órganos de los sentidos, el sistema olfativo es esencial para la mayoría de los animales. La información de su entorno recibida a través de él les permite llevar a cabo funciones reproductivas, sociales, orientación en el medio, obtener alimento e identificar a otros individuos, ya sean sus iguales, presas o depredadores. En una gran parte de los individuos el sistema olfatorio se encuentra estrechamente relacionado con el sistema límbico, dando lugar al denominado rinencéfalo. El olfato se estimula por parte de moléculas olorosas u odorantes. Para aquellos animales terrestres, los odorantes son moléculas volátiles e hidrofóbicas. Estas penetran a través de la inspiración por la cavidad nasal y tienen capacidad de adherirse a la mucosa olfatoria hasta alcanzar al receptor (Graziadei and Graziadei, 1979; MacKay-Sim, 2010).

La mucosa olfatoria está formada por el epitelio olfatorio (EO) y la lámina propia (LP) subyacente. Está considerada como el órgano periférico del sentido del olor, junto con el órgano vomeronasal (Graziadei and Graziadei, 1979; Nedelec et al., 2005a; Brann and Firestein, 2014). El EO está localizado en la parte dorsal y posterior de la cavidad nasal a lo largo de las laminillas verticales mediales del cornete superior del adulto (Fig.20A) (Holbrook et al., 2011; Brann and Firestein, 2014). En su interior aparecen las neuronas olfatorias sensitivas (NOS) actuando como receptores específicos de las moléculas odoríferas, que presentan la principal función en este sistema. Las NOS poseen la capacidad y transducir el estímulo químico de los odorantes convirtiéndolo en señal eléctrica que se envía al bulbo olfatorio (BO) (Fig.21) (Nedelec et al., 2005b; Brann and Firestein, 2014).

Este sistema ha sido estudiado y descrito durante las últimas décadas, ya que las células neuronales sensitivas (CNS) en el OE son continuamente renovadas a lo largo de la vida adulta del individuo. Su dinámica estructura y un acceso fácil para identificar el destino de sus axones permite que sea un buen modelo para el estudio de la maduración neural, mapeo y neurogénesis en adulto (Liberia et al., 2019a). En el EO solo se encuentra un

tipo de neurona a diferencia del resto del SNC, lo que ha facilitado estudiar la regulación de la neurogénesis en OE (Beites et al., 2005).

Por otro lado, la LP se encuentra debajo del EO y contiene capilares sanguíneos, células gliales especiales llamadas células de envoltura olfatoria y haces de axones de las NOS. Estos haces se unen antes de la salida de la lámina propia, formando ramas del nervio olfatorio (NO) que conectan con el BO (Nedelec et al., 2005a).

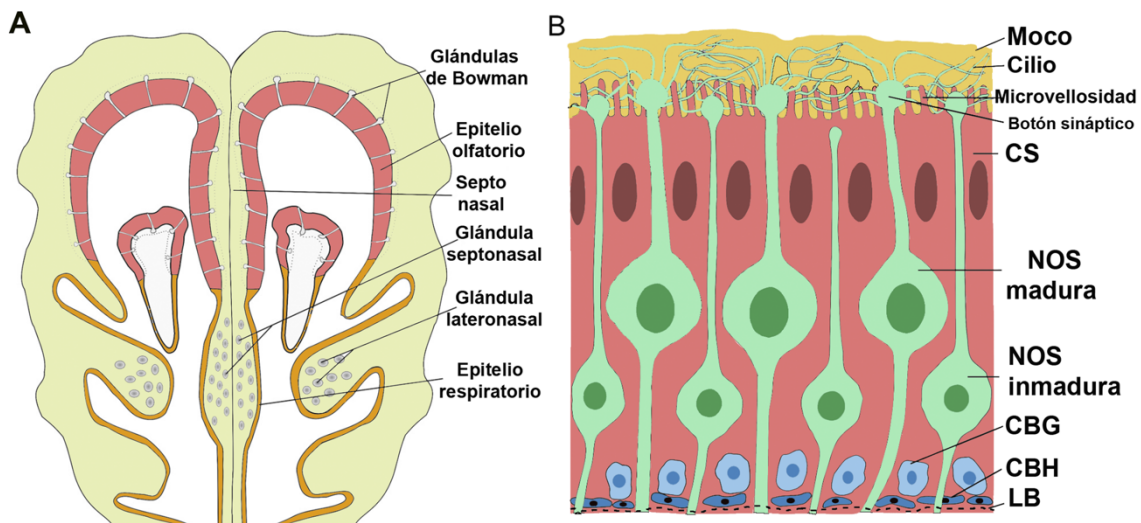


Figura 20. Representaciones esquemáticas de la nariz adaptada de Maurya et al. (2015).

A: Diagrama esquemático de una sección coronal de la nariz que muestra el epitelio olfatorio, el epitelio respiratorio, las glándulas de Bowman, las glándulas del tabique nasal y las glándulas nasales laterales. **B:** El epitelio olfatorio pseudoestratificado está compuesto principalmente por células de soporte (CS), neuronas olfativas sensoriales (NOS) y células basales. Las células de sostén tienen cuerpos celulares columnares, microvellosidades en el lado apical y residen en la región más apical del epitelio. Las NOS maduras e inmaduras son neuronas bipolares con un solo proceso dendrítico que se proyecta hacia la superficie apical del epitelio. En las NOS maduras, varios cilios sobresalen de la protuberancia dendrítica. Dos tipos de células basales residen cerca de la lámina basal (LB): las células basales horizontales (CBH) que están adheridas a la lámina basal y las células basales globosas (CBG) que se encuentran por encima de la capa de CBH.

2. Estructura del epitelio olfatorio (EO).

El epitelio olfatorio (EO) ha despertado en los últimos años un creciente interés como modelo de estudio, debido a que constituye un marcador temprano de enfermedades degenerativas que afectan al SNC (Escada et al., 2009). Por otro lado, es modelo recurrente en estudios de neurogénesis debido a la presencia de células madre oligopotentes incluso en estadios postnatales en mamíferos (Brann and Firestein, 2014). La citoarquitectura está bastante conservada en vertebrados, siendo el EO un epitelio de tipo pseudoestratificado columnar con compartimentos multicelulares. Contiene varios tipos de células: células neuronales sensitivas, células de soporte, células de glándulas de Bowman y células basales (Fig.20B) (Brann and Firestein, 2014; Sokpor et al., 2018).

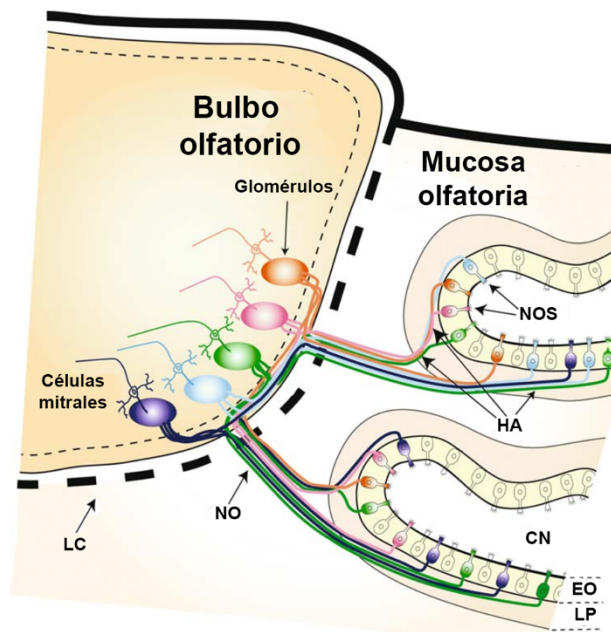


Figura 21. Organización del sistema olfativo principal del ratón. Las neuronas olfatorias sensoriales (NOS) ubicadas en la mucosa olfatoria se proyectan hacia los glomérulos del bulbo olfatorio (BO), en los que contactan con neuronas bulbares como las células mitrales. Cada NOS expresa un gen del receptor de olores (RO), y todos los axones de las NOS que expresan el mismo RO convergen en unos pocos glomérulos. Desde el epitelio olfatorio (EO) al BO los axones de las NOS se ensamblan en haces de axones (HA) en la lámina propia (LP), antes de fusionarse en ramas del nervio olfatorio (NO) que cruzan la lámina cribosa (LC). Figura adaptada de Nedelec et al. (2005b). **Abreviaturas:** CN, cavidad nasal.

2.1. Células neuronales sensitivas (CNS).

Estas neuronas son receptoras y al mismo tiempo las primeras neuronas de la vía olfatoria. Poseen morfología bipolar con una dendrita en la parte apical y un axón en su parte basal. En la dendrita se encuentra un botón terminal del que surgen varios cilios alargados incluidos en la película de moco (Fig.20B) (Kawauchi et al., 2004; Kulaga et al., 2004; Williams et al., 2014). Los cilios albergan, por lo general, solo un tipo de receptor específico de los odorantes en sus membranas, que son las proteínas encargadas de transformar el estímulo químico oloroso en una señal eléctrica. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los siete dominios transmembranales de las proteínas G (Buck, 1992; Glusman et al., 2001; Magklara et al., 2011; Horowitz et al., 2014). La unión del odorante con el receptor provoca la despolarización de la membrana celular y genera el potencial de acción. Los somas de las CNS se sitúan a diferentes alturas en la parte intermedia del EO (Fig.20B) (Farbman, 1994; Beites et al., 2005). Así, el núcleo de las CNS más maduras se sitúan en porciones centrales y apicales del EO, mientras que el de las neuronas inmaduras se sitúa en porciones basales (Schwob et al., 2017). Sus axones son amielínicos y conectan con el BO, dando lugar a la vía olfatoria (Fig.21). Estos axones abandonan el EO atravesando la LB y se introducen en la LP, agrupándose en varios haces denominados nervios olfatorios (Farbman, 1994). Estos haces nerviosos se encuentran rodeados por la LB y células de envoltura, lo que provoca que se encuentren aislados físicamente de los haces vecinos dentro de la LP (Nedelec et al., 2005a). A continuación, estos nervios atraviesan la lámina cribosa (LC) y alcanzan el BO por la zona basal, en la capa glomerular (Fig.21). Allí establecen sinapsis con las dendritas de las segundas neuronas de la vía olfatoria, que pueden ser de dos tipos: las células mitrales y las células en penacho, las cuales forman parte de unas unidades denominadas glomérulos. Para que se produzcan estas sinapsis es necesario la desorganización de los haces, y una importante reorganización previa a la interacción con el glomérulo, ya que cada glomérulo recibe los axones de varios miles de CNS (Nedelec et al., 2005a; MacKay-Sim, 2010; Richard et al., 2010). Finalmente, los axones de las células mitrales y las células en penacho salen del BO hasta alcanzar los centros olfatorios (Fig.21). Las proteínas específicas del olor convergen solo en glomérulos específicos del BO lo que

implica la codificación del olor, haciendo que se creen mapas de espaciales de olores (Choi and Goldstein, 2018).

2.2. Células de soporte (CS).

Los somas de estas células, también denominadas sustentaculares, forman una capa simple en la parte apical del EO y están consideradas como células gliales (Fig.20B) (Farbman, 1994; Beites et al., 2005; Leung et al., 2007). Poseen morfología cilíndrica y alargada con microvellosidades en sus ápices. Aparecen rodeando las neuronas sensoriales, aislándolas eléctricamente (Holbrook et al., 1995; Nedelec et al., 2005a). Intervienen en la generación de moco y en la producción de proteínas necesarias para captar las moléculas olorosas y llevarlas ante los receptores de los cilios (Liberia et al., 2019b). Presentan finas proyecciones citoplasmáticas que terminan en un engrosamiento a modo de pie en la LB (Fig. 22 H, I). Además de su papel glial, hay indicios que indican su actúan en la desintoxicación de muchas sustancias nocivas del aire que tienen contacto con el EO y también fagocitan CNS muertas (Suzuki et al., 1996).

2.3 Células de envoltura olfatorias.

Las células de envoltura abrazan los axones de las CNS cuando entran en la LP (Fig.21) (Beites et al., 2005; MacKay-Sim, 2010). Presentan carácter heterogéneo y generan controversia en la comunidad científica al tener características de las células de Schwann, pero también funciones similares a las de los astrocitos (Au and Roskams, 2003). Aparecen incluidas en la LP, aunque su origen tiene lugar a partir de las células basales del EO (Pixley, 1992; Calof and Guevara, 1993).

2.4 Células basales.

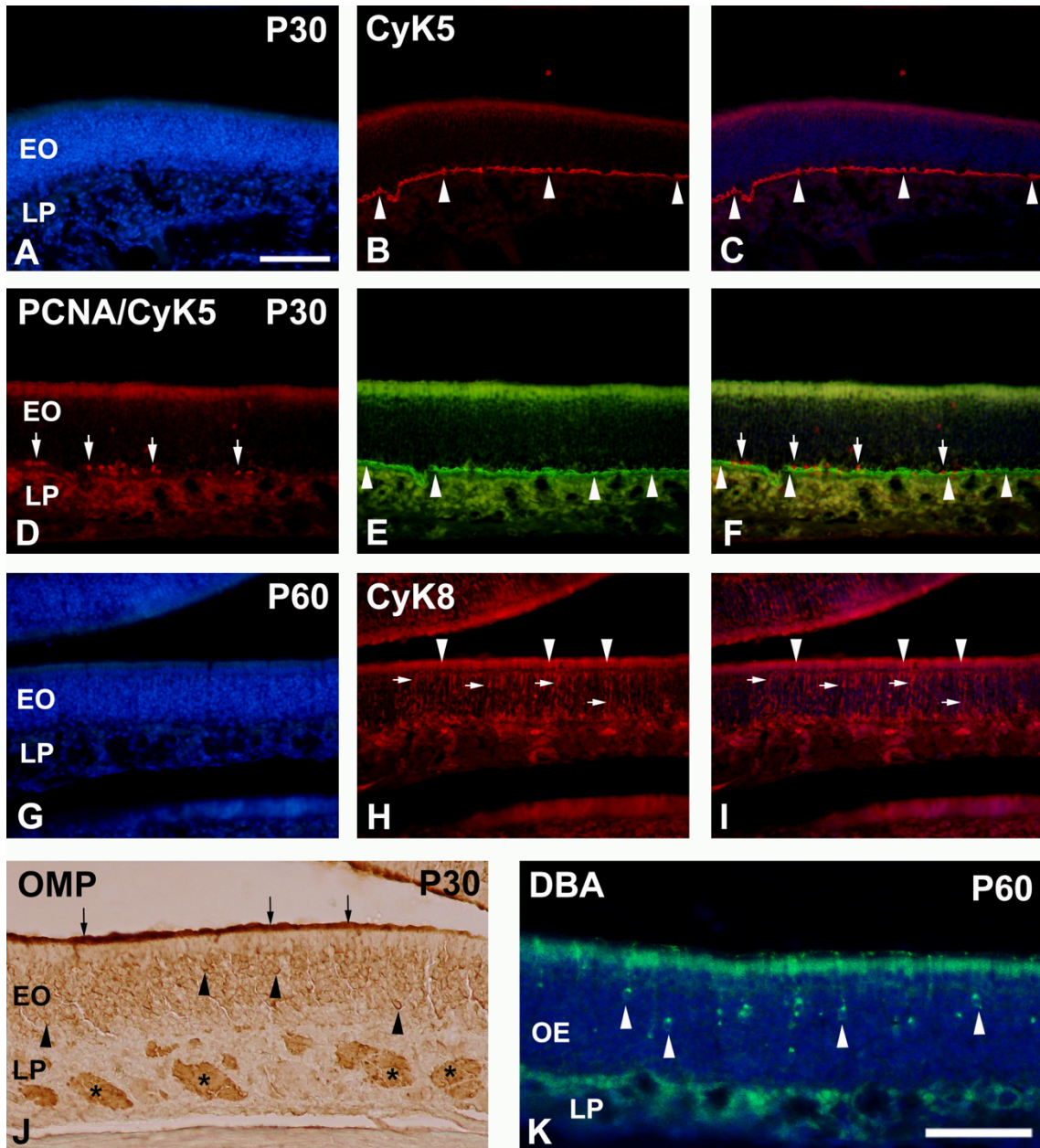
Se encuentran en la región basal del EO y son consideradas como las células madre de este epitelio, ya que tienen capacidad proliferativa y también de diferenciarse a CNS y a células de soporte (MacKay-Sim, 2010). Morfológicamente, en roedores juveniles y adultos, se distinguen dos tipos de poblaciones: células basales globosas (CBG) y células basales horizontales (CBH) (Brann and Firestein, 2014), aunque en humanos solo se ha encontrado un tipo de células basal (Hahn et al., 2005). Ambos tipos aparecen adyacentes a LB, situándose las CBH en regiones más basales y las CBG en regiones ligeramente más apicales (Fig.20B). Las CBH forman una capa simple en contacto directo

con la LB (Fig. 22 B, C). Se dividen de forma lenta y asimétrica, lo que genera una célula madre para mantener la población de estas y otra que dará lugar al conjunto de CBG (Beites et al., 2005; Leung et al., 2007). Por su parte, las CBH apenas se dividen en condiciones normales, pero cuando el EO sufre un daño severo, proliferan de forma asimétrica e inician el proceso de restablecimiento de las poblaciones de CNS y CS que se han perdido en el EO (Carter et al.; Mackay-Sim and Kittel, 1991; Beites et al., 2005; Leung et al., 2007; Schwob et al., 2017). Independientemente de que el EO haya resultado dañado por una lesión, existe un proceso de regeneración continua por parte, principalmente, de las CBG, ya que las células del EO están expuestas al medio externo (bacterias, virus, sustancias tóxicas...) y degeneran continuamente. De lo comentado anteriormente, se extrae que, en este proceso de regeneración basal, tanto las CBG como las CBH, tienen un papel esencial (Ver apartado de neurogénesis).

2.5 Glándulas de Bowman.

Aparecen alojadas en la LP, justo debajo del EO. Su principal función es secretar moco a través de conductos que discurren entre las CS hacia la superficie apical del EO (Graziadei and Graziadei, 1979; Leung et al., 2007).

Figura 22. Distribución de marcadores inmunohistoquímicos en el epitelio olfativo en desarrollo de ratones P30 (A-F, J) y P60 (G-I, K). La tinción nuclear se llevó a cabo utilizando DAPI. (A-C) La intensa inmunorreactividad contra CyK5 (rojo) se limitó a la capa donde se ubicaron las células basales horizontales (puntas de flecha). (D-F) Los somas celulares de las células inmunopositivas para CyK5 (puntas de flecha) normalmente se ubicaban en regiones más basales que los núcleos inmunorreactivos para PCNA (flechas). (G-I) Se detectó una fuerte inmunorreactividad contra CyK8 en los somas celulares ubicados en la superficie apical del epitelio olfativo (puntas de flecha), pero también en procesos finos que se proyectan hacia la superficie basal (flechas). (J) Se mostraron neuronas olfatorias maduras que expresan OMP (puntas de flecha) y sus cilios (flechas) en el epitelio olfatorio P30. La tinción anti-OMP también se localizó en haces de nervios dispersos por toda la lámina propia (asteriscos). (K) Las neuronas olfatorias teñidas con DBA aparecieron en las partes media y superior del epitelio P60 (puntas de flecha). **Abreviaturas:** LP, lámina propia; EO, epitelio olfatorio. Barras de escala: 100µm en A-J; 50µm en K.



3. Desarrollo embrionario del sistema olfatorio.

El sistema olfatorio se origina inicialmente a partir de dos placodas olfatorias ectodérmicas situadas simétricamente en el rudimento de la cabeza (Baker and Bronner-Fraser, 2001). Estas placodas se caracterizan por ser un engrosamiento del ectodermo que está íntimamente asociado a un mesodermo subyacente que podría derivar de células de la cresta neural que se han desprendido de la región dorsal del tubo neural (Balmer and LaMantia, 2005). No obstante, parece que en ese mesodermo existe una población mixta de células de la cresta neural y mesodérmicas (O'Rourke and Tam, 2002). Posteriormente, las placodas crecen, se invaginan para formar las fositas olfatorias que en un primer momento se encuentran bastante laterales, pero con el avance del desarrollo se desplazan desde regiones laterales a mediales de la cara en desarrollo (Balmer and LaMantia, 2005). La parte medial de estos rudimentos se fusiona para dar lugar al cartílago y la región lateral para dar lugar a la región nasal. La región del ectodermo que recubre estas fosas nasales dará lugar tanto al epitelio olfatorio como al epitelio respiratorio que conduce el aire a vías aéreas centrales más internas. El EO comenzará a lanzar axones que darán lugar al NO (LaMantia et al., 2000). Más tarde, un conjunto de células del epitelio que recubre un receso, se separa de la pared medial de la fosa olfatoria para formar el órgano vomeronasal (OVN), que continuará unido al EO (Taniguchi and Taniguchi, 2008; Suárez et al., 2012). Más tarde el OVN se separa completamente de la cavidad nasal, la fosa olfatoria madura y adquiere un lumen muy estrecho cerrado a ambos lados rostral y caudal (Fig.23) (Taniguchi and Taniguchi, 2008). Por otro lado, desde el telencéfalo en el tubo neural surgen dos protrusiones que darán lugar a los BOs, que dará lugar a las estructuras que actuarán como diana de las células del NO (Fig.23).

3.1 Epitelio olfatorio durante el desarrollo embrionario.

Durante el desarrollo embrionario, las CNS no se originan desde la población de células basales como en adulto. Las divisiones durante esta etapa suceden próximas a la superficie apical del EO. Las células se dividen en dos hijas que se elongan hacia la región basal mientras que el núcleo migra hacia regiones basales. Las células permanecen elongadas en G1, S y G2 del ciclo celular. En G2 las células comienzan a redondearse y la masa citoplasmática y el núcleo se mueven hacia la superficie libre del epitelio donde se divide para dar dos células hijas. Estas células que proliferan por mitosis en la superficie provocan el engrosamiento del EO en estadios tempranos (Taniguchi and Taniguchi, 2008).

Con el avance del desarrollo, el epitelio se engrosa considerablemente y es entonces cuando se establece una población de células basales que también adquieren capacidad proliferativa (Farbman, 1994; Taniguchi and Taniguchi, 2008). De esta forma, las divisiones basales son asimétricas y van a generar una célula basal y otra ya diferenciada a neuroblasto que va a permanecer quiescente en un principio hasta que comienza a extender dendritas hacia la zona apical y axones hacia la basal. La aparición simultánea de estos procesos celulares son los que otorgan las primeras evidencias de diferenciación de las CNS. El futuro axón en los momentos iniciales de la diferenciación comienza a crecer hacia la parte basal del EO buscando su objetivo en el BO, que junto a otros llegarán a formar el futuro NO. La dendrita apical por su parte se extiende rápidamente antes de que se complete la migración radial del soma a una región central del EO y poco tiempo después aparece el botón dendrítico en la superficie apical del EO, quedando expuesta a la cavidad olfatoria (Farbman, 1994; Liberia et al., 2019a). De esta forma, se establece un epitelio con núcleos a diferentes alturas, situándose el de las células madre en la región basal y el de las CNS en regiones mediales. Dentro de los núcleos de las CNS, los que están en regiones más basales corresponden a neuronas más indiferenciadas y los que están en regiones más apicales a neuronas maduras (ver a continuación).

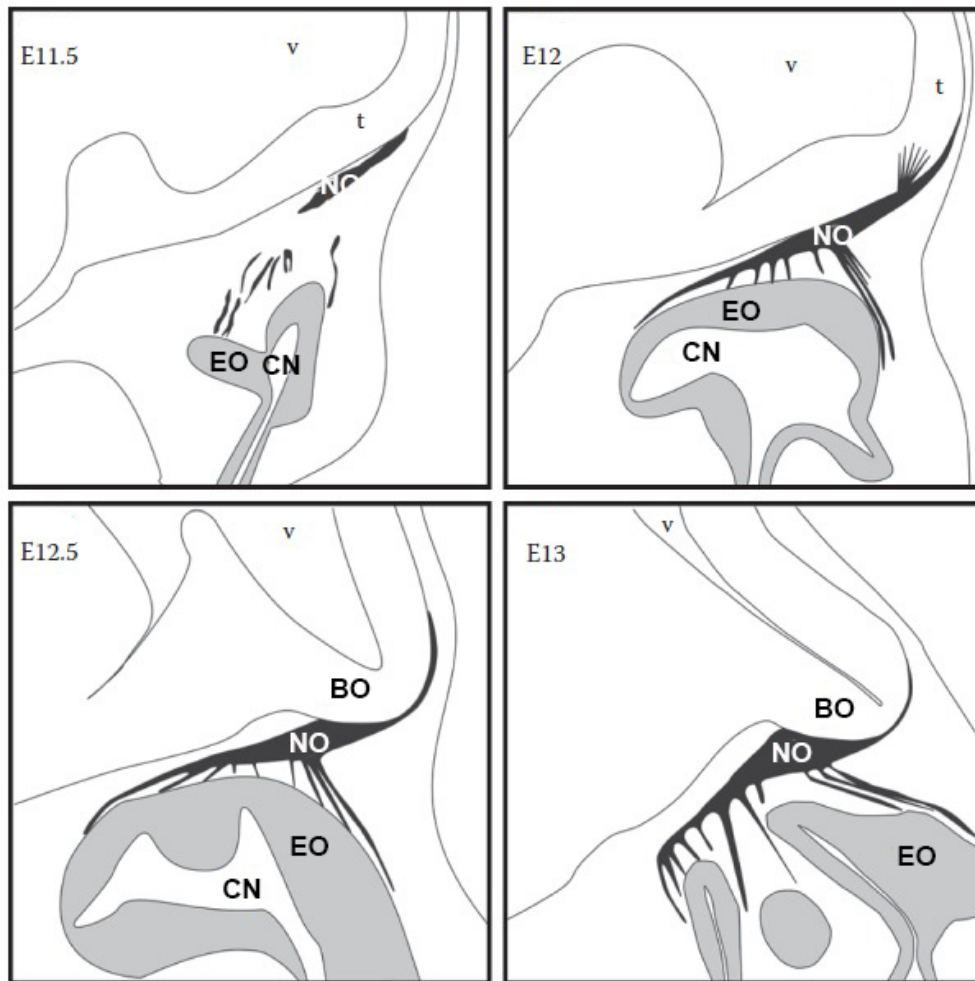


Figura 23. Diagrama esquemático de la formación del NO de ratón desde E11.5 hasta E13. En E11.5, los axones de NOS contactan primero con el telencéfalo, sin penetrar la membrana basal. Doce horas más tarde, en E12, los axones de NOS penetran la membrana basal, formando una capa de NO en el bulbo olfatorio presuntivo, y se observa que un pequeño subconjunto de axones de NOS penetrando más profundamente en el telencéfalo. En esta etapa temprana, el BO no se distingue macroscópicamente. En E12.5, el BO se vuelve macroscópicamente distinto, como una clara evaginación del telencéfalo. Los axones NOS forman un nervio distinto que termina en una capa nerviosa que cubre el BO recién formado. Ya no se observan los axones NOS de penetración profunda. En E13, el NO ha aumentado de tamaño a medida que más axones NOS se han extendido al BO. Diagrama adaptado de *The Neurobiology of Olfaction* (capítulo 5). **Abreviaturas:** t, telencéfalo; v, ventrículos; NO, nervio olfativo; CN, cavidad nasal; BO, bulbo olfatorio; EO, epitelio olfatorio.

4. Neurogénesis postnatal.

A diferencia de la gran mayoría de tejidos del sistema nervioso, la neurogénesis en el EO es continua durante la vida del individuo, pero es heterogéneo y asincrónico (Kondo et al., 2010; Brann and Firestein, 2014; Choi and Goldstein, 2018; Liberia et al., 2019a). Esto quiere decir que las células pueden estar en diferentes estados de madurez en el mismo tejido epitelial. Estos procesos dinámicos que tienen lugar en individuos adultos aportan un modelo ideal para estudiar la maduración de las CNS y el éxito de los axones para alcanzar su objetivo en adulto (Farbman, 1994; Beites et al., 2005; Liberia et al., 2019a). Es interesante comentar que la neurogénesis del EO apenas provoca la formación de tumores, lo que prueba su robusta regulación en este aspecto (Brann and Firestein, 2014).

En el EO maduro las CNS se producen continuamente mediante divisiones mitóticas en las poblaciones de células basales (Fig. 24 A-F). Como se ha comentado con anterioridad, una célula hija procedente de una mitosis asimétrica se desplaza apicalmente en el epitelio, mientras que crecen un axón y una dendrita, consiguiendo la madurez cuando su axón forma una sinapsis con el BO y la terminación de la dendrita alcanza la superficie del epitelio donde brotan los cilios. Por tanto, dentro del epitelio pseudoestratificado, los núcleos de células sensoriales en las capas más profundas pertenecen a células inmaduras (Farbman, 1994).

La neurogénesis del EO en adulto se relaciona sobre todo con la renovación de poblaciones de CNS inmaduras frente al remplazo de las maduras. Algunas CNS inmaduras al no obtener un sustento del BO, degeneran antes de alcanzar la madurez al contrario que las maduras que, al tener conexión con este, son estables. Esto implica que muchas neuronas recién nacidas no alcanzan una etapa madura, detectándose apoptosis incluso en tejido maduro (Fig. 24 G, H). (Brann and Firestein, 2014). Esto implica que, a medida que aumenta la vida del animal, la dinámica de recambio y degeneración en este EO va cambiando (Kondo et al., 2010; 2020).

Es por ello que la homeostasis tisular del EO, es decir, el mecanismo celular que reemplaza las células dañadas es esencial y actúa tan rápido como es posible para mantener la función olfatoria, muchas veces imprescindible para la supervivencia de los mamíferos (Kondo et al., 2010). Las CNS pueden actuar como vía de entrada de

patógenos al SNC por lo que son susceptibles de entrar en apoptosis como mecanismo de protección frente a infecciones (MacKay-Sim, 2010). El grosor del EO permanece estático en adulto gracias a un balance entre la neurogénesis y apoptosis (Farbman, 1994; MacKay-Sim, 2010; Liberia et al., 2019a). Es decir, al mismo tiempo existen axones jóvenes que crecen desde el EO hasta su objetivo en el BO y axones más viejos que se están degenerando (Nedelec et al., 2005a) (Fig.23). Se ha demostrado que la vida media de las células sensoriales en el EO de la rata es de unos meses (Carr and Farbman, 1993a).

Por su parte, la neurogénesis del EO en ratón ha sido descrita por numerosos autores y se ha comprobado que existen dos vías: la protagonizada por las CBG, que son las encargadas de la homeostasis habitual del EO tanto para CNS como para las CS y las CBH. Estas CBH permanecen quiescentes salvo que se produzcan graves daños en el EO, momento en el que adquieren gran capacidad proliferativa (Graziadei and Graziadei, 1979; Leung et al., 2007; Brann and Firestein, 2014; Goldstein et al., 2015). Esto provoca que el EO sea una región donde se encuentran poblaciones de células madre activas y en reserva para hacer frente a los daños provocados por el entorno (Brann and Firestein, 2014; Choi and Goldstein, 2018). A diferencia de la neurogénesis en embriones o recién nacidos, los tiempos de crecimiento y maduración axonal se prolongan en individuos adultos (Brann and Firestein, 2014). Los axones generados en adultos deben discurrir por estructuras ya formadas hasta tener contacto con el BO, lo que a su vez permite el mantenimiento del mapa de olores durante la vida del individuo (Fig.21) (Liberia et al., 2019a).

Como se ha comentado con anterioridad, la homeostasis del EO se ve afectada por la edad en su dinámica celular que controla el número de poblaciones neuronales y de sostén, así como mitosis de las células madre basales, diferenciación neuronal y muerte celular. Esto es debido a la reducción del número de células basales en proliferación, cambios en la composición de ambiente celular o la apoptosis en el EO, lo que conlleva a la pérdida de capacidad olfativa (prebiosmia) (Kondo et al., 2010; Brann and Firestein, 2014; Pinto et al., 2014).

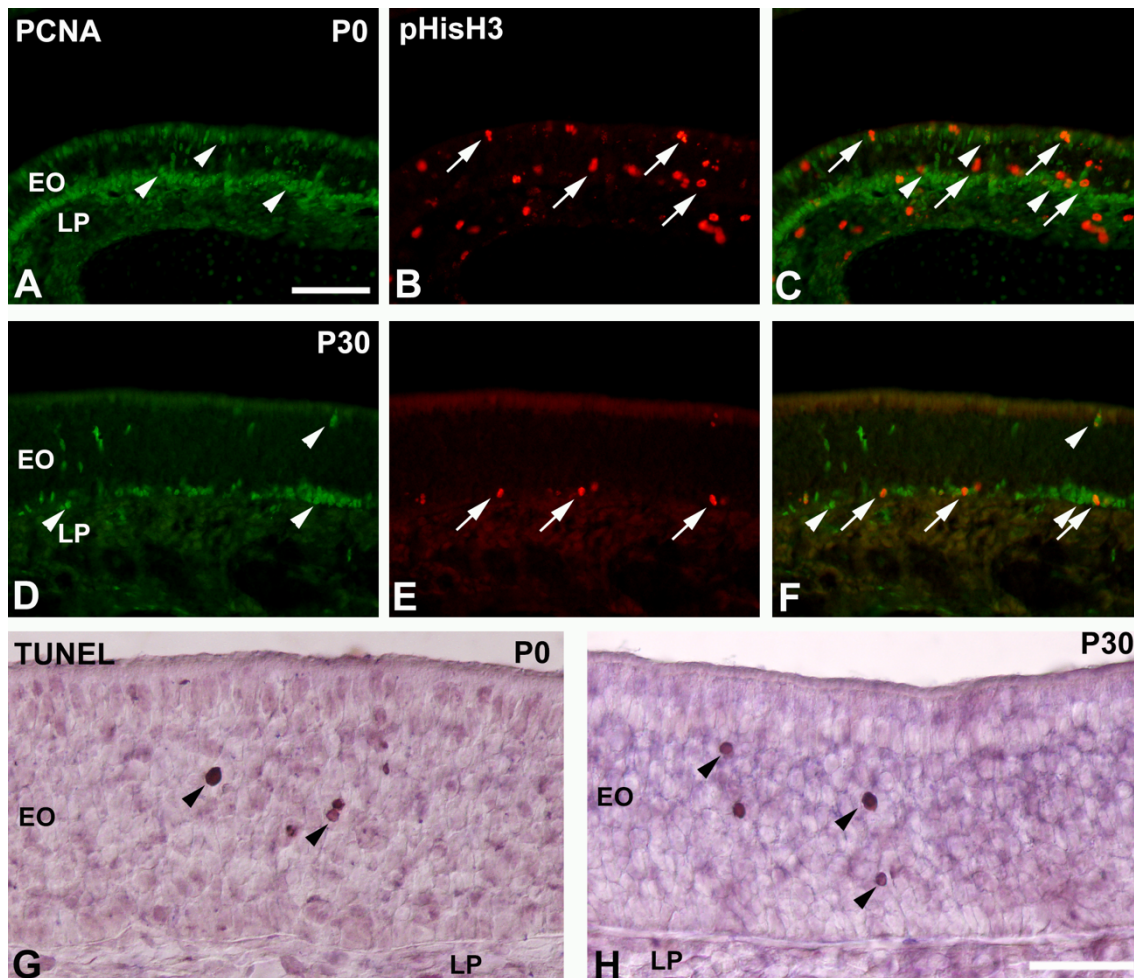


Figura 24. Distribución de marcadores de proliferación (A-F) y muerte celular (G, H) en el EO de ratón en desarrollo. (A-C) Se encontraron núcleos positivos para PCNA (puntas de flecha verdes) y figuras mitóticas inmunorreactivas a pHisH3 (flechas rojas) en las superficies apical y basal del epitelio olfatorio en P0. (D-F) Los núcleos positivos para PCNA (puntas de flecha verdes) y figuras mitóticas inmunorreactivas para pHisH3 (flechas rojas) se encontraron principalmente en la superficie basal del epitelio olfatorio en P30. También se encontraron núcleos celulares marcados con PCNA a diferentes profundidades dentro del EO. (G, H) Se encontraron núcleos positivos para TUNEL dispersos por todo el EO en P0 y P30 (puntas de flecha). **Abreviaturas:** LP, *lámina propia*; EO, *epitelio olfatorio*. Barras de escala: 100 μ m en A-F; 50 μ m en G, H.

5. Senescencia en el epitelio olfatorio durante el desarrollo embrionario.

De lo expuesto en el anterior apartado se extrae que la senescencia vinculada a la edad puede tener efectos sobre la homeostasis del tejido. Sin embargo, también se ha demostrado la presencia de células senescentes también en áreas muy específicas del embrión durante una determinada ventana temporal (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Davaapil et al., 2017; Villiard et al., 2017; Da Silva-Álvarez et al., 2020). Más concretamente, la utilización de la técnica histoquímica de detección de la actividad enzimática de la β -gal-pH6 ha determinado que existe un área de marcaje muy intensa en el EO de embriones tempranos (Villiard et al., 2017). Estos autores demostraron que las células marcadas con esta técnica histoquímica no son proliferativas. Por otra parte, también se ha demostrado que existe muerte celular durante el desarrollo embrionario del EO (Voyron et al., 1999), por lo que puede haber una relación entre el proceso de senescencia celular que puede estar detectándose con la histoquímica de la β -gal-pH6 y el proceso apoptótico.

Todo lo expuesto induce a pensar que el EO en diferenciación puede constituir un excelente modelo en el que estudiar la posible relación entre los procesos de senescencia y muerte celular que ocurren durante su desarrollo tisular, utilizando como herramientas la actividad β -gal-pH6 y otros marcadores de senescencia celular, muerte y diferenciación celulares en ratones recién nacidos y jóvenes.

OBJETIVOS CAPÍTULO 2.

II. OBJETIVOS Capítulo 2.

1. Investigar la presencia de β -gal-pH6 durante el desarrollo del epitelio olfativo del ratón durante la vida posnatal temprana.
2. Identificar las poblaciones de células que exhiben altos niveles de tinción de β -gal-pH6.

RESULTADOS CAPÍTULO 2.

III. RESULTADOS Capítulo 2.

1. Histoquímica de β -gal-pH6 en el desarrollo posnatal del epitelio olfatorio de ratón.

El marcaje de la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 se observó en criosecciones de la mucosa olfatoria de individuos de ratón desde el momento del nacimiento (P0) hasta individuos con dos meses de vida (P60) (Fig.25). En P0, la actividad β -gal-pH6 se detectó en una delgada banda localizada en la zona intermedia del neuroepitelio olfatorio (Fig.25A). Durante la primera semana de vida la intensidad del marcaje aumentó, mientras que el grosor de la banda fluctuó en los primeros estadios para incrementarse en P7 (Fig. 25 B-D, H). Tanto el aumento de intensidad como el incremento del espesor de la banda de marcaje histoquímico se hicieron más evidentes a partir de la segunda semana de vida (Fig. 25 E-G).

Una vez conocido el patrón de marcaje, nos propusimos identificar posibles coincidencias espacio-temporales con otros eventos fisiológicos como la proliferación celular, la muerte celular o la diferenciación celular. Los anticuerpos frente a PCNA y pHisH3 se usaron para identificar células proliferativas y figuras mitóticas, respectivamente, en el EO postnatal de ratón (Kondo et al., 2010) y rata (Weiler and Farbman, 1997, 1998). En P1, los núcleos PCNA inmunorreactivos y las figuras mitóticas pHisH3 positivas se localizaron mayoritariamente en la capa de CS y en la de CBG en (Fig. 26 A, B). En individuos de un mes de vida (P30) (Fig. 26 C, D) y de dos meses (P60) la actividad proliferativa y mitótica se sitúa en la región de las CBG (Fig. 26 E, F). Por tanto, la inmunoreactividad frente a PCNA/pHisH3 fue siempre encontrada basal o apicalmente con respecto a la banda de tinción de β -gal-pH6 durante el periodo analizado. También se ha descrito la presencia de muerte celular en las neuronas olfatorias en roedores durante la vida postnatal temprana (Carr and Farbman, 1993b; Robinson et al., 2002; Kondo et al., 2010) e incluso etapas más adultas (Deckner et al., 1997).

Finalmente, pretendimos establecer una relación entre el patrón de distribución de la actividad enzimática de la β -gal-pH6 y el de diferentes marcadores específicos de diferenciación celular. Así, con el objetivo de analizar la localización de CBH y de células

de soporte en el EO de ratón en desarrollo, usamos anticuerpos frente a CyK5 (Holbrook et al., 1995) y CyK8 (Maurya et al., 2015b), respectivamente. Las CBH inmunorreactivas para CyK5 se localizaron en la región basal del EO y en ningún momento estuvieron incluidas dentro de la banda β -gal-pH6 positiva (Fig.27 A). Por otra parte, los somas celulares inmunorreactivos para CyK8 de las CS se localizaron en la superficie apical del neuroepitelio y tampoco se solaparon con la banda de marcaje de β -gal-pH6 (Fig. 27 B-E). Por tanto, el soma de las CBH, CBG y CS nunca se encuentra incluido dentro de la banda de marcaje histoquímico de la β -gal-pH6.

Según se muestra, las células que expresan altos niveles de β -gal-pH6 son las neuronas olfativas que localizan su soma en la región central del EO. Para demostrar esta hipótesis, llevamos a cabo experimentos de doble marcaje usando marcadores específicos de estos tipos celulares en roedores, como son la DBA (Plendl and Schmahl, 1988), la OMP (Keller and Margolis, 1975), ambos específicos de neuronas olfativas diferenciadas, y la GAP43 (Verhaagen et al., 1989, 1990) que también identifica neuronas diferenciadas, pero también se localiza en neuronas que se encuentran todavía en proceso de diferenciación. En el día del nacimiento (P0), los somas celulares de neuronas positivas para DBA (Fig.27A) y para OMP (Fig.28B) se localizaron en una sola hilera que se distribuye dentro de la banda de marcaje con β -gal-pH6. En individuos de una semana de vida (P7), los somas de neuronas DBA-positivas se situaron a diferentes alturas en el eje apico-basal, pero siempre fueron encontrados dentro de la banda de marcaje de β -gal-pH6 (Fig.28C). En individuos de un mes (P30) (Fig.28D) y dos meses (P60) (Fig.28E) de vida, la mayoría de las neuronas inmaduras e inmunorreactivas frente a GAP43 se localizaron en regiones basales al marcaje de β -gal-pH6, aunque aquellas que se encuentran en un proceso de diferenciación más avanzado, se distribuyeron dentro de la banda del marcaje histoquímico (Fig. 28 D, E). En el caso de los somas celulares positivos para DBA y OMP, todos ellos se encontraron dentro de la banda de marcaje con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 en estos individuos de uno y dos meses de vida (Fig. 28 D-I).

Todos estos datos sugieren fuertemente que la β -gal-pH6 está altamente expresada en neuronas diferenciadas durante el desarrollo postnatal del epitelio olfatorio de ratón, aunque aquellas neuronas que se encuentran más indiferenciadas y que sitúan su soma

en regiones más basales, todavía no presentan una actividad β -gal-pH6 elevada y no resultan marcadas.

FIGURAS CAPÍTULO 2.

Figura 25. Patrón de distribución de la actividad enzimática de la β -gal-pH6 en el epitelio olfativo en desarrollo de ratones en P0 (A), P1 (B), P3 (C), P7 (D), P15 (E), P30 (F) y P60 (G). (A-F) La tinción de la β -gal-pH6 se restringió en todo momento a la región intermedia del epitelio olfatorio, si bien a medida que avanza la edad del individuo, esta banda parece hacerse más ancha. (H) El análisis cuantitativo de la relación entre el ancho de la banda de la tinción β -gal-pH6 y el espesor del epitelio olfatorio (EEO) mostró que el ancho de la banda de marcaje aumenta progresivamente con la edad. Los datos se expresan como media \pm SEM. La significación estadística se indica con asteriscos (** $p < 0,01$). **Abreviaturas:** LP, lámina propia; EO, epitelio olfatorio. Barras de escala: 100 μ m en (A-F); 50 μ m en (G).

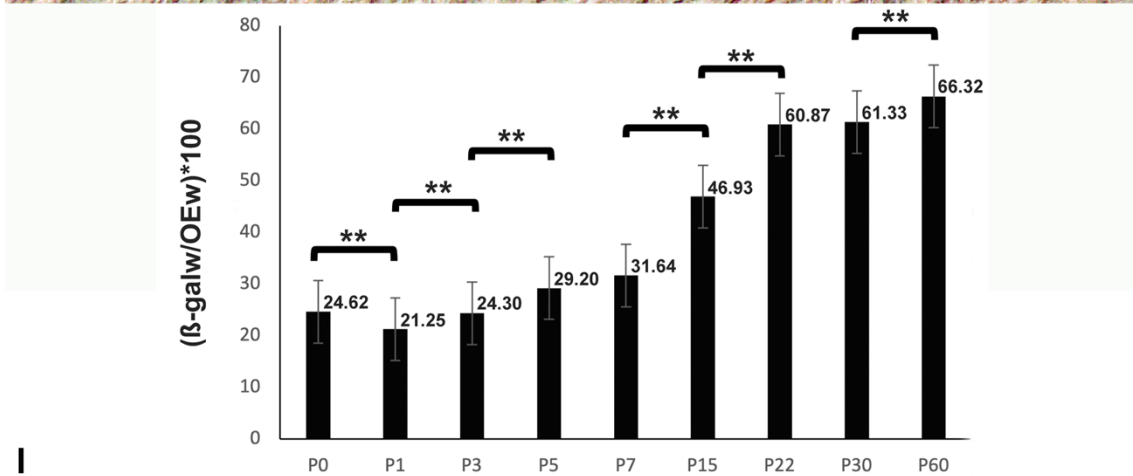
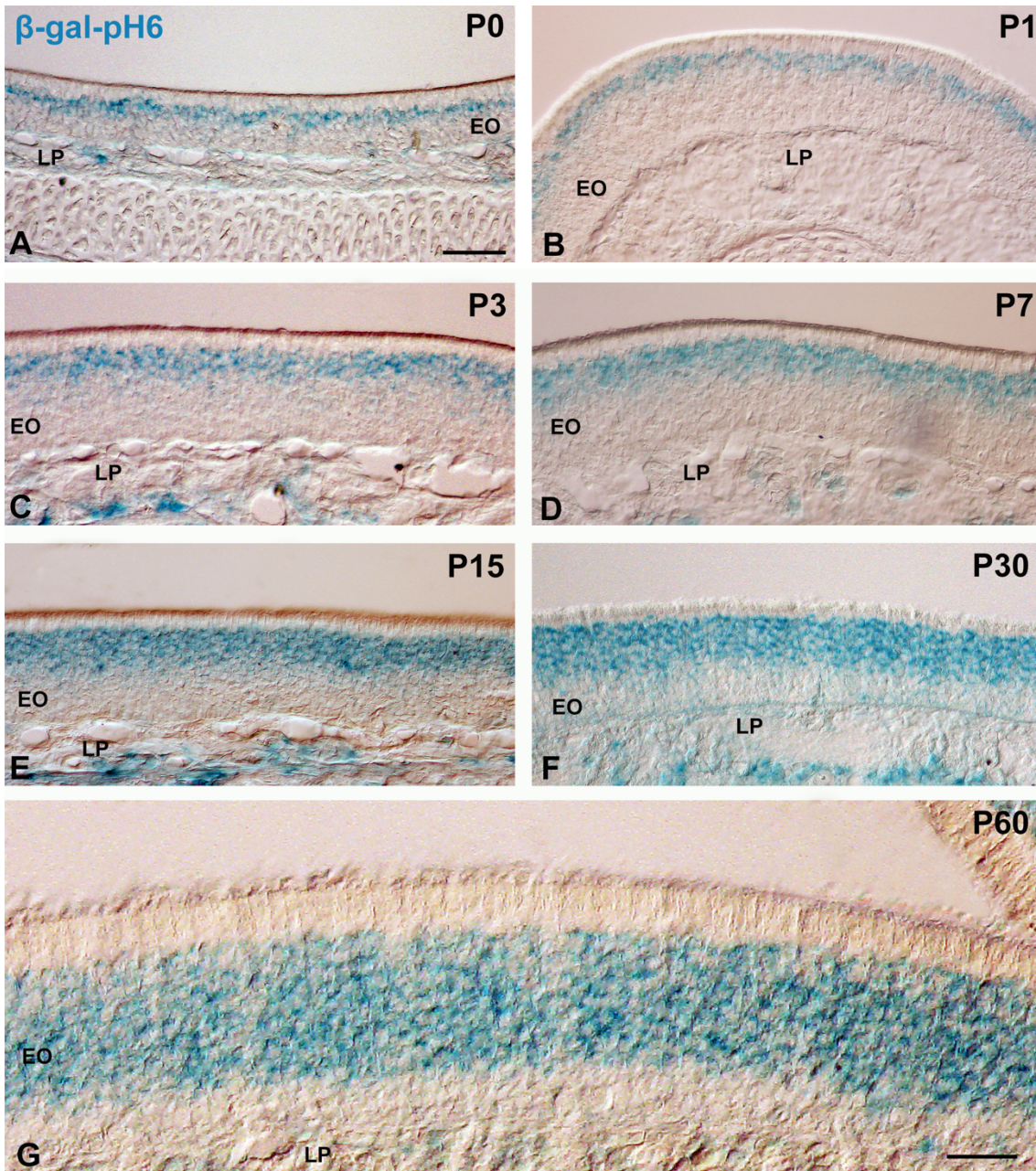


Figura 26. Relación entre la tinción histoquímica de la β -gal-pH6 y diferentes marcadores de proliferación en el EO de ratones de P1 (A, B), P30 (C, D) y P60 (E, F). Las criosecciones se tiñeron triplemente con la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 y anticuerpos PCNA/pHisH3 (A-D) o doblemente marcadas con la histoquímica de β -gal-pH6 y anticuerpos frente a pHisH3 (E) o PCNA (F). (A, B) En P1, los núcleos inmunorreactivos para PCNA (verde, flechas) y las figuras mitóticas positivas para pHisH3 (rojo, puntas de flecha) se localizaron principalmente en regiones basales y apicales del EO, alejadas por tanto de la banda de marcaje histoquímico para la β -gal-pH6. (C-F) En P30 y P60, se identificó una banda ancha de marcaje histoquímico de la β -gal-pH6 en la región intermedia del EO. Los núcleos PCNA-inmunorreactivos (flechas) y las mitosis pHisH3-positivas (puntas de flecha) se ubicaron principalmente en la región basal del epitelio. **Abreviaturas:** LP, *lámina propia*; EO, *epitelio olfatorio*. Barras de escala: 100 μ m en (A-D); 50 μ m en (E, F).

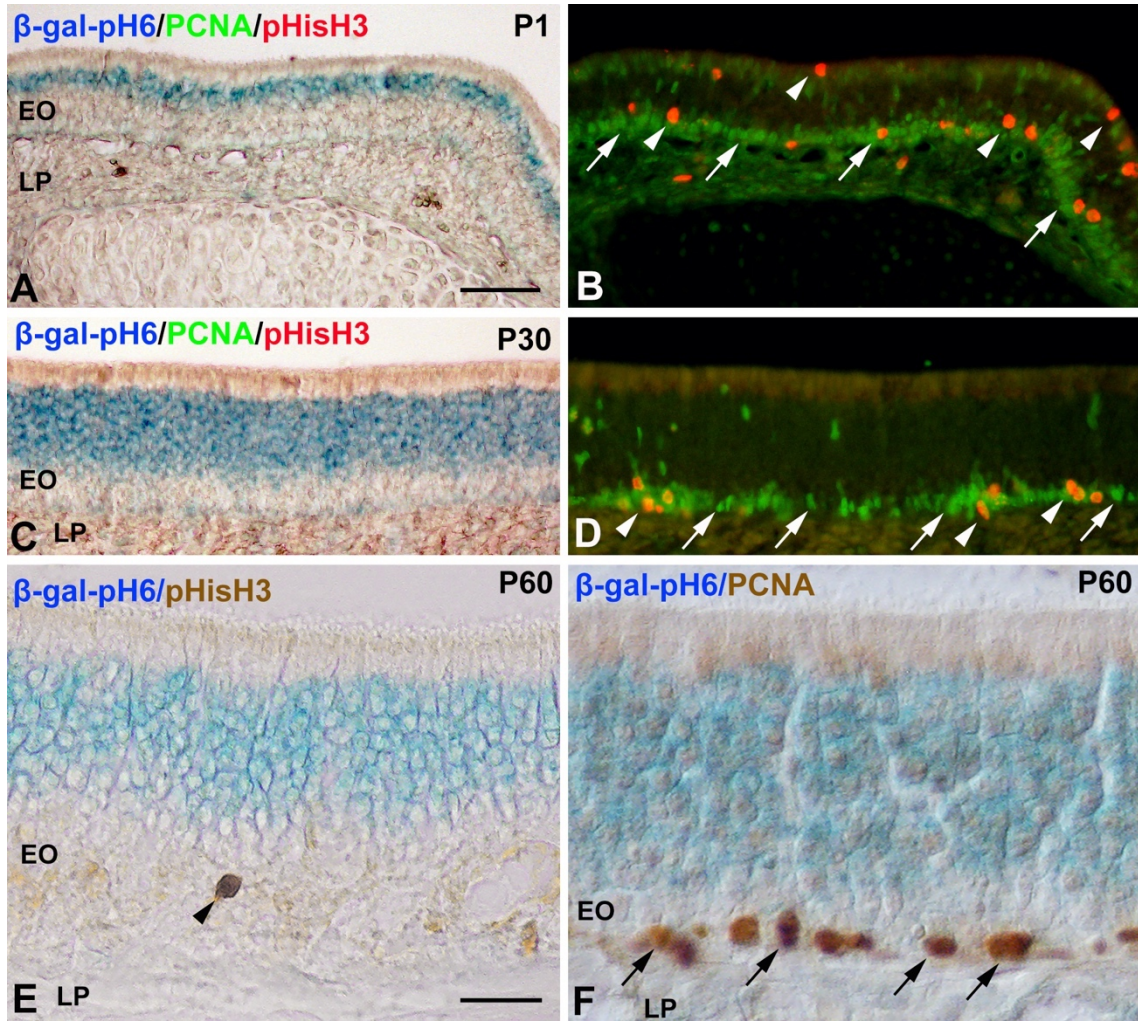


Figura 27. Relación entre el marcaje histoquímico de la actividad enzimática de la β -gal-pH6 y marcadores de células basales horizontales (CBH) (A) y de células de soporte (CS) (B-E) en el EO de ratones de dos meses de edad. Las criosecciones se marcaron doblemente con histoquímica de la β -gal-pH6 y anticuerpos frente a CyK5 (A) o CyK8 (B-E). (A) Las CBH inmunorreactivas a CyK5 se localizaron en la superficie basal del EO (doble cabeza de flechas) en una región negativa para la tinción β -gal-pH6. (B-E) Los cuerpos celulares de las células de soporte inmunorreactivos frente a CyK8 siempre se ubicaron apicalmente al marcaje histoquímico (asteriscos en B, C; flechas en D, E). Se observaron finas prolongaciones inmunorreactivas frente a CyK8 procedentes de las CS que se adentraban en la región positiva frente a β -gal-pH6 (puntas de flecha en C-E). **Abreviaturas:** LP, *lámina propia*; EO, *epitelio olfatorio*. Barras de escala: 100 μ m en (A-D); 15 μ m en (E).

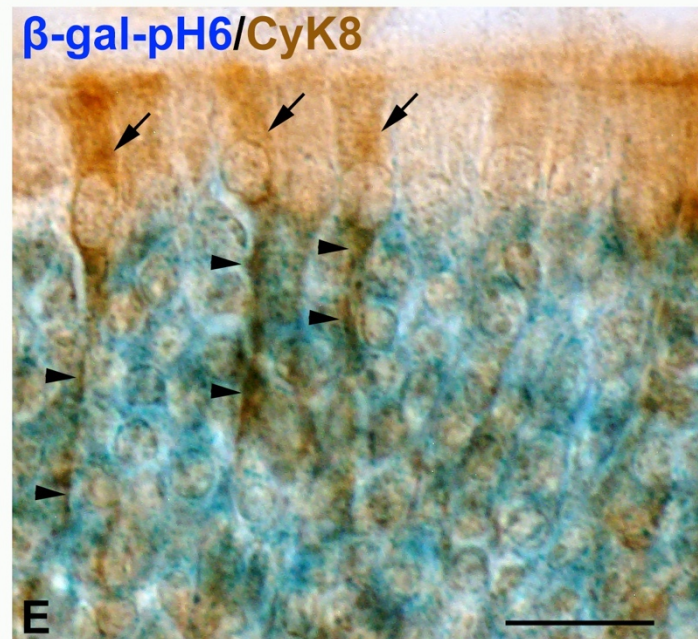
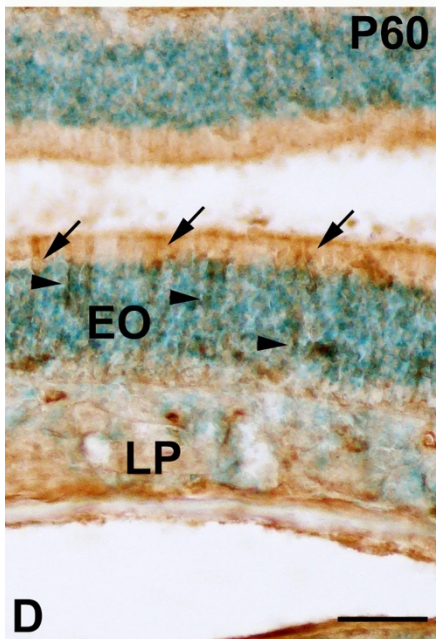
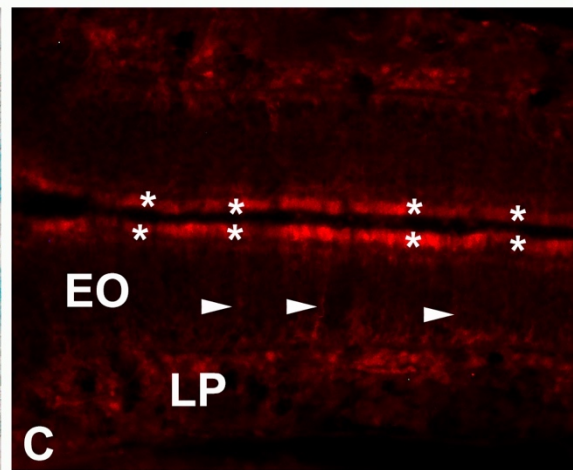
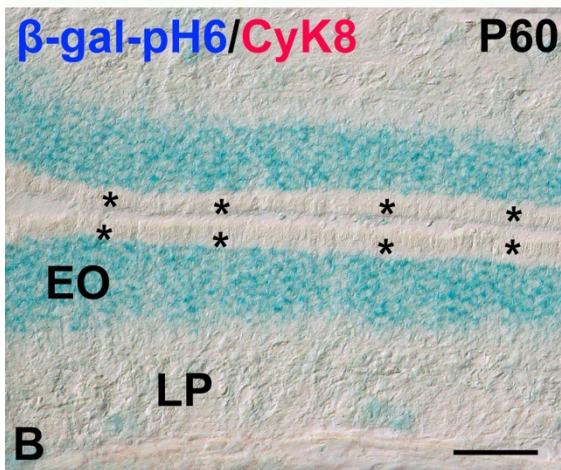
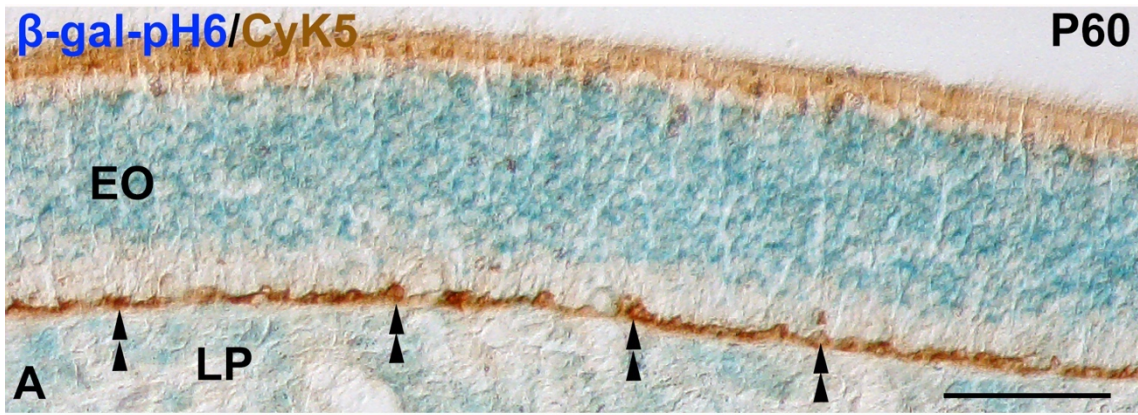
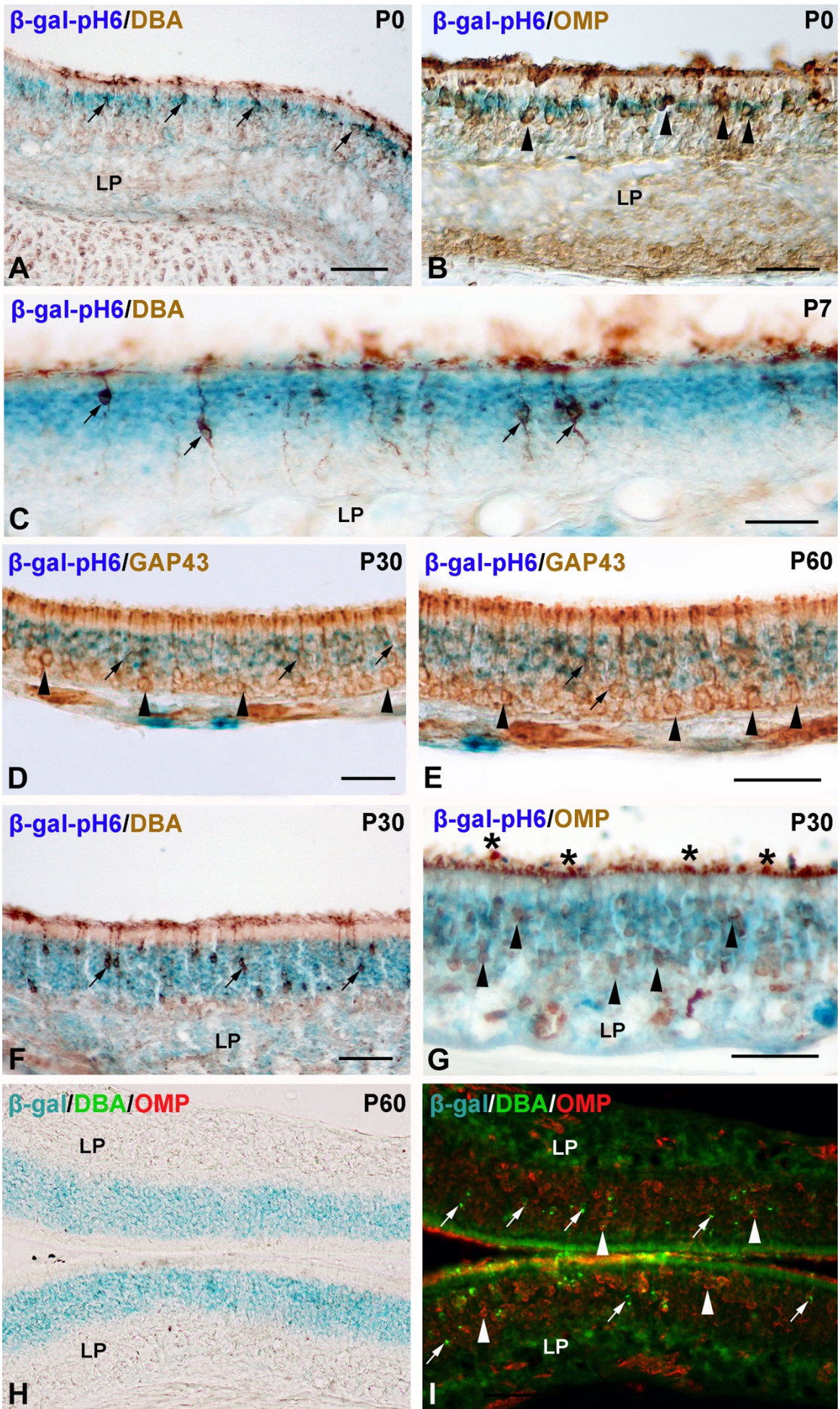


Figura 28. Relación entre la actividad enzimática de la β -gal-pH6 y diferentes marcadores neuronales en la mucosa olfatoria de ratones de edades P0 (A, B), P7 (C), P30 (D, F, G) y P60 (E, H, I). (A, B) Los somas celulares de neuronas DBA-positivas (flechas) o OMP-inmunoactivas (cabezas de flechas) se localizaron siempre dentro de la banda de tinción frente a β -gal-pH6. (C) En P7 los somas celulares de las neuronas DBA-positivas se situaron dentro de la banda de marcaje de la β -gal-pH6 (flechas). En P30 (D) y P60 (E), la mayoría de los somas de las neuronas inmunoactivas a GAP43 se ubicaron cercanos a la superficie basal del epitelio olfatorio en una región negativa para la tinción de β -gal-pH6 (puntas de flecha), aunque algunos de ellos se localizaron dentro de esta banda (flechas). En P30 (F, G) y P60 (H, I), los somas celulares de las neuronas positivas para DBA (flechas) y OMP (puntas de flecha) se localizaron principalmente dentro de la banda positiva para β -gal-pH6. Hay que reseñar que la superficie apical del epitelio siempre aparece teñida con todos estos marcadores. **Abreviaturas:** LP, *lámina propia*. Barras de escala: 100 μ m.



DISCUSIÓN CAPÍTULO 2.

V. DISCUSIÓN Capítulo 2.

En este estudio se ha descrito por primera vez la localización cronotopográfica del marcaje de la actividad β -gal-pH6 durante el desarrollo postnatal del EO en ratón. Como se observa, el marcaje aparece en forma de banda continua en la región intermedia del EO y este va aumentando su anchura acorde al progreso del epitelio en desarrollo. Su localización cronotopográfica coincide con la distribución de neuronas olfatorias diferenciadas en este tejido. Sin embargo, en la región próxima a la LB donde se localizan neuronas inmaduras, identificadas con GAP43, el marcaje se encuentra ausente. Estos resultados demuestran que la actividad β -gal-pH6 se relaciona intensamente con la diferenciación neuronal y no con la senescencia en el EO.

Se sabe que hay presencia de muerte celular en las neuronas olfatorias durante la vida postnatal temprana en roedores (Carr and Farbman, 1993b; Robinson et al., 2002; Kondo et al., 2010) e incluso etapas más adultas (Deckner et al., 1997), pero los núcleos apoptóticos aparecen dispersos en el EO en la etapa postnatal (Kondo et al., 2010). Debido a que el marcaje de la actividad β -gal-pH6 formó una banda densa y continua en la región intermedia del EO, los resultados de que exista una correlación clara entre el patrón del marcaje β -gal-pH6 con la distribución de núcleos apoptóticos en este tejido es inexistente. Estos resultados son similares a los encontrados en la retina en desarrollo descritos en el capítulo anterior.

Coincidiendo cromotipográficamente con el ensanchamiento de la banda del marcaje de la actividad β -gal-pH6 durante los primeros días de vida, existe un aumento en el número y distribución de células neuronales olfatorias diferenciadas positivas para OMP y DBA, siendo similar a lo descrito para neuronas diferenciadas en otros estudios con roedores (Farbman and Margolis, 1980; Graziadei et al., 1980).

Por lo tanto, lo que aquí se sugiere es que el patrón de marcaje de la actividad lisosómica β -gal-pH6 se relaciona enteramente con poblaciones de neuronas olfatorias diferenciadas. Existen estudios donde se describe la intensa presencia de β -gal-pH6 no solo en el SNC de adulto (Chernova et al., 2006; Bhanu et al., 2010; Geng et al., 2010; Dong et al., 2011; Jurk et al., 2012; Piechota et al., 2016; Musi et al., 2018; Raffaele et al., 2020), sino en poblaciones de ratones muy jóvenes (Jurk et al., 2012; Piechota et al.,

2016; Musi et al., 2018; Raffaele et al., 2020). Estas mismas neuronas postmitóticas que expresan el marcaje β -gal-pH6 son positivas para otros marcadores de senescencia como p16 o p21 (Raffaele et al., 2020), algo que se ha visto también en el capítulo anterior para la retina. Sin embargo, el marcaje en el EO es homogéneo mientras que en el retinal se restringe a subpoblaciones de células neuronales diferenciadas. También se ha detectado β -gal-pH6 en subpoblaciones de motoneuronas diferenciadas tempranamente en la medula espinal embrionaria de roedores (Domínguez-Bautista et al., 2021).

Es por ello que las neuronas recién nacidas localizadas próximas a la superficie basal del EO experimentan cambios morfológicos a medida que se diferencian en neuronas olfativas maduras. Es en esta transición donde presentan un aumento de la actividad β -gal-pH6. La histoquímica de β -gal-pH6, por tanto, podría ser usada como una herramienta histoquímica y/o neuroanatómica para identificar de forma específicas neuronas olfativas. Junto a esto, se ha demostrado que la actividad β -gal-pH6 se ve aumentada en otras células postmitóticas como miofibras del músculo esquelético, plexo coroideo, células pancreáticas, células basales/madre en el epitelio intestinal, osteocitos y osteoclastos en ausencia de patologías o envejecimiento avanzado, además de coincidir topográficamente con múltiples marcadores de senescencia (Raffaele et al., 2020; von Zglinicki et al., 2020). Se ha sugerido que esta senescencia celular postmitóticas en células diferenciadas podría estar relacionada en la homeostasis tisular en condiciones fisiológicas (Sapieha and Mallette, 2018). Este proceso desempeñaría un papel fundamental en las células que no se dividen durante el desarrollo normal o el envejecimiento.

Con este estudio se fomenta la exploración de la posible función de la actividad de β -gal-pH6 y otros marcadores de senescencia en tejidos sanos de organismos embrionarios, jóvenes y de mediana edad.

CONCLUSIONES CAPÍTULO 2.

VI. CONCLUSIONES Capítulo 2.

1. La actividad β -gal-pH6 aparece marcada en el epitelio olfatorio en el desarrollo postnatal en forma de banda continua e incrementa su anchura a medida que progresa el desarrollo acompañando el aumento en grosor de este epitelio.
2. Nuestros resultados sugieren que la actividad β -gal-pH6 aparece en estados de diferenciación celular, ya que en las regiones basales donde se encuentran las neuronas inmaduras la actividad β -gal-pH6 no se detecta. Sin embargo, en las regiones donde las neuronas olfatorias aparecen diferenciadas muestran un intenso marcaje.
3. Los núcleos apoptóticos aparecen individualizados en el epitelio olfatorio y no muestran actividad β -gal-pH6, lo que implica que el estado senescente no precede al proceso apoptótico.

CAPÍTULO 3

Extremidad de vertebrados.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Extremidades de vertebrados.

Las extremidades de los vertebrados exhiben un alto grado de homología en términos de estructura básica y sistemas de desarrollo subyacentes, lo que indica una historia evolutiva compartida de desarrollo de las extremidades. Las extremidades son estructuras complejas, pero al mismo tiempo poseen un patrón esquelético fácil de observar. Es por esto por lo que la formación del esqueleto en aves se ha utilizado como modelo embriológico desde los inicios de la biología del desarrollo como disciplina de estudio. En aves se observa una mayor diferencia morfológica al resto de vertebrados, pero sus huesos son similares a los que encontramos en la filogenia de los mismos. Así, podemos dividir las extremidades en tres segmentos, siendo el primer segmento el estilopodio (correspondiente al húmero o fémur), el segundo segmento el denominado zeugopodio (cúbito/radio, tibia/peroné) y el tercer elemento, el autopodio (correspondiente al carpo, metacarpo y falanges en el miembro superior y tarso, metatarso y falanges en el miembro inferior) (Fig.29A). Además, otra característica interesante desde el punto de vista morfológico es el número de dedos y las falanges que presentan los mismos. Al contrario que en la mayoría de los mamíferos, las aves poseen tres dedos en el miembro superior y cuatro en el miembro inferior. Además, el número de falanges en los dedos es distinto. Los dedos se nombran con números sucesivos comenzando por el dedo más anterior (el pulgar en mamíferos). De esta manera, en el miembro superior tenemos una fórmula de número de falanges 2-2-1 (Fig.29A) y en el miembro inferior la fórmula de número de falanges es 2-3-4-5 (Fig.29B). Además, los eventos de la formación de los dedos están acompañados en las especies con dedos libres de la represión de la membrana interdigital por apoptosis (Fig.29C flechas y D asteriscos).

2. Desarrollo de las extremidades.

El desarrollo de las extremidades comienza con la formación de dos pares de esbozos en los cuales las células mesodérmicas distales conforman la denominada zona de progreso. Las células de la zona de progreso (ZP) se mantienen en un estado indiferenciado y de proliferación bajo la influencia de los factores de crecimiento fibroblástico (*fibroblast growth factors, FGFs*) (Montero et al., 2001), producidos por la cresta ectodérmica apical (*apical ectodermal ridge, AER;*) (Martin, 1998; Shimizu et al., 2007). La AER es una estructura ectodérmica transitoria especializada fundamental para la organogénesis de la extremidad, ya que es el principal centro organizativo que controla su crecimiento a lo largo del eje próximo-distal (desde la inserción de la extremidad en el tronco hasta la punta de los dedos) (Fernández-Terán and Ros, 2008) (Fig.30B). Morfológicamente, la AER es un engrosamiento del ectodermo en la parte distal del esbozo de la extremidad que la recorre a lo largo de su eje antero-posterior (Fig. 30 A, C). Es una estructura fundamental para la organogénesis de la extremidad ya que la proliferación de la ZP se debe a la secreción de moléculas por parte de la AER.

2.1 Etapas del desarrollo de la extremidad e influencia de la AER.

La actividad de la AER durante el desarrollo de la extremidad se puede dividir en cuatro etapas: iniciación, maduración, mantenimiento y de regresión. Aunque la estructura de la AER difiere entre vertebrados, su importancia funcional para la formación de la extremidad es un rasgo característico y conservado durante el desarrollo embrionario (Lewandoski et al., 2000; Moon et al., 2000; Sun et al., 2002; Barrow et al., 2003).

La diferenciación en el cartílago se produce cuando estas células distales de la ZP son desplazadas proximalmente y pierden la influencia de la AER. Una vez que dejan la influencia de la AER, los genes *Sox* y las proteínas morfogenéticas de hueso (*bone morphogenetic proteins, BMPs*) parecen ejercer un papel central en el control de la condrogénesis de los agregados condrogénico (Chimal-Monroy et al., 2003a).

Junto a estas, otras moléculas señalizadoras con gran importancia en este proceso son *Wnt*, que controla el patrón dorso-ventral (Church and Francis-West, 2002; Loganathan et al., 2005) o los factores de crecimiento transformantes β (*transforming growth factor*

beta, TGF- β) involucradas en la condrogénesis del esqueleto (Gañán et al., 1993; Gañán et al., 1996; Guasto and Cormier-Daire, 2021).

El proceso de crecimiento de la extremidad a lo largo del eje próximo distal acaba con el desarrollo de la última falange. Las estructuras de la extremidad, inicialmente formadas por tejido cartilaginoso, serán después sustituidas por tejido óseo, por un proceso de osificación endocondral y cuyo patrón en los distintos segmentos de la extremidad está controlado por genes *hox* (Zakany and Duboule, 2007; Fernández-Terán and Ros, 2008).

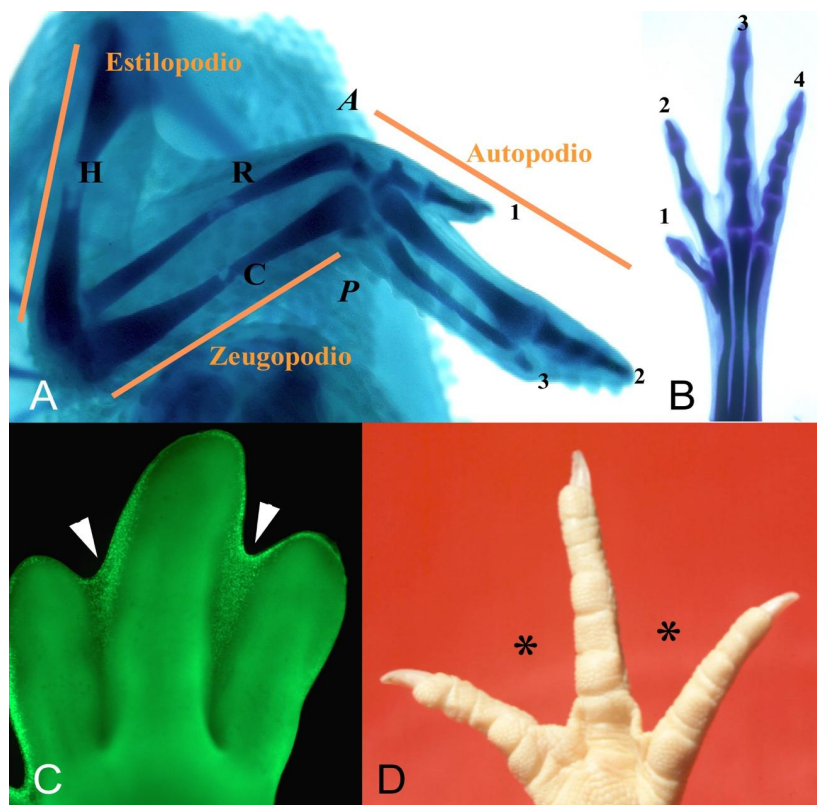


Figura 29. A: posición de los segmentos de la extremidad superior en aves. B: extremidad inferior de ave donde se hace referencia al número que corresponde a cada dedo. C: espacios interdigitales de *G. gallus* donde se observa apoptosis mediante marcaje con Fast Green. Las flechas en C señalan inicios de regresión de la membrana interdigital. D: extremidad inferior de *G. gallus* adulto. Los asteriscos señalan la desaparición total de la membrana interdigital. **Abreviaturas:** H, Húmero; R, Radio; C, Cúbito.

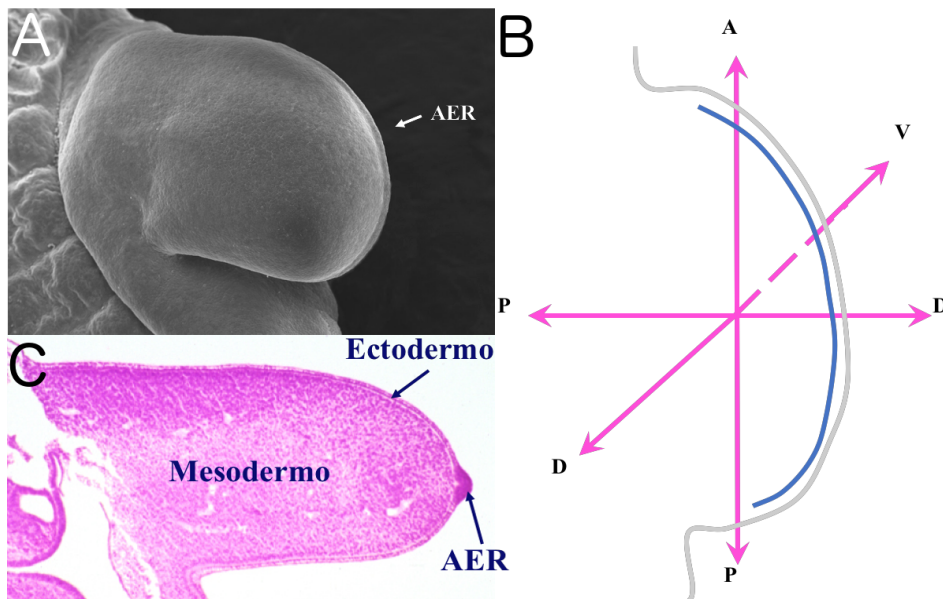
2.2 Actividad apoptótica durante el desarrollo de las extremidades.

Durante la formación de dedos, la AER actúa como centro regulador en los miembros, proporcionando un modelo valioso de muerte celular programada. Esta muerte esculpe el tejido interdigital en diversos grados y confiere la morfología a la parte final de las extremidades, de acuerdo con la especialización funcional de una especie para nadar (patos y tortugas), volar (murciélagos), o caminar (pollos, humanos y lagartos) (Fallon and Cameron, 1977; Hurlé et al., 1996; Penaloza et al., 2006; Weatherbee et al., 2006). Es un proceso complejo donde hay apoptosis masiva, detención del crecimiento y remodelación matricial de los tejidos interdigitales (Lorda-Díez et al., 2015b).

En dicho proceso, las células mesenquimales de la PZ son impulsadas hacia la condrogénesis o apoptosis y está genéticamente controlado e influenciado por las interacciones AER-mesénquima. Las células bajo la influencia del bucle FGF10-SHH y FGF8 se mantienen indiferenciadas (Montero et al., 2001). Cuando dejan la influencia de la AER y llegan a una posición más proximal, factores como los BMPs inician la cascada condrogénica (Zeller et al., 2009). Además, los BMPs a través de la actividad de Smad8, inducen a su vez apoptosis, lo que contribuye a la regresión del tejido interdigital. También *smad8* actúa en otras áreas de muerte celular durante el desarrollo de la extremidad del pollo como son las zonas necrótica anterior y posterior (*anterior necrotic zone*, ANZ y *posterior necrotic zone*, PNZ). Se ha visto que el patrón de expresión del Smad8 en el mesodermo anterior es muy similar al observado en las extremidades marcadas para detectar muerte celular (Abarca-Buis et al., 2011). De hecho, los complejos SMAD son mediadores entre la activación la transcripción del gen p21 y la vía de TGF- β que actúa previamente en la senescencia (Kuilman et al., 2010; Acosta et al., 2013; Guasto and Cormier-Daire, 2021).

En el caso del espacio interdigital donde se ha estudiado con más detalle el proceso apoptótico, se ha visto que los propios FGFs son necesarios para que se produzca la muerte celular programada (Montero et al., 2001). Otras moléculas de la familia de los WNT también son importantes en este proceso de muerte siendo activadas, por ejemplo, el inhibidor Dkk-1 durante la regresión de los espacios interdigitales (Grotewold and Rüther, 2002). Por otro lado, la aplicación de moléculas con actividad condrogénica como TGF- β 1 en el espacio interdigital consigue revertir el destino

apoptótico de las células, inhibiendo de esta manera el proceso de muerte celular programada (Chimal-Monroy et al., 2003b).



2.3 Senescencia durante el desarrollo de la extremidad.

En la AER, las células senescentes sufren un destino de muerte celular y eliminación mediada por procesos inmunes. El papel de la apoptosis y la fagocitosis mediada por macrófagos en la muerte celular interdigital está bien establecido, al igual que la eliminación celular mediada por inmunidad en la senescencia adulta (Wood et al., 2000; Xue et al., 2007; Kang et al., 2011). Sin embargo, queda por demostrar si las células senescentes en la extremidad sufren apoptosis antes de la eliminación de residuos o si los macrófagos inducen directamente la apoptosis en las células senescentes (Lang and Bishop, 1993). Se ha observado que los macrófagos son reclutados para que se encuentren adyacentes a la AER senescente antes de la aparición de la muerte celular (Rae et al., 2007), lo que sugiere que una función primaria de la senescencia es contribuir al equilibrio celular del tejido, reclutando macrófagos hacia lugares donde finalmente

serán necesarios para la fagocitosis. Además, como los macrófagos embrionarios pueden tener funciones tróficas mediadas por la instrucción CSF1 (Rae et al., 2007; Qian and Pollard, 2010), se puede especular que la senescencia en desarrollo contribuye indirectamente al patrón del tejido, contribuyendo a la eliminación de células y el remodelado de tejidos (Chizhikov and Millen, 2004; Muñoz-Espín et al., 2013). Esto indica que tanto la apoptosis como la senescencia programada para el desarrollo desempeñan papeles importantes en la eliminación de estructuras no deseadas y en el modelado. Los primordios de los dedos y las regiones interdigitales retienen suficiente plasticidad para intercambiar sus destinos hasta etapas muy avanzadas de desarrollo (Hurlé et al., 1996). Por lo tanto, el desenmarañamiento de la maquinaria molecular que determina si un progenitor de la PZ experimenta senescencia y muerte celular o si prolifera y se diferencia para formar un dedo es de gran relevancia biológica (Banito and Lowe, 2013).

En el tejido interdigital regresivos se detecta una activación intensa de β -gal-pH6 característica de la senescencia celular (Debacq-Chainiaux et al., 2009a; Muñoz-Espín and Serrano, 2014). En particular, el patrón de marcaje de la actividad de β -gal-pH6 en los tejidos interdigitales se correlaciona estrechamente con la progresión de la muerte celular durante la remodelación interdigital. Esta correlación también se observó en otras áreas de la muerte celular embrionaria, incluido el cierre de la lente, la extremidad AER y el corazón en desarrollo (Lorda-Díez et al., 2015b, 2019).

Una característica notable de la regulación de la muerte celular interdigital es la participación combinada de varios mecanismos de muerte, pero se desconoce su coordinación. Btg2 aparece implicado en uno de estos mecanismos en cooperación con p21, en la promoción de la parada del ciclo celular, la muerte celular dependiente de caspasas y la regulación al alza transcripcional de los componentes SASP (Lorda-Díez et al., 2015a). Se ha sugerido que p21 contribuye a muchos aspectos del estado senescente, previniendo la proliferación y la apoptosis, al tiempo que regula la secreción de factores SASP (Yosef et al., 2017). Sin embargo, en OIS, los niveles de p21 no se mantienen y vuelven a niveles casi normales a medida que p16 aumenta para establecer la irreversibilidad del proceso (Alcorta et al., 1996). La pérdida de p21 se asocia con apoptosis en el mesénquima de la extremidad (Vasey et al., 2011), lo que sugiere que la

unión de expresión p21-p16 podría representar un paso crítico en la determinación del destino de la apoptosis por senescencia de las células.

Se ha comprobado que una regulación a la baja de algunas células positivas a p21 pueden volver a entrar en el ciclo celular y reanudar su proliferación, lo que da ejemplo de la heterogeneidad de poblaciones celulares que expresan p21 (Li et al., 2018).

La senescencia, por tanto, parece ser un mecanismo celular utilizado durante el desarrollo de la extremidad para modular el crecimiento y patrón del autopodio en distintas especies.

OBJETIVOS CAPÍTULO 3.

II. OBJETIVOS Capítulo 3.

1. Investigar la presencia de β -gal-pH6 durante el desarrollo de la extremidad inferior de pollo en desarrollo embrionario.
2. Identificar la coincidencia de la senescencia con áreas de apoptosis en la extremidad inferior de pollo en desarrollo embrionario.
3. Identificar moléculas señalizadoras que controlen la extensión de las áreas senescentes en el desarrollo de la extremidad inferior de *Gallus gallus* en desarrollo embrionario.

RESULTADOS CAPÍTULO 3.

III. RESULTADOS Capítulo 3.

1. Histoquímica de β -gal-pH6 en áreas de degeneración durante el desarrollo de extremidades inferiores de pollo.

Se ha descrito que la actividad senescente programada es requerida durante el desarrollo embrionario de vertebrados y aparece fuertemente correlacionada con la distribución de las regiones apoptóticas. La tinción de la actividad β -gal-pH6 aparece de forma intensa en distintas estructuras del embrión previas a su degeneración (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Tal correlación cronotopográfica entre áreas senescentes y apoptóticas aparece de forma muy evidente en el desarrollo de las extremidades. En los estadios iniciales del desarrollo de la extremidad el control de su crecimiento es regulado por la AER, que es una estructura delgada en el borde distal de la extremidad (Fig. 31 A, E, I). La AER es un centro señalizador que se mantiene hasta la formación de todas las falanges (Rodríguez-León et al., 2013). De forma paralela, la apoptosis que presenta la AER (Fig. 31 E, I) coincide con la distribución de la actividad β -gal-pH6 (Fig.31A) junto a otros marcadores de senescencia (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015b; Li et al., 2018).

Además, la extremidad en estadios más avanzados presenta áreas de apoptosis en los márgenes anterior y posterior y en las áreas interdigitales con el objetivo de esculpir la forma final del órgano (Montero et al., 2020). Uno de los marcadores clásicos para la detección de muerte es el uso de Rojo Neutro (R.N) (Fig.31 E-H). Con él se puede observar cómo desaparece la AER (Fig.31E) y como progresa la apoptosis en el tejido interdigital (Fig. 31 I-K). Sin embargo, el R.N. no permite detectar el proceso activo de apoptosis durante el desarrollo de tejidos frente a la necrosis que es pasiva. Por ello, se realizó el ensayo TUNEL para detectar apoptosis en la extremidad en desarrollo (Fig. 31 I-L). Como se observa en la Figura 31, las técnicas de R.N. y TUNEL que marcan células interdigitales en apoptosis coinciden de forma evidente con el patrón del marcaje de la actividad β -gal-pH6, demostrando así la correlación entre ambos procesos.

2. Secciones histológicas de extremidades inferiores de pollo en desarrollo.

Para un análisis más detallado de la distribución de la actividad β -gal-pH6 en las extremidades inferiores en desarrollo de pollo, se decidió realizar tinciones cromogénicas de X-gal sobre secciones de estas. Para ello, este análisis se ha enfocado sobre estadios donde se comienzan a formar los dedos y se produce la retracción de los espacios interdigitales por apoptosis.

Las mayores concentraciones del precipitado generado por la actividad β -gal-pH6 se encuentran en las zonas interdigitales en regresión y rodeando las diáfisis de las falanges. Esta característica es un sello distintivo de la senescencia celular (Lorda-Díez et al., 2015a). En particular, el patrón de marcaje de la actividad de β -gal-pH6 en los tejidos interdigitales se correlaciona estrechamente con la progresión de la muerte celular durante la remodelación interdigital. (Muñoz-Espín et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015b; Montero et al., 2016). Esta remodelación también está relacionada con la que ocurre en las falanges (Montero et al., 2020).

La actividad β -gal-pH6 se detecta inicialmente en el estadio de desarrollo HH29 en forma de precipitado puntual donde se pueden distinguir las células en estado senescente marcadas en azul, localizadas en los flancos de las extremidades (Fig. 32 A, A' puntas de flechas). Esa distribución coincide con la que se observa en las regiones en apoptosis aproximadamente en los mismos estadios (Fig. 32 F, J, punta de flecha). El HH31 muestra las mismas características que el estadio anterior, junto con una zona interdigital marcada. Las células individualizadas poseen un tono más intenso, indicando mayor masa lisosomal (Fig.32B punta de flecha, B' asteriscos). La tinción con R.N. mantiene la distribución de la actividad β -gal-pH6 y también se ve más intensificada en el mismo estadio que en los anteriores (Fig.31G, punta de flecha).

No es hasta el HH33 donde se produce un marcaje generalizado a lo largo de los flancos del dedo. En la visión general del dedo (Fig.32C puntas de flechas), se puede apreciar un gradiente de marcaje, siendo mayor en zonas proximales y menor en distales del autopodio, lo que concuerda con los diferentes grados de madurez que se producen durante el desarrollo de las extremidades (Fernández-Terán and Ros, 2008).

En las imágenes ampliadas se puede observar mayor agregado de células senescentes y una zona interdigital donde se ha iniciado ya la regresión (Fig.32 C', C''). La mayor intensidad de actividad β -gal-pH6 en este estudio sucede en HH35 (Fig.32D). El tejido interdigital en regresión aparece muy marcado, lo que en tomas ampliadas hace incluso indistinguible las células senescentes de las otras (Fig.32D'' asteriscos). Esto es provocado por la gran actividad lisosomal, para la digestión y eliminación de este tejido. La parte más distal del dedo muestra también un marcaje acusado, a diferencia de estadios más jóvenes, donde ya se ha alcanzado mayor diferenciación en este lugar de la estructura, permitiendo así su modelado (Fig.32D) y coincidiendo de nuevo con el marcaje de muerte celular (Fig.31H punta de flecha).

En HH36 la zona interdigital casi ha desaparecido y el extenso marcaje producido en el estadio anterior solo se muestra en los vestigios que aún quedan de este tejido y con menor densidad (Fig.33A), lo que hace posible distinguir de nuevo células individualizadas senescentes con marcaje intenso a mayores aumentos (Fig.33A' asterisco). En la vista general, puede verse un gradiente de marcaje a lo largo de los flancos del dedo, pero esta vez la mayor cantidad del precipitado se encuentra en zonas intermedias y más apicales, de acuerdo con un mayor grado de desarrollo en zonas proximales (Fig.33A puntas de flechas).

El marcaje detectado en HH37 tiene una apariencia menos agregada que en estadios anteriores (Fig.33B). A pesar de que aparecen células bien marcadas y delimitadas en restos del tejido interdigital, los flancos de los dedos contienen células senescentes distinguibles a mayores aumentos y con menor intensidad de tinción (Fig. 33 B' asterisco y B''), salvo en la parte más apical del dedo, lo que coincide con lo anteriormente mencionado relacionado con el gradiente de madurez que se va trasladando progresivamente a zonas más distales de la extremidad. Las mayores concentraciones de estas células en senescencia se encuentran junto a las diáfisis de las falanges en formación (Fig.33B puntas de flechas). Este patrón de distribución de la actividad β -gal-pH6 coincide en el tiempo con el observado en apoptosis, donde el marcaje de los flancos de los dedos en zonas proximales pierde intensidad respecto a estadios anteriores y se mantiene en distales, además de verse mayor concentración de muerte entorno a las diáfisis (Fig. 31 G, H).

En los últimos estadios analizados, HH39 y HH40, el tejido interdigital casi ha desaparecido, pero lo que resta del mismo sigue manteniendo actividad β -gal-pH6. Los flancos de los dedos tienen estructuras epiteliales bastante definidas, por debajo de las cuales se consiguen detectar células marcadas, pero esta vez el gradiente de marcaje parece haber desaparecido. El marcaje sigue manteniendo el patrón encontrado en los estadios precedentes, es decir, entorno a las diáfisis de las falanges (Fig.33 C, D puntas de flechas) y permitiendo distinguir unas células de otras a mayores aumentos (Fig. 33 C'', C''', C''', D', D'').

3. Sobreexpresión e inhibición de moléculas señalizadoras durante el desarrollo del autopodio.

La extremidad de pollo en desarrollo es un modelo muy útil para el análisis del patrón morfogénico en vertebrados. En este caso, con el objetivo de indagar sobre los posibles mecanismos subyacentes en la regresión de los espacios interdigitales, y cómo estos puedan afectar a la distribución de la actividad β -gal-pH6, hemos realizado un estudio de la expresión de diferentes genes. A continuación, describimos una comparativa de la expresión de estos genes con la extensión de las áreas de actividad β -gal-pH6.

La experimentación se ha realizado mediante la intervención *in ovo* de una de las extremidades inferiores de embriones de pollo en HH28 en el tercer espacio interdigital, como se ha descrito con anterioridad. En la Figura 34 se pueden observar extremidades inferiores después de 24 horas (Fig.34 A-F) y 48 horas (Fig.34 G-L) de incubación. En la extremidad tratada con FGF tras 24 horas (Fig.34B) puede verse un pequeño acúmulo de células con marcaje de actividad β -gal-pH6, ya que FGF durante este tiempo en el desarrollo favorece la supervivencia celular. Sin embargo, a las 48 horas, FGF se torna a favorecer la muerte celular generando un agregado de células en apoptosis, como puede verse alrededor del asterisco en la Figura 34H (Gañán et al., 1993; Fallon et al., 1994; Hurlé et al., 1996).

Los resultados del inhibidor de FGF (iFGF) tras 24 horas (Fig.34C), indican como este inhibe el marcaje de la actividad β -gal-pH6, como consecuencia de inhibir la apoptosis en esta región. Por otro lado, tras 48 horas iFGF deja de tener efecto sobre el tejido a su alrededor, permitiendo que se marque la actividad β -gal-pH6 (Fig.34I).

En el caso del agonista de Wnt (aWnt), se observa que la actividad β -gal-pH6 tanto a las 24 horas (Fig.34D) como a las 48 horas (Fig.34J) no tiene a penas efecto frente a las patas controles respectivas (Fig. 34 A, G), indicando que Wnt no presenta ninguna influencia en la extensión del marcaje con β -gal-pH6.

Distinto es el caso del inhibidor de Wnt (iWnt), el cual ejerce su efecto tras 24 horas (Fig.34E), interviniendo sobre la actividad β -gal-pH6 e inhibiendo su detección. Sin embargo, tras 48 horas (Fig.34K), se genera un precipitado azul previo al lugar donde está incorporada la microesfera y reduciendo el marcaje de la β -gal-pH6 tras ella hacia la parte más distal de la extremidad.

También, hemos querido comprobar como TGF- β 1, un gen que se ha descrito con capacidad condrogénica (Gañán et al., 1993; Gañán et al., 1996; Chimal-Monroy et al., 2003b), afecta a la distribución de la actividad β -gal-pH6. A las 24 horas se distingue de forma clara la aparición de un engrosamiento condrogénico orientado hacia la parte apical del autopodio alrededor de la microesfera (Fig.34F asterisco). La inducción de tejido condral evita la progresión del marcaje de la actividad β -gal-pH6 en el tejido interdigital. De nuevo a las 48 horas, se muestra una disposición similar a la anterior, pero de una forma más acentuada ya que ha producido un mayor crecimiento de las estructuras condrogénicas en sentido distal (Fig.34L).

En el experimento con BMP se distingue como este favorece la actividad β -gal-pH6 tras 8 horas de la intervención (Fig.35B). BMP tiene un papel esencial en la inducción de muerte celular de una forma temprana (Gañán et al., 1996; Abarca-Buis et al., 2011), lo que de forma paralela provoca un leve, pero más definido marcaje de la actividad β -gal-pH6 en el tejido interdigital frente a la pata control (Fig.35A). Tras 24 horas (Fig.35D), este marcaje se vuelve más intenso respecto a la pata control (Fig.35E).

Finalmente, se ha utilizado Noggin como bloqueador de la señal de BMP. Tras 24 horas (Fig.35F) muestra cómo ejerce su efecto inhibidor de muerte al bloquear de forma paralela a la actividad β -gal-pH6 (Chimal-Monroy et al., 2003b; Abarca-Buis et al., 2011), respecto a la pata control (Fig.35D). De forma más detallada, se ha realizado un corte histológico sobre una extremidad inferior después de 24 horas donde se observa que tras la microesfera (Fig.35C asterisco), hacia la región apical no se observa marcaje de la actividad β -gal-pH6.

FIGURAS CAPÍTULO 3.

Figura 31. Áreas de actividad β -gal-pH6 y apoptosis durante el desarrollo embrionario aviar. Detección de actividad β -gal-pH6 en las patas traseras de embriones de pollo de estadio embrionario HH23 (A), HH29 (B), HH31 (C) y HH34 (D). Tinción con Rojo Neutro para la detección de muerte celular en las patas traseras HH23 (E), HH29 (F), HH31 (G) y HH34 (H). Ensayo TUNEL para la detección de apoptosis en las patas traseras HH23 (I), HH29 (J), HH31 (K) y HH34 (L). El etiquetado de AER se puede observar en (A, E y I). Las puntas de flecha en (B–D), (F–H) y (J–L) apuntan al tercer espacio interdigital durante el establecimiento de la senescencia celular y la progresión de la muerte celular programada interdigital.

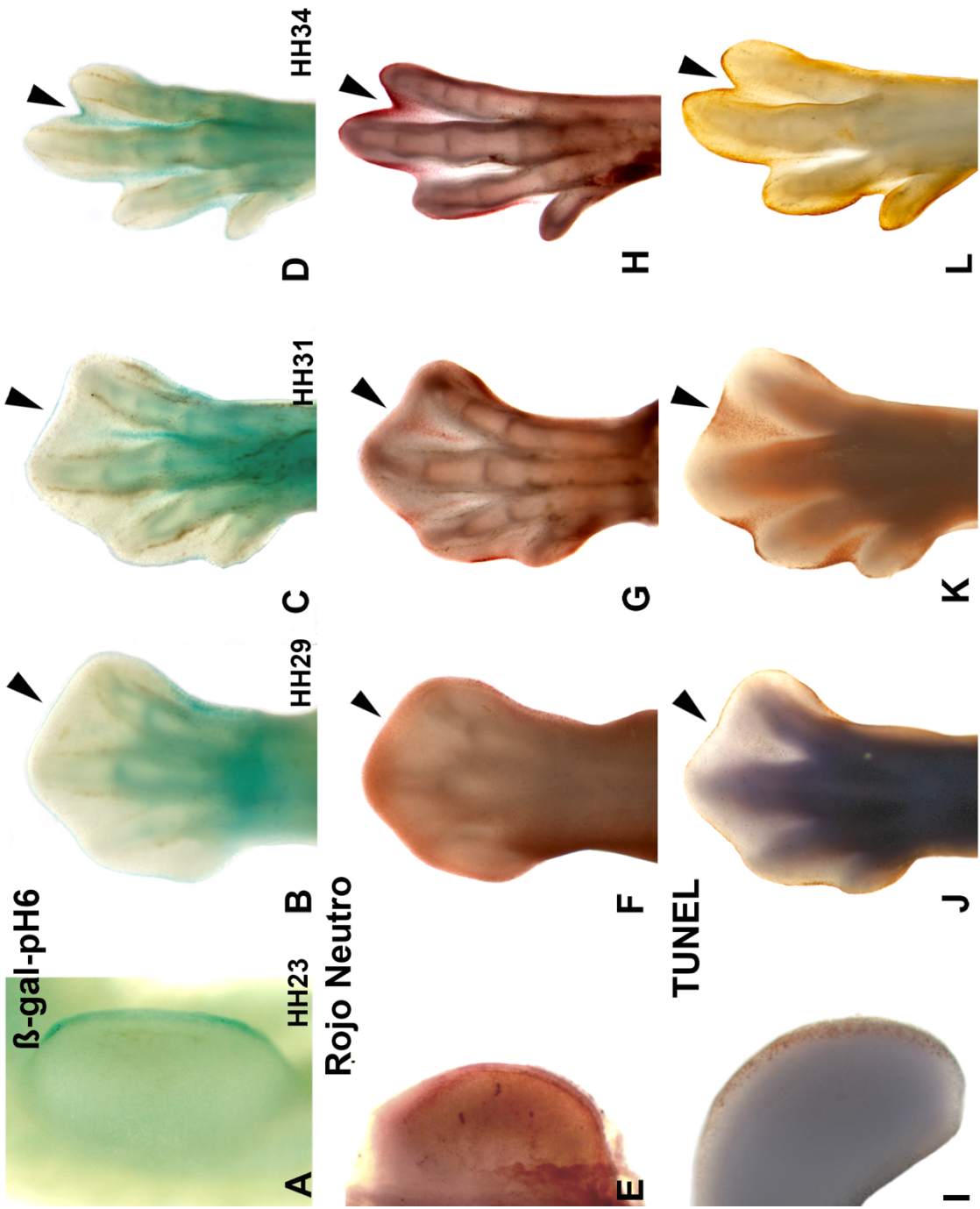


Figura 32. Secciones de 50µm de grosor teñidas con X-gal de extremidades inferiores de pollo. Los rectángulos señalan regiones donde se han tomado imágenes ampliadas. **A:** HH29, el marcaje aparece en los flancos de la extremidad señalado con punta de flecha. **A':** región ampliada de un flanco de la extremidad en el HH29 con marcaje individualizado de células, indicado con punta de flecha. **B:** HH31, marcaje en los flancos de la extremidad y en zona interdigital, señalado con puntas de flecha. **B':** ampliación de un flanco de la extremidad en el HH31, en el que aparece células individualizadas con marcaje, indicado con asteriscos. **C:** HH33 con marcaje intenso entorno a las falanges y sobre tejido interdigital en regresión, señalado con puntas de flechas. **C':** zona interdigital ampliada del HH33 con células marcadas, indicado con flecha. **C'':** flanco de falange ampliado con células marcadas individualmente en HH33. **D:** HH35, zona interdigital con gran marcaje y regiones alrededor de las diáfisis de las falanges, señaladas con puntas de flecha. **D':** falange más distal del HH35 rodeada de células con marcaje intenso, indicado por punta de flecha. **D'':** zona interdigital ampliada del HH35 con gran agregación de células marcada de forma intensa, señaladas con asteriscos.

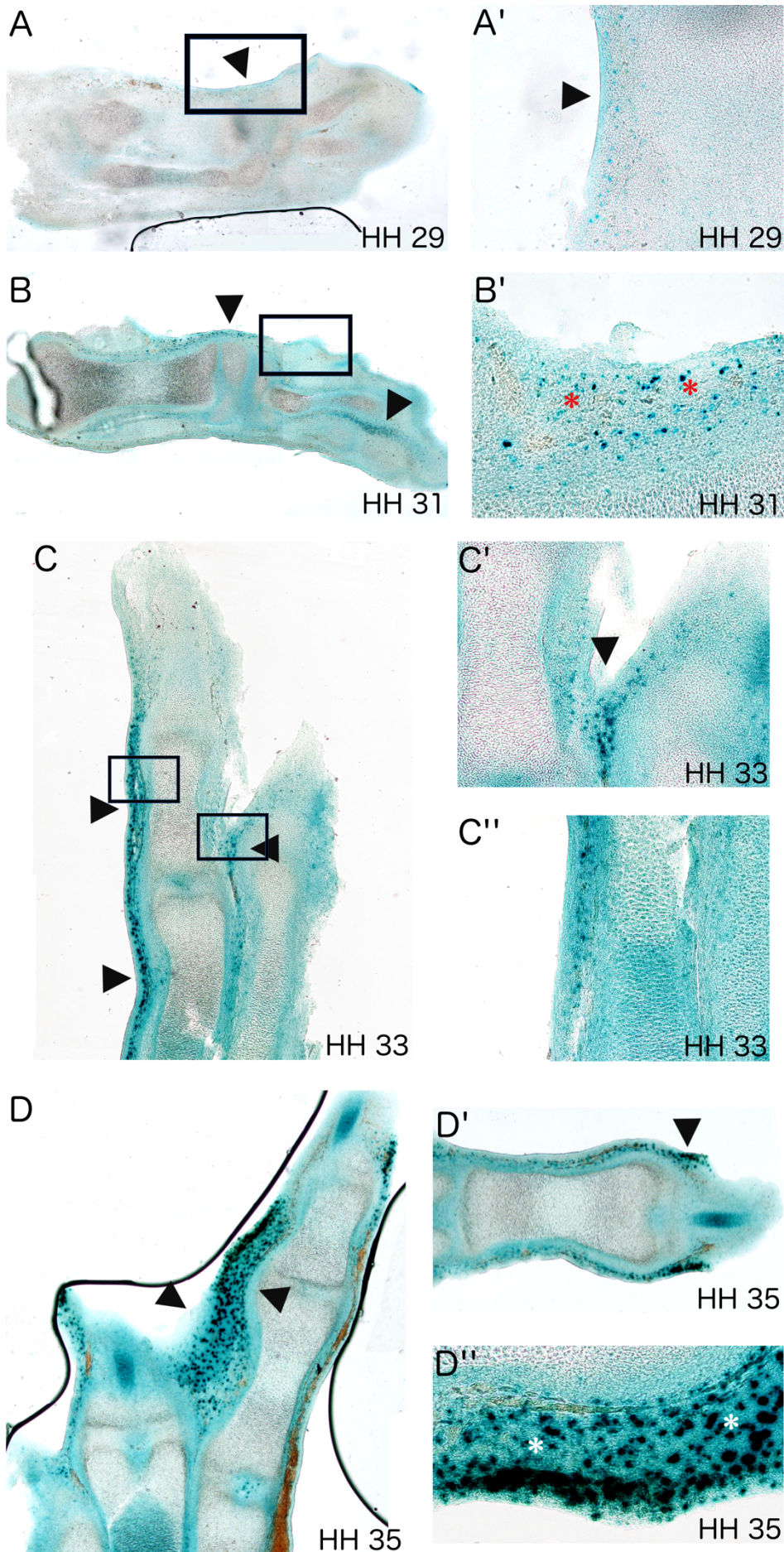


Figura 33. Secciones de 50µm de grosor teñidas con X-gal de extremidades inferiores de pollo. Los rectángulos señalan regiones donde se han tomado imágenes ampliadas. **A:** HH36, marcaje en los flancos de la extremidad y restos de la zona interdigital regresionada, indicadas con puntas de flecha respectivamente. **A':** región ampliada de un tejido interdigital en el HH36 con marcaje individualizado de células, señalado con asterisco. **A'':** zona ampliada de un flanco del dedo en HH36, en el que aparece células marcadas individualmente de forma intensa. **B:** HH37, marcaje restringido en las diáfisis de las falanges, indicado con puntas de flecha y restos de la zona interdigital. **B', B'':** ampliación de flancos de los dedos en el HH37, en el que aparece células individualizadas con marcaje, señalado con asterisco. **C:** HH39 con marcaje entorno a las a diáfisis de las falanges. **C':** restos de zona interdigital ampliada del HH39 con células marcadas, asterisco rojo. **C'', C''', C'''':** flancos de falanges ampliados con células marcadas individualmente de forma débil en HH39, asteriscos rojos. **D:** HH40, marcaje alrededor de la diáfisis de las falanges, indicado con puntas de flecha, mostrando mayor intensidad en aquellas más apicales, junto con una región interdigital retraída. **D':** zona interdigital ampliada del HH40 con agregación de células marcadas de forma intensa. **D'':** ampliación de un flanco junto a una diáfisis en formación, con células marcadas indicadas con asterisco.

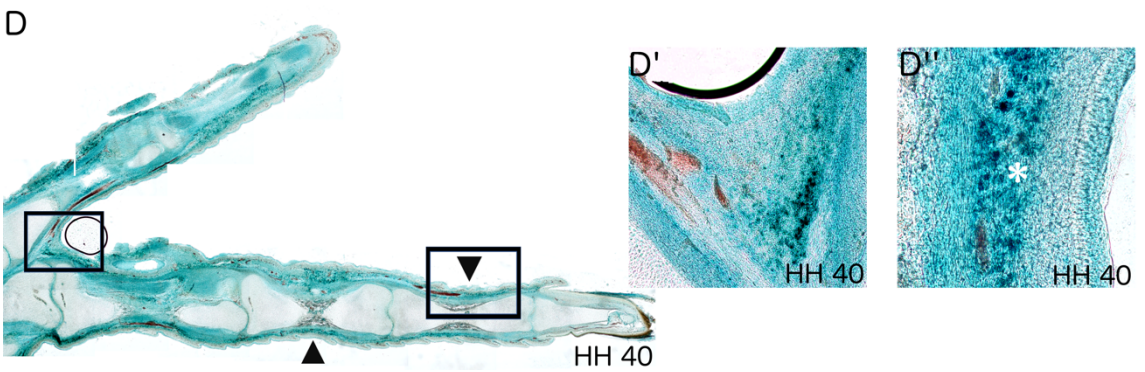
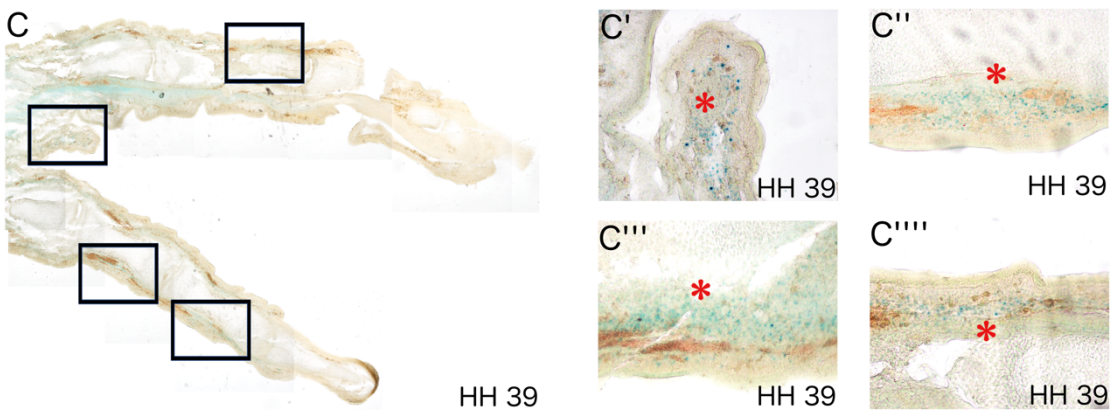
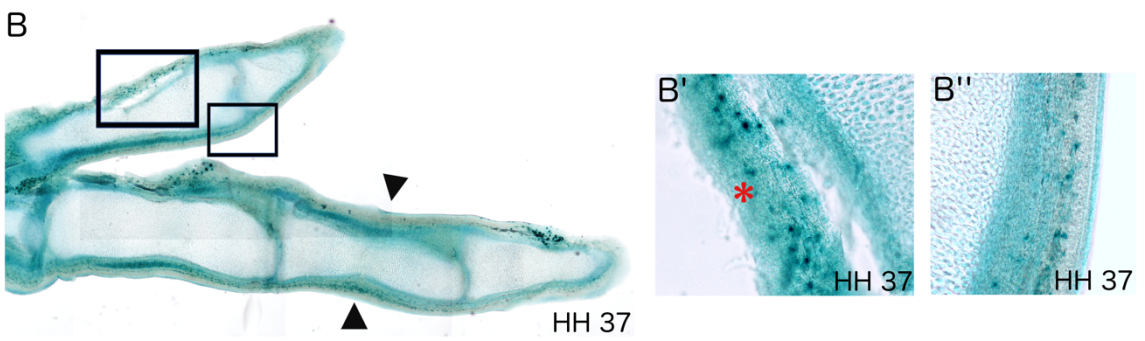
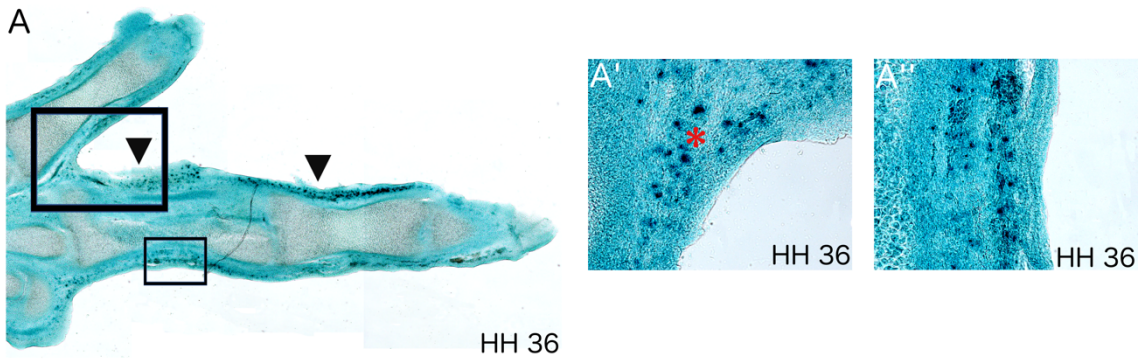


Figura 34. Áreas de actividad β -gal-pH6 en extremidades inferiores de pollo después de 24 horas (A-F) y 48 horas (G-L) tras la intervención *in ovo* en HH28 para la incorporación de microesferas en el tercer tejido interdigital. Extremidades control (A, G). Los asteriscos indican el lugar donde se han incorporado las microesferas (B-F, H-L). Microesfera con agonista de FGF (B, H), con inhibidor de FGF (C, I), con agonista de Wnt (D, J), con inhibidor de Wnt (E, K) y con agonista de TGF- β 1 (F, L).

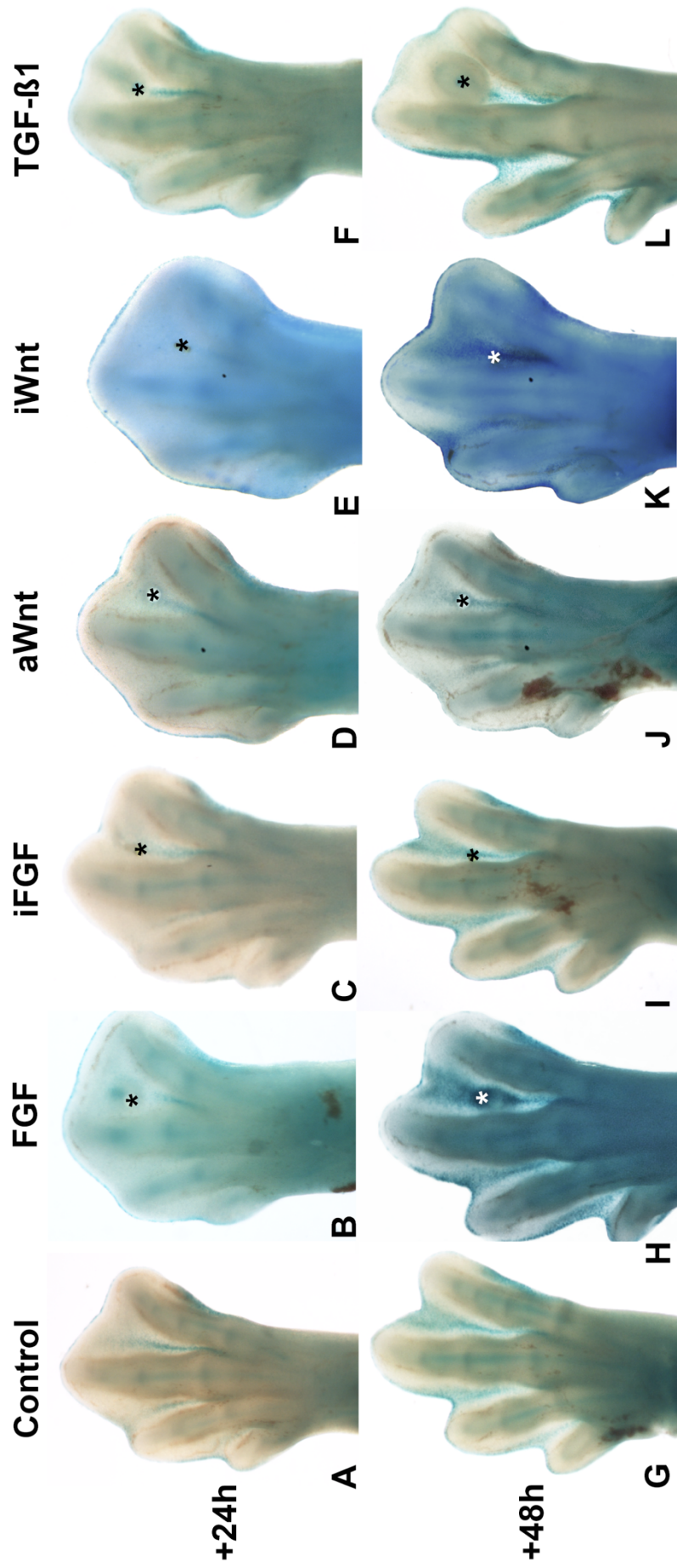
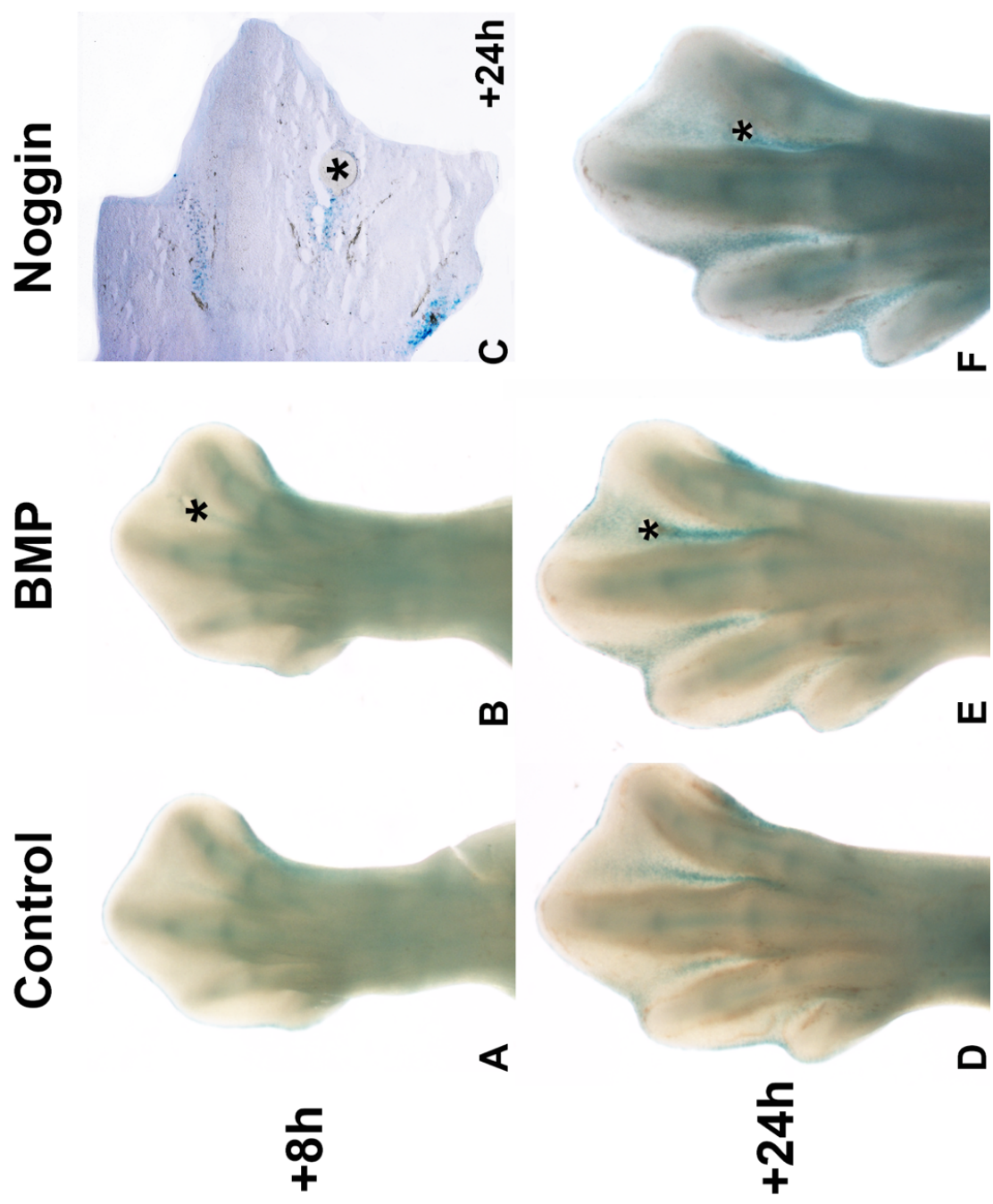


Figura 35. Áreas de actividad β -gal-pH6 en extremidades inferiores de pollo después de 8 horas (A-C) y 24 horas (D-F) tras la intervención *in ovo* en HH28 para la incorporación de microesferas en el tercer tejido interdigital. Extremidades control (A, D). Los asteriscos indican el lugar donde se han incorporado las microesferas (B-C, E-F). Microesfera con BMP (B, E) y con Noggin (F). (C) Sección de 20 μ m de grosor teñida con X-gal de extremidad inferior de pollo con microesfera con Noggin después de 24 horas tras intervención en HH28.



DISCUSIÓN CAPÍTULO 3.

V. DISCUSIÓN Capítulo 3.

1. Actividad β -gal-pH6 en la extremidad inferior.

La distribución de las áreas positivas para β -gal-pH6 en el embrión completo se correlaciona fuertemente con la distribución de células apoptóticas. Una intensa tinción de β -gal-pH6 es detectada en estructuras en degeneración tales como los pronefros de peces (Villiard et al., 2017) y anfibios (Davaapil et al., 2017; Villiard et al., 2017) y en los mesonefros de aves (Nacher et al., 2006) y mamíferos (Muñoz-Espín et al., 2013; Da Silva-Álvarez et al., 2018). El patrón de muerte celular en el desarrollo del corazón de aves también se correlaciona fuertemente con la tinción β -gal-pH6 (Lorda-Díez et al., 2019), como hacen las áreas de muerte celular en somitas, el primordio de la cola y SNC (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). En el caso de las vesículas óticas del pollo, las células marcadas con β -gal-pH6 al están asociadas con áreas de apoptosis incrementadas (Gibaja et al., 2019; Magariños et al., 2020). En ratones, se ha encontrado que la senescencia en el saco endolinfático tiene un papel análogo al de la apoptosis (Muñoz-Espín et al., 2013).

En el desarrollo de la extremidad, la coincidencia cronotopográfica de células senescentes y apoptóticas en el embrión es aún más evidente. En estadios tempranos de la extremidad inferior en desarrollo, el crecimiento de la extremidad está controlado por un engrosamiento epitelial en la región distal de la estructura, la AER (Fig. 31 A, E, I). Las células de este centro de señalización proliferan junto a otros tejidos en la extremidad hasta su desaparición cuando todas las falanges se han formado (Rodríguez-León et al., 2013). Concomitante con el proceso apoptótico (Fig. 31 E, I), las células de la AER también exhiben actividad β -gal-pH6 (Fig.31A) y expresan diferentes marcadores de senescencia celular como p21 (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015a; Li et al., 2018). En ratones, la ausencia de actividad de p21 resulta en defectos en la senescencia y deficiencias estructurales en la AER, de este modo se deteriora el desarrollo normal de la extremidad (Storer et al., 2013). Más allá, durante el desarrollo de la extremidad en el ratón, una fuerte actividad de β -gal-pH6 es detectada en la AER en estadios tempranos, pero casi desaparece en estadios más avanzados (Li et al., 2018). Estos últimos autores sugieren que algunas células senescentes en esta región del desarrollo de la extremidad de ratón sufren apoptosis y

son eliminadas por fagocitosis. Sin embargo, una subpoblación de estas células embrionarias positivas para la actividad β -gal-pH6 y expresión de p21 se mantienen en los tejidos de la extremidad después del nacimiento y reentran en el ciclo celular, proliferando *in situ* (Li et al., 2018). Estos resultados podrían sugerir que algunas células en la población son células no senescentes o un grado de plasticidad en el proceso de senescencia celular durante el desarrollo. Futuros trabajos son necesarios para clarificar si la senescencia celular durante el desarrollo es un proceso que tiene algunas características únicas distinguibles de la senescencia celular en adulto.

No obstante, esta no es la única estructura que se encuentra bajo apoptosis durante el desarrollo de la extremidad. Los márgenes anterior y posterior del primordio de la extremidad, tanto como las áreas interdigitales, entran en el programa de apoptosis para esculpir la forma final del órgano (Fig. 32, 33) (revisado por Montero et al. (2020)). De hecho, la regresión interdigital durante la formación de los dedos ha sido considerada como un excelente modelo para el estudio de cómo la senescencia y la muerte celulares programada están relacionadas (Lorda-Díez et al., 2015a; Sánchez-Fernández et al., 2019). Las áreas interdigitales apoptóticas pueden ser observadas durante aproximadamente 48 horas en la pata de pollo en desarrollo (desde 6.5 a 8.5 días de incubación) (Montero and Hurlé, 2010; Lorda-Díez et al., 2015b). La vía clásica para detectar el patrón apoptótico interdigital es usar tintes vitales como el R.N. (Fig.31 E-H). El marcaje con este tinte permite la visualización de tejido que se va a ir eliminando de la AER (Fig.31E) y la progresión de la muerte celular interdigital (Fig. 31 E-H). Pero esta tinción no puede distinguir la apoptosis (el proceso activo y programado de muerte en las células de un tejido en desarrollo) de la necrosis (la muerte pasiva de células debida, por ejemplo, a toxicidad o daño celular). Por esta razón, desde la década de los 1990, el ensayo TUNEL ha sido utilizado para asegurar la detección de áreas de apoptosis durante el desarrollo de la extremidad (Fig. 31 I-L). La población de células apoptóticas detectadas por las dos técnicas en las áreas interdigitales coincide con el patrón del marcaje de β -gal-pH6 en estas regiones (Fig. 31 E-G), prueba que evidencia la correlación de los dos procesos durante el desarrollo de la extremidad. De hecho, diferentes estudios han mostrado que la senescencia celular y la apoptosis coinciden durante el

desarrollo de la extremidad y son esenciales para la propia regresión interdigital (Muñoz-Espín et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015a; Montero et al., 2016).

Además de la presencia de la actividad β -gal-pH6, otra característica esencial de la senescencia celular es la detección del ciclo celular. En el caso de la regresión interdigital de la extremidad, se encuentra conectada a la sobreexpresión de genes tales como p21, p63 y p73 lo cual bloquea la progresión del ciclo celular (Lorda-Díez et al., 2015a; Sánchez-Fernández et al., 2020). También, varios miembros de la familia de genes supresores de tumores Btg/Tob están expresados en el espacio interdigital durante la progresión de la muerte celular programada, y la sobreexpresión de Btg2 en el mesénquima temprano de la extremidad produce un efecto antiproliferativo y proapoptótico en el tejido, provocando la formación de extremidades acortadas (Lorda-Díez et al., 2015a). Curiosamente, la expresión de estos genes supresores de tumores en embriones de pollo y ratón, especies con dedos libres, se observa durante el curso de la muerte celular programada en los espacios interdigitales, pero se mantiene unos niveles estables o más bajos en las áreas interdigitales de los patos, los cuales mantienen sus dedos palmeados en los adultos (Lorda-Díez et al., 2015b).

Otra característica importante de la senescencia celular es la sobreexpresión de los diferentes componentes de SASP, es decir, diferentes metaloproteasas de matriz extracelular, IgFBP5, miembros de las vías de señalización TNF e interleuquinas 8 (Rhinn et al., 2019). Varios de estos miembros de SASP están sobrerregulados en las áreas interdigitales (Lorda-Díez et al., 2015a) y en la AER (Storer et al., 2013), justamente cuando las células mueren por apoptosis.

Todas estas evidencias, tanto la detección de la actividad β -gal-pH6 y la sobrerregulación de inhibidores del ciclo celular como los componentes del SASP, respaldan que la tinción β -gal-pH6 sea detectada en las células senescentes durante el desarrollo en áreas apoptóticas, como aquellas detectadas en las extremidades de tetrápodos. Sin embargo, otra población de células no senescentes con un alto contenido de masa lisosomal y/o incremento de actividad lisosomal, en el área interdigital de la codorniz, también muestran un fuerte marcaje de β -gal-pH6, coincidiendo con estudios previos en ratones (Hall et al., 2017).

2. Moléculas señalizadoras de las áreas senescentes en el desarrollo de la extremidad inferior de pollo.

Los tejidos interdigitales de la extremidad inferior de pollo en desarrollo han sido un modelo muy útil para describir la apoptosis durante el desarrollo embrionario (Lorda-Díez et al., 2015a, 2015b). Por otro lado, como se ha descrito con anterioridad, la apoptosis va acompañada de actividad senescente positiva para β -gal-pH6, encontrándose en áreas de degeneración como es el caso de los mencionados tejidos interdigitales (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2019). Distintos estudios han analizado marcadores típicos de senescencia en estas regiones degenerativas (Rodríguez-León et al., 2013; Storer et al., 2013; Montero et al., 2016; Lorda-Díez et al., 2019; Wagner and Wagner, 2022). No obstante, hasta ahora no se había descrito como actúan determinadas moléculas que intervienen en el desarrollo de la extremidad sobre la propia extensión del área senescente, detectado gracias a la actividad β -gal-pH6.

En este estudio se ha intervenido sobre el tercer tejido interdigital de la extremidad de embriones de pollo en el estadio de desarrollo HH28 (Fig. 34, 35), utilizando diferentes moléculas para interferir sobre el desarrollo normal de su extremidad inferior.

Con ellas hemos podido observar cómo FGF posee un papel dual dependiendo del tiempo de actuación en el tejido sobre la actividad β -gal-pH6. Se observa que este a las 24 horas de haber sido añadido, provoca la acumulación de células positivas para β -gal-pH6, ya que, al ser un factor de crecimiento favorece la supervivencia de las células interdigitales que rodean a la microesfera manteniendo el estado senescente (Fig.34B). Sin embargo, a las 48 horas provoca un importante agregado de células en apoptosis (Fig.34H). Caso contrario ocurre con el inhibidor de este mismo factor de crecimiento, debido a que inhibe su actividad provocando que no se dé el correcto proceso la senescente y por tanto el marcaje de β -gal-pH6 se ve reducido (Fig.34C). Por otro lado, a las 48 horas su efecto inhibitor se ve mermado y se produce la senescencia (Fig.34I). De esta forma se observa como FGF posee un papel contradictorio, pero esencial en la morfogénesis de la extremidad (Gañán et al., 1993; Fallon et al., 1994; Hurlé et al., 1996; Montero et al., 2001; Guasto and Cormier-Daire, 2021). Pero en (Montero et al., 2001) se muestra que inicialmente hay proliferación inducida por FGF a las 24 horas y después

muerte interdigital a las 48 horas, lo que coincide con el patrón de senescencia observada en nuestros resultados. Inicialmente se observa inhibición del marcaje con β -gal-pH6 y posteriormente un aumento masivo del marcaje a las 24 horas (Fig.34B).

Respecto a la expresión de Wnt, el uso de su agonista no influye de ninguna forma sobre el proceso de senescencia (Fig. 34 D, J), pero su ausencia provocada por el uso de un inhibidor de este (Fig. 34 E, K), genera un halo de ausencia del marcaje de β -gal-pH6 tras 24 horas (Fig.34E) y una reducción del marcaje de la actividad β -gal-pH6 en el lado más distal después de la microesfera (Fig.34K), poniendo de manifiesto su papel relevante al favorecer la muerte celular del tejido interdigital (Church and Francis-West, 2002; Grotewold and Rüther, 2002; Loganathan et al., 2005).

En el caso del uso de TGF- β 1, con capacidad condrogénica (Gañán et al., 1993; Gañán et al., 1996; Chimal-Monroy et al., 2003b; Guasto and Cormier-Daire, 2021), se observa como también ejerce un importante papel en la supervivencia celular, evitando la entrada en el proceso senescente de las células alrededor de la microesfera (Fig. 34 F, G).

Por último, en la comparativa realizada en marcadores tempranos de muerte celular, se observa que, BMP con un papel inductor de esta (Gañán et al., 1996; Abarca-Buis et al., 2011), favorece la presencia de la senescencia en momentos iniciales y sucesivos (Fig. 35 B, E) respecto al control (Fig.35A). Sin embargo, Noggin al actuar como bloqueante de la señal de BMP (Chimal-Monroy et al., 2003b; Abarca-Buis et al., 2011), provoca la reducción de la senescencia en el tejido interdigital.

Con estos resultados, se muestra de forma sencilla como la senescencia y la apoptosis comparten vías señalizadoras y cómo la presencia o ausencia de determinadas moléculas que actúan en el proceso de desarrollo de la extremidad afectan a ambos procesos (Fig.36).

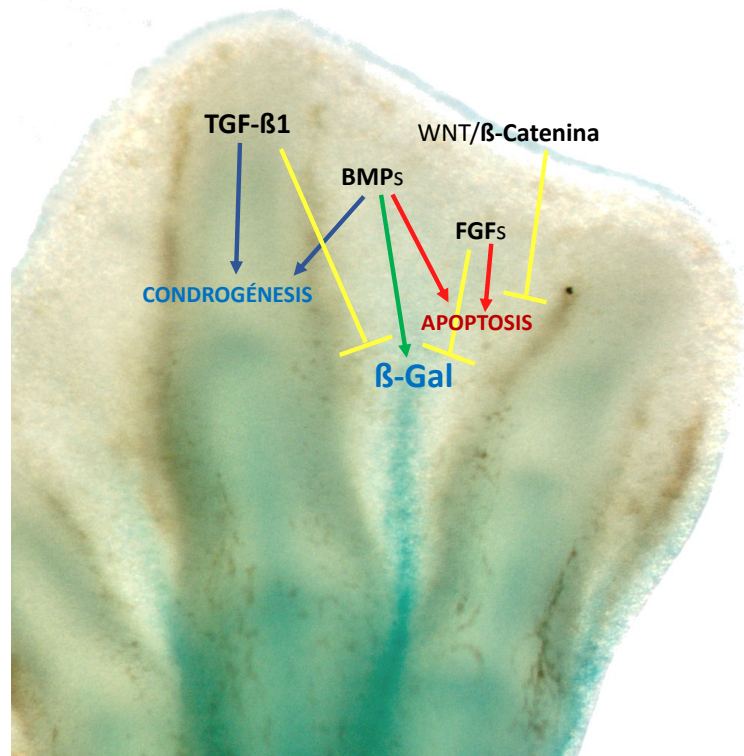


Figura 36. Esquema de las vías de actuación de las moléculas señalizadoras TGF- β 1, BMPs, FGFs y WNT/ β -Catenina sobre la condrogénesis, apoptosis y distribución de la β -gal-pH6 durante el desarrollo del autopodio en este estudio. TGF- β 1 favorece la condrogénesis en el futuro dedo, sin embargo, inhibe la actuación del marcaje de la actividad β -gal-pH6 en el espacio interdigital. Los BMPs favorecen la condrogénesis en el futuro dedo, mientras que en el espacio interdigital favorece el marcaje de β -gal-pH6 y posteriormente la apoptosis. Los FGFs favorecen la supervivencia celular en el espacio interdigital durante las primeras 24 horas haciendo que se produzca un mayor marcaje de la actividad β -gal-pH6, sin embargo, tras las 48 horas favorece la apoptosis. WNT/ β -Catenina inhibe la apoptosis y no parece afectar al marcaje de la actividad β -gal-pH6.

CONCLUSIONES CAPÍTULO 3.

VI. CONCLUSIONES Capítulo 3.

1. El marcaje de la actividad β -gal-pH6 durante el desarrollo de la extremidad inferior muestra que existe una fuerte relación entre la senescencia y apoptosis, detectándose con mayor intensidad en el tejido interdigital regresivo y en el entorno de las diáfisis de las falanges.
2. La sobreexpresión de distintas moléculas señalizadoras utilizadas en el presente estudio en el tercer interdígito, muestra como la senescencia y apoptosis comparten vías señalizadoras, siendo las vías activadoras de la apoptosis, activadoras también de los mecanismos senescentes.

DISCUSIÓN GENERAL.

DISCUSIÓN GENERAL.

La actividad β -gal-pH6 el biomarcador más empleado para detectar senescencia celular tanto en secciones de tejido como en células en cultivo (Dimri et al., 1995; Debacq-Chainiaux et al., 2009b). El abordaje de identificar su patrón temporo-espacial durante el desarrollo de la retina y en el epitelio olfatorio de vertebrados fue ideado desde un principio como estudios totalmente independientes, hecho que se puede apreciar al diseñarlo en dos especies distintas. Con ellos, se pretendía establecer una posible relación entre la senescencia celular que se da durante el desarrollo embrionario y el proceso de muerte celular que afecta a ambos tejidos durante el proceso de diferenciación celular, como se ha demostrado que ocurre en otros tejidos embrionarios (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Sin embargo, ambos estudios han dado lugar a resultados inesperados, incluso tras el empleo de otros marcadores aceptados por la comunidad científica como marcador de senescencia. No obstante, debido a que los resultados obtenidos con la técnica histoenzimática en ambos modelos guardan una serie de similitudes en tanto que identifican poblaciones de neuronas diferenciadas y a su escasa relación con el mecanismo de senescencia y de la muerte celular, vamos a abordar una discusión conjunta. Por otra parte, ambos son parte de órganos de los sentidos y están integrados dentro del sistema nervioso, por este motivo, consideramos que este enfoque está más que justificado y va a ayudar a entender mejor las conclusiones obtenidas tras la realización.

1. Eficacia de la técnica histoquímica de la β -gal-pH6 para identificar senescencia en el tejido nervioso.

Como se ha comentado con anterioridad, la técnica de la β -gal-pH6 está considerada como un marcador universal de senescencia celular (Dimri et al., 1995; Debacq-Chainiaux et al., 2009b). Esta actividad histoenzimática es diferente a la observada en los lisosomas, que es efectiva a un pH 4.0 (Kuilman et al., 2010). Por el contrario, diferentes autores han demostrado que esta actividad lisosomal es la causante del marcaje obtenido con la β -gal-pH6 (Lee et al., 2006), ya que también se detecta un incremento en la expresión de GLB1, el gen que codifica para esta enzima. Además, en las células senescentes se ha detectado un incremento desmesurado en la biogénesis

de lisosomas (Kurz et al., 2000; Severino et al., 2000; Hernández-Segura et al., 2018). Además, ya se ha comprobado que esta actividad enzimática no es siempre indicativa de senescencia. Así, en algunas ocasiones está detectando el proceso de autofagia celular, que conlleva un aumento en el número de lisosomas que realizan esta función (Young et al., 2009). Por otra parte, esta señal histoquímica está incrementada en células del endodermo visceral en estadios iniciales del desarrollo embrionario en el ratón (Huang and Rivera-Pérez, 2014b) o también en las células epidérmicas del duodeno (Going et al., 2002). También se ha detectado en células fagocíticas similares a macrófagos en cultivo (Yegorov et al., 1998), en macrófagos y osteoclastos en tejidos maduros (Bursuker et al., 1982; Kopp et al., 2007; Hall et al., 2017), y en cultivos de fibroblastos que están en etapa previa a la confluencia (Severino et al., 2000). En un estudio más actual se ha comprobado que las células de Purkinje, las células del plexo coroideo, músculo cardíaco, epitelio intestinal y células pancreáticas en tejidos de mamíferos muestran una elevada actividad β -gal-pH6 (Raffaele et al., 2020).

Si nos centramos en estudios realizados en el sistema nervioso, la utilización de esta técnica ha creado gran controversia. Se ha utilizado para detectar células senescentes en el cerebro de ratones seniles (Ori et al., 2015), en cultivos primarios de neuronas corticales (Chernova et al., 2006) y en células granulares del cerebelo (Bhanu et al., 2010). Esta actividad histoenzimática se muestra muy intensa en neuronas del hipocampo y, a medida que el animal envejece, se incrementa más todavía (Geng et al., 2010; Piechota et al., 2016), al igual que en neuronas de la misma naturaleza que se mantienen en cultivos durante tiempo prolongado (Dong et al., 2011; Xu et al., 2019). Así mismo, en neuronas del hipocampo se detecta un fuerte incremento de la β -gal-pH6 después de provocar una lesión (Tominaga et al., 2019). Las células de Purkinje de ratones seniles también incrementan dicha actividad (Jurk et al., 2012). Determinadas enfermedades neurodegenerativas provocan una elevación de esta actividad en otros tipos celulares del sistema nervioso, como astrocitos, oligodendrocitos y células de la microglía (Kritsilis et al., 2018). Por tanto, como todos estos trabajos parecen indicar, las neuronas de animales seniles y aquellos que están afectados por alguna patología incrementan la actividad β -gal-pH6.

Otros autores han estudiado la actividad β -gal-pH6 en neuronas de individuos jóvenes de roedores (de entre uno y tres meses de edad) tanto *in vivo* como *in vitro* (Jurk et al., 2012; Piechota et al., 2016; Bussian et al., 2018; Musi et al., 2018; Raffaele et al., 2020), detectando intensa actividad histoenzimática en subpoblaciones de neuronas de diferentes regiones del encéfalo. Por lo cual, esta actividad también se ve incrementada en neuronas de individuos que no son seniles. Toda esta información parece indicar que esta actividad no es exclusiva de neuronas que se encuentren en individuos seniles. Aquí es donde cobran especial relevancia los estudios que se han realizado en la presente tesis doctoral, en los que se demuestra que esta actividad está muy incrementada no solamente en neuronas procedentes de individuos jóvenes, sino incluso en embriones tempranos de ave o en tejidos inmaduros de mamífero en pleno proceso de diferenciación. Adicionalmente, existen otras poblaciones de neuronas que hemos encontrado que tienen esta actividad β -gal-pH6 exacerbada en individuos de ratón de tres días de vida, como en el caso de neuronas sensitivas del ganglio trigémino (Fig.37A) o en células de Purkinje de estos animales (Fig. 37 C, D).

Por ello, los resultados que se han obtenido en este trabajo para el sistema nervioso indican que existe una actividad β -gal-pH6 vinculada al proceso de diferenciación neuronal. Adicionalmente realizamos en paralelo el análisis de otros marcadores típicos de senescencia, como son p53 y p21. No fuimos capaces de detectar actividad p53 en sistema nervioso en desarrollo, aunque dicha expresión se ha descrito en otros tejidos embrionarios (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013; Lorda-Díez et al., 2015a). Sin embargo, hemos detectado inmunomarcaje frente a p21 fuertemente relacionado con la actividad β -gal-pH6, es decir, en neuronas en proceso de diferenciación y en otras ya diferenciadas. Es conocido el papel de esta proteína en la inhibición del ciclo celular y en neuroprotección (Langley et al., 2008; Ma et al., 2013). Estos autores también han detectado una fuerte coincidencia de la técnica histoenzimática y la proteína p21, como ocurre en el presente estudio.

2. Actividad β -gal-pH6 en tejidos apoptóticos y no apoptóticos.

La actividad β -gal-pH6 se ha solido utilizar como marcador de células senescentes asociadas a degeneración celular, como en el caso de la morfogénesis de las extremidades durante el desarrollo embrionario. Aquí se ha comprobado que acompaña

al proceso apoptótico que se produce en el tejido interdigital o en los flancos de la extremidad (Fig. 32, 33) (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). No obstante, como se ha visto en este estudio, la actividad β -gal-pH6 se detecta también en lugares donde no se producen procesos apoptóticos tan significativos como son los epitelios neuronales retinal y olfatorio (Voyron et al., 1999; Francisco-Morcillo et al., 2014). En estos últimos, los datos obtenidos en este estudio indican que la actividad β -gal-pH6 está originada por la abundante presencia de células no proliferativas y recién diferenciadas en tejidos nerviosos. Podemos sugerir que la salida del ciclo de celular de las neuronas recién diferenciadas que se adentran en el proceso de diferenciación terminal y el estado senescente comparten vías señalizadoras capaces de ser detectadas con β -gal-pH6, haciendo que su uso como marcador obtenga resultados diferentes dependiendo del contexto tisular. Es decir, su presencia en las extremidades en desarrollo muestra áreas de degeneración, mientras que en el tejido nervioso en desarrollo su presencia es provocada por células que han salido del ciclo se han diferenciado. En el caso de la muerte celular programada en tejido nervioso, hemos visto que la muerte celular en el epitelio olfatorio es esporádica y se distribuye de manera aislada en el tejido (Fig. 38). Este patrón apoptótico no coincide con la distribución del marcaje con β -gal-pH6, lo que se observa también en los análisis histológicos realizados en la retina (Fig.16l). En paralelo hemos comprobado, que la actividad β -gal-pH6 puede ser utilizada como herramienta para el marcaje histológico y la caracterización de determinados tipos neuronales.

Finalmente, aunque ligada a procesos degenerativos y apoptóticos en tejidos como el espacio interdigital, parece que la expresión de marcadores de senescencia durante el desarrollo embrionario puede también estar ligada al proceso de diferenciación terminal que sufren las neuronas. En estos últimos casos, en los que el ciclo celular pasa a estar permanentemente bloqueado, inhibiendo así el proceso de proliferación. En el futuro puede ser relevante que al estudiar el proceso de senescencia en tejido nervioso se utilicen marcadores alternativos para sacar conclusiones sobre este proceso en estos tipos celulares. Sería interesante poder analizar en futuros estudios qué marcadores del SASP comparten las células nerviosas en diferenciación terminal y células senescentes que pertenecen a tejidos en degeneración durante el desarrollo embrionario.

FIGURAS DISCUSIÓN.

Figura 37. Presencia de actividad β -gal-pH6 en el tejido de cabeza de ratón en el día postnatal P3. Las criosecciones sagitales (A-C) se trataron con histoquímica β -gal-pH6. (A) Se detecta una fuerte tinción de β -gal-pH6 en las neuronas sensoriales del ganglio del trigémino (asteriscos). (B, C) Se detecta actividad β -gal-pH6 en el cerebelo, principalmente en la capa de células de Purkinje (flechas). Barras de escala: 20 μ m (A), 200 μ m (B), 50 μ m (C).

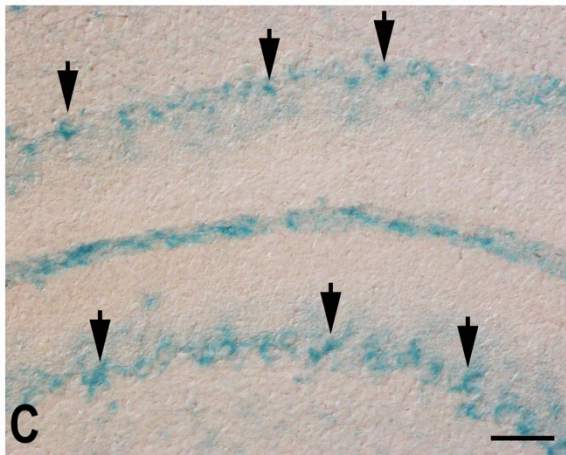
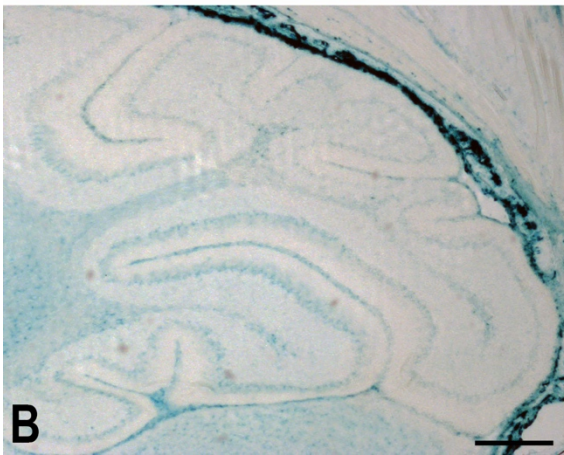
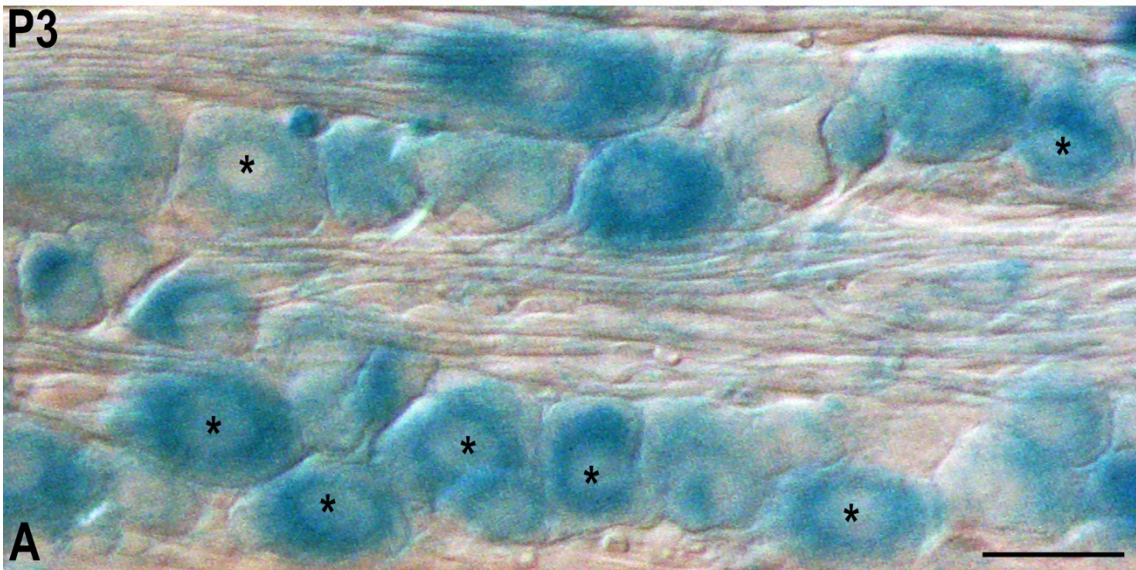
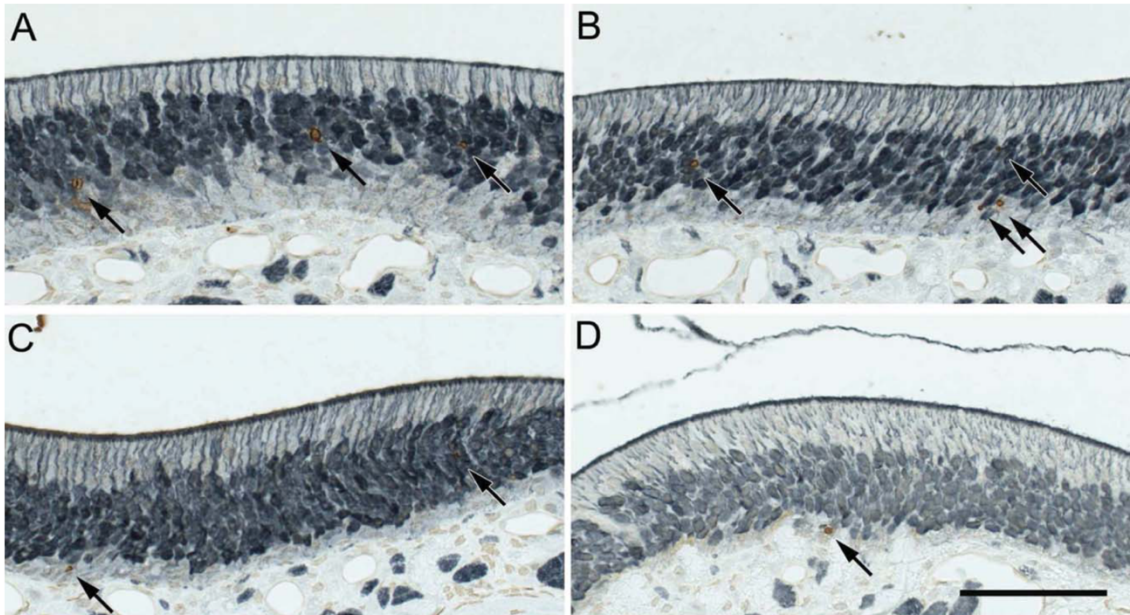


Figura 38. Tinción doble de la mucosa olfativa de ratones de 10 días (A), 1 mes (B), 3 meses (C) y 16 meses (D) con TUNEL y anti-Inmunotinción de OMP. Cada sección se marcó primero con TUNEL y la reacción se hizo visible mediante la reacción DAB (marrón). Luego se inmunomarcaron con anticuerpo anti-OMP de cabra, seguido de visualización con Vector SG (gris). Las flechas en cada micrografía indican las células marcadas con TUNEL. En las secciones de edades más jóvenes (A, B), las células marcadas con TUNEL se distribuyen tanto dentro como debajo de la capa de células positivas para OMP. Por el contrario, las células marcadas con TUNEL en muestras de 16 meses tienden a estar restringidas al área basal debajo de la capa de células OMP positivas. Imagen adaptada de Kondo et al. (2010). Barra de escala: 150µm.



CONCLUSIONES GENERALES.

CONCLUSIONES GENERALES.

1. La actividad β -gal-pH6 detectada en tejidos nerviosos marca poblaciones neuronales diferenciadas y no presenta relación con los mecanismos de senescencia y de apoptosis.
2. La actividad β -gal-pH6 en tejido nervioso no puede ser utilizado como un marcador de células senescentes durante el desarrollo de la retina ni del epitelio olfatorio. Por tanto, su utilización en estudios de senescencia neuronal en animales seniles debe ser combinada con resultados obtenidos con otros marcadores
3. La actividad β -gal-pH6 en el desarrollo de la extremidad se correlaciona con procesos apoptóticos y está controlado por vías señalizadoras similares a las apoptóticas.
4. En el caso de la neurogénesis, la salida del ciclo celular comparte vías comunes entre la diferenciación y la senescencia celulares, lo que posibilita la detección de la actividad β -gal-pH6 y otros marcadores característicos de la senescencia al parar el ciclo celular.
5. Los resultados del uso de la actividad β -gal-pH6 como herramienta histoquímica para la detección de la senescencia van a depender del contexto tisular en el que se aplique.

Parte de los resultados de esta tesis doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. **Autores:** José Antonio de Mera-Rodríguez, Guadalupe Álvarez-Hernán, Yolanda Gañán, Jorge Solana-Fajardo, Gervasio Martín-Partido, Joaquín Rodríguez-León y Javier Francisco-Morcillo

Título: Markers of senescence are often associated with neuronal differentiation in the developing sensory systems.

Revista: Histology and Histopathology.

Volumen: 38 **Páginas:** 1-10

Año de publicación: 2023

DOI: 10.14670/HH-18-549

2. **Autores:** José Antonio de Mera-Rodríguez, Guadalupe Álvarez-Hernán, Yolanda Gañán, Ana Santos-Almeida, Gervasio Martín-Partido, Joaquín Rodríguez-León y Javier Francisco-Morcillo.

Título: Endogenous pH 6.0-Galactosidase Activity Is Linked to Neuronal Differentiation in the Olfactory Epithelium.

Revista: Cells.

Volumen: 11, 298 **Páginas:** 1-13

Año de publicación: 2022

DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11020298>

3. **Autores:** José Antonio de Mera-Rodríguez, Guadalupe Álvarez-Hernán, Yolanda Gañán, Gervasio Martín-Partido, Joaquín Rodríguez-León y Javier Francisco-Morcillo.

Título: Is senescence-associated β -Galactosidase a reliable *in vivo* marker of cellular senescence during embryonic development?

Revista: Frontiers in Cell and Developmental Biology.

Volumen: 9, 623175 **Páginas:** 1-12

Año de publicación: 2021

DOI: 10.3389/fcell.2021.623175

4. Autores: Guadalupe Álvarez-Hernán, **José Antonio de Mera-Rodríguez**, Ismael Hernández-Núñez, Alfonso Marzal, Yolanda Gañán, Gervasio Martín-Partido, Joaquín Rodríguez-León y Javier Francisco-Morcillo.

Título: **Analysis of programmed cell death and senescence markers in the developing retina of an altricial bird species.**

Revista: **Cells.**

Volumen: 10, 504 Páginas: 1-18

Año de publicación: **2021**

DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10030504>

5. Autores: **José Antonio de Mera-Rodríguez**, Guadalupe Álvarez-Hernán, Yolanda Gañán, Gervasio Martín-Partido, Joaquín Rodríguez-León y Javier Francisco-Morcillo.

Título: **Senescence-associated β -Galactosidase activity in the developing avian retina.**

Revista: **Developmental Dynamics.**

Volumen: 248 Páginas: 850-865

Año de publicación: **2019**

DOI: 10.1002/dvdy.74

ANEXOS.

Anexo 1.



VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, TRANSFERENCIA E INNOVACIÓN

Campus Universitario
Avda^a de Elvas s/n^o
06071 BADAJOZ

Tel.: 924 28 93 05
Fax: 924 27 29 83

NºRegistro: 266/2019

D^a MARÍA REYES PANADERO, SECRETARIA DEL COMITÉ DE ÉTICA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA.

INFORMA: Que una vez evaluada por este Comité la solicitud de evaluación del procedimiento "*Eutanasia de embriones e individuos postnatales de Gallus gallus*", incluido dentro del Proyecto de Tesis titulado "**Desarrollo embrionario temprano del sistema nervioso central y de las extremidades de vertebrados**", cuyo responsable es D. José Antonio de Mera Rodríguez, y tras considerar su valor científico, su conformidad con los requisitos de reemplazo, refinamiento y reducción, teniendo en cuenta las consideraciones éticas que se ajustan a la normativa vigente al efecto, y de tal manera considerar clasificado con *grado de severidad sin recuperación* el procedimiento, y sin que sea necesario llevar a cabo una evaluación retrospectiva del mismo, este Comité ha decidido evaluar positivamente el precitado Proyecto de Tesis.

Y para que conste y surta los efectos oportunos firmo el presente informe en Cáceres a
29 de julio de 2020.

Firmado por MARIA REYES PANADERO el
día 29/07/2020 con un certificado
emitido por AC Camerfirma
Certificados Camerales

DE
FRANCISCO
MORCILLO
JAVIER -
28946338X
V^oB^o

Firmado digitalmente por DE
FRANCISCO MORCILLO JAVIER
-28946338X
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-2894633
8X, givenName=JAVIER, sn=DE
FRANCISCO MORCILLO, cn=DE
FRANCISCO MORCILLO JAVIER
-28946338X
Fecha: 2020.07.30 14:58:16
+02'00'

Fdo.: Javier de Francisco
Presidente por delegación del
Comité de Ética de
Experimentación animal

Estadios	Tiempo de incubación	
	Menos de 6	horas
1		
2	6-7	"
3	12-13	"
4	18-19	"
5	19-22	"
6	23-25	"
7	23-26	"
8	26-29	"
9	29-33	"
10	33-38	"
11	40-45	"
12	45-49	"
13	48-52	"
14	50-53	"
15	50-55	"
16	51-56	"
17	52-64	"
18	63-69	"
19	68-72	"
20	70-72	"
21	3 ½	días
22	3 ½	"
23	3 ½ - 4	"
24	4	"
25	4 ½	"
26	4 ½ - 5	"
27	5	"
28	5 ½	"
29	6	"
30	6 ½	"
31	7	"
32	7 ½	"
33	7 ½ - 8	"
34	8	"
35	8-9	"
36	10	"
37	11	"
38	12	"
39	13	"
40	14	"
41	15	"
42	16	"
43	17	"
44	18	"

Anexo 2. Correlación entre los estadios de desarrollo del embrión de *G. gallus* y sus tiempos de incubación. Hamburguer y Hamilton, 1951.

Anexo 3.

SOLUCIONES:

- **Tampón citrato:**

- Solución A: ácido cítrico 0'1M

para 1 L: 21 gr

para 0'5 L: 10'5 gr

para 25'5 mL: 0'5355 gr

- Solución B: citrato sódico ($\text{H}_5\text{C}_6\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0'1M

para 1 L: 29'41 gr

para 0'5 L: 14'7 gr

para 124'5 mL: 3'6615 gr

Para 100 ml de volumen final:

Sol. A	Sol. B	pH
46'5	3'5	3.0
43'7	6'3	3.2
31'5	18'5	4.2
20'5	29'5	5.0
13'7	36'3	5.6
8'5	41'5	6.0

Para 300 mL: 25'5 mL Sol. A + 124'5 mL Sol. B + 150 mL H₂O_d

Para 500 mL a pH6: 2'5 mL A + 207'5 mL B + 150 mL H₂O_d

- **PBS x10**

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2g

Todos estos compuestos se disuelven en el litro de agua destilada que se encontrará en agitación. Ajustar a pH a 7,4.

El **PBS 1x** (PBS) fue obtenido añadiendo un volumen de solución concentrada de PBS 10x a 9 volúmenes de agua destilada.

- **PBS-Gelatina-Tritón (PBS-G-T).**

Para 1L:

Gelatina	2g
Tritón X-100	2500µl

Calentar 1 litro de PBS. Añadir la gelatina con agitación rápida. Dejar que se transparente y después añadir el tritón X-100 hasta que se disuelva.

- **PBS-Gelatina-Tritón-Lisina (PBS-G-T-L).**

Preparar 100ml de lisina 1M:

Disolver 18,865gr de lisina en 100ml de agua destilada.

Para preparar la solución PBS-G-T-L, se toma 1ml de la solución de lisina 1M preparada y se le añaden 9ml de PBS-G-T.

- **PBS-Tritón (PBS-T).**

Disolver 500µl de Tritón X-100 en 1 litro de la solución de PBS.

- **PBS-Gelatina 15% - Sacarosa 15%.**

Para 1 litro:

Gelatina	150g
Sacarosa	150g

Calentar 800ml de agua destilada hasta ebullición. Añadir gelatina con agitación rápida. Dejar hasta que la solución adquiriera una tonalidad amarillenta y transparente. Después, añadir la sacarosa hasta su disolución. Posteriormente enrasar con agua hasta 900ml y finalmente añadir 100ml de PBS 10x. Dejar enfriar la mezcla y Alicuotar en envases de 100ml, que se almacenaran en el congelador. Para su utilización, estos envases serán descongelados en el microondas.

Anexo 4.

- **Azul de toluidina.**

Toluidina	0,5g
Tetraborato sódico	0,5g

Disolver ambos productos en 100ml de agua destilada.

- **Muestras de congelación.**

Baño en PBS a 37°- 40°C 10'-15'

- **Tinción.**

- Azul de toluidina 90'' (cubrir toda la muestra)
- Agua destilada Lavado
- Etanol 90% 1'
- Etanol 100% 1'
- Etanol 100% 1'
- Xilol 2'
- Xilol 2'
- Montaje con Eukitt

Anexo 5.

PROTOCOLO X-GAL (SECCIONES)

- Extraer embriones.
- Lavar embriones en PBS en placa de vidrio.
- Fijar en PFA 4% **toda la noche** en pollo, 2 días si es ratón.
- Sumergir en PBS Sacarosa 15% (mejor si es PBS MgCl₂) toda la noche.
- Introducir en gelatina líquida 10% PBS en moldes hasta que solidifique poniéndolo en frío (hacer cama).
- Congelar a -80°C (2-Propanol con hielo seco CO₂).
- Almacenar al menos una noche antes de cortar.
- Cortar en secciones de 20µm (50µm extremidad).
- Dejar secar los cortes.
- Conservar portas en frío (-20°C).
- Lavar con PBS/MgCl₂ x 2 10 minutos antes de usarlos.
- (PBS x1, 203,3 mg en 1 L de MgCl₂ y ajustar a pH 6 con HCl).
- Poner X-gal sobre el porta entre 350-400 µL toda la noche. Si no sale, dejarlo más tiempo (X-gal: 0.5 µL 20x KC, 0.5 µL X-gal 20x y 9 ml PBS/MgCl₂).
- Lavar con PBS x2 entre 2-3 minutos.
- Montar portas con cubres.

PROTOCOLO X-GAL (EXTREMIDAD ENTERA)

- Sumergir extremidad previamente fijada en PBS- MgCl₂ pH 6 durante un día.
- Sumergir en X-GAL (X-gal: 0.5 µL 20x KC, 0.5 µL X-gal 20x y 9 ml PBS/MgCl₂) a 37°C-38°C durante 4-8 horas hasta obtener coloración deseada (depende de la muestra).
- Refijar en PFA 4% a 4°C una noche.
- Obtener imágenes en lupa.

Anexo 6.

PROTOCOLO ANTIGEN RETRIEVAL + INMUNOHISTOQUÍMICA (FLUORESCENCIA)

Parte 1: Recuperación antigénica

1º Los portas que se obtuvieron tras cortar en el criostato se almacenaron en el congelador.

2º Sacar los portas del congelador y dejar que se atemperen a TA al menos 15 minutos.

3º Recuperación antigénica: sumergir los portas en el tampón citrato a pH6.0 al baño maría a 90°C durante ½ hora (el tampón se recupera).

4º Dejar enfriar los portas a temperatura ambiente durante 20 minutos, dentro del mismo recipiente con el citrato pH6.0 una vez sacado del baño.

Parte 2: Inmunohistoquímica

Día 1:

- Lavado de portas con PBS-T **1x10'**.
- Lavado de portas con PBS-G-T **2x10'** (calentar el PBS-G-T previamente para deshacer la gelatina).
- Inactivación de sitios inespecíficos con PBS-G-T-Lis **1h**. (TA, 350µl porta)
- Incubación con *Ab* 1º toda la noche. (TA, 200µl porta, *Ab* en PBS-G-T).

Día 2:

- Lavado de portas con PBS-T **2x5'**.
- Lavado de portas con PBS-G-T **10'** (calentar).
- Incubación con *Ab* 2º (unido a fluorescencia) **2h** (200µl porta, 1:200 PBS-G-T).
- Lavado de portas con PBS-T **2x5'** (en oscuridad).
- Lavado de portas con PBS-G-T **10'** (en oscuridad).
- Incubación con DAPI **10'** (en oscuridad) (400-450µl porta).
- Lavado de portas con PBS1x **2x10'** (en oscuridad).
- Montaje de portas.

Anexo 7.

PROTOCOLO ANTIGEN RETRIEVAL + INMUNOHISTOQUÍMICA (VISIBLE)

Parte 1: Recuperación antigénica

- Atemperar los portas si proceden de congelador 15'.
- Sumergir los portas en tampón citrato a pH6.0 al baño maría a 90°C durante media hora (el tampón se recupera).
- Sacar el recipiente con los portas del baño y dejar enfriar a TA durante 15 minutos dentro del recipiente con el tampón.

Parte 2: Inmunohistoquímica

Día 1:

- Lavar con PBS-T 15'.
- Inactivación de la peroxidasa endógena (200ml de PBS-T + 1ml de H₂O₂) 45'.
- Lavar con PBS-G-T 2x15'.
- Bloqueo de los lugares inespecíficos con **PBS-G-T-Lis** (300-350µL porta) 1h.
- Incubación de **Ab. Primario** diluido en PBS-G-T (200µL porta) toda la noche.

Día 2:

- Lavar con PBS-T 3x10'.
- Lavar con PBS-G-T 10'.
- Incubación con el **Ab. Secundario** (biotinilado) en PBS-G-T 2h.
- Lavar con PBS-T 3x10'.
- Lavar con PBS-G-T 10'.
- Incubar con Extravidin-peroxidasa 1-2h a TA (1:200 en PBS-G-T).
- Lavar con PBS-T 3x10'.
- Aplicación del sustrato: **solución de DAB** (5mg DAB + 40µL H₂O₂ + 20ml de PBS) El tiempo de revelado varía según el *Ab*.
- Lavar con PBS-T 3x10'.
- Deshidratar.
- Montar portas con Eukit.

Anexo 8.

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA DE LECTINA (VISIBLE, SIN RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA)

Día 1:

- Lavado de portas con PBS-T 10'.
- Incubar con H₂O₂ 3% en PBS 45'.
- Lavado de portas con PBS 2x10'.
- Lavado de portas con PBS-T 10'.
- Incubación con Ab 1º en PBS-T toda la noche a TA.

Día 2:

- Lavado de portas con PBS 2x10'.
- Incubación con Extravidin-peroxidasa 2h a TA.
- Lavado de portas con PBS 2x10'.
- Revelado con DAB 10' a TA.
- Lavado de portas con PBS-T 3x5'.
- Deshidratación.
- Montaje con Eukitt.

Anexo 9.

PROTOCOLO TUNEL (Roche®)

- Eliminar gelatina en PBS a 40°C.
- Lavar en PBS x2.
- Incubar secciones en 10µg/ml de Proteinasas K en PBS durante 10 minutos a TA.
- Post-fijar con PFA 4% durante 10 minutos.
- Lavar en PBS x2.
- Incubar con solución de bloqueo (3% H₂O₂ en PBS) recién hecha, durante 20 minutos a TA.
- Lavar en PBS x2.
- Incubar con solución de permeabilización (0,1% Tritón X-100 en 0,1% de citrato sódico) durante dos minutos en hielo o 10-15 minutos en frigorífico.
- Lavar en PBS x2.
- Secar la muestra. Añadir 50-100µl de la mezcla de reacción de TUNEL sobre la muestra (45µl de nucleótido y 5µl de enzima). Poner un parafilm cubriendo la muestra para evitar la evaporación e incubar en una cámara húmeda 90 minutos a 37°C.
- Lavar en PBS x2.
- Secar la muestra. Añadir 200µl de POD por muestra. Poner un *parafilm* que cubra la muestra para evitar evaporación e incubarla en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.
- Lavar en PBS x2.
- Añadir 300µl de una solución que contenga 500µl/ml de DAB, 0,03% de H₂O₂ en PBS. Incubar hasta alcanzar el marcaje requerido a TA.
- Lavar en PBS x2.
- Montar y analizar la muestra en microscopio.
- **Tinción Rojo Neutro.**
 - Añadir a 2 ml de PBS + 100 µl de Rojo Neutro (2%) (Placa de Petri 35mm).
 - Incubar a 37°C-38°C durante 20 minutos.
 - Lavar en PBS x2.

BIBLIOGRAFÍA.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abarca-Buis R. F., Bustamante M., Cuervo R., Aguilar-Fernández-de-Lara D., and Chimal-Monroy J. (2011). Smad8 is expressed in the anterior necrotic zone: Evidence for a role of bone morphogenetic proteins/SMAD signaling in the activation of a molecular cascade that culminates in cell death. *Dev Growth Differ.* 53, 780–792. doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01285.x.
- Abraham R., Hume M., and Smith J. (1969). A histochemical study of lysosomal enzymes in the retina of the rat. *Histochemie.* 18, 195–201. doi:10.1007/BF00306166.
- Acosta J. C., Banito A., Wuestefeld T., Georgilis A., Janich P., Morton J. P., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 15, 978–990.
- Acosta J. C., O’Loughlin A., Banito A., Guijarro M. V., Augert A., Raguz S., et al. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell.* 133, 1006–1018. doi:10.1016/j.cell.2008.03.038.
- Adams P. D. (2007). Remodeling chromatin for senescence. *Aging Cell.* 6, 425–427. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00313.x.
- Adams P. D. (2009). Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Mol Cell.* 36, 2–14. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.021.
- Adler R., and Canto-Soler M. V. (2007). Molecular mechanisms of optic vesicle development: Complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol.* 305, 1–13. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.045.
- Ahuja S., Ahuja-Jensen P., Johnson L. E., Caffé A. R., Abrahamson M., Ekström P. A. R., et al. (2008). Rd1 mouse retina shows an imbalance in the activity of cysteine protease cathepsins and their endogenous inhibitor cystatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 1089–1096. doi:10.1167/iovs.07-0549.
- Alcorta D. A., Xiong Y., Phelps D., Hannon G., Beach D., and Barrett J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 93, 13742–13747. doi:10.1073/pnas.93.24.13742.
- Allavena P., Sica A., Solinas G., Porta C., and Mantovani A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 66, 1–9. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.07.004.
- Álvarez-Hernán G., Bejarano-Escobar R., Morona R., González A., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2013). Islet-1 immunoreactivity in the developing retina of *xenopus laevis*. *The Scientific World Journal.* 2013. doi:10.1155/2013/740420.
- Álvarez-Hernán G., de Mera-Rodríguez J. A., de la Gándara F., Ortega A., Barros-Gata I., Romero-Rodríguez J. A., et al. (2022a). Histogenesis and cell differentiation in the retina of *Thunnus thynnus*: A morphological and immunohistochemical study. *Tissue Cell.* 76. doi:10.1016/j.tice.2022.101809.
- Álvarez-Hernán G., de Mera-Rodríguez J. A., Hernández-Núñez I., Acedo A., Marzal A., Gañán Y., et al. (2022b). Timing and Distribution of Mitotic Activity in the Retina During Precocial and Altricial Modes of Avian Development. *Front Neurosci.* 16. doi:10.3389/fnins.2022.853544.
- Álvarez-Hernán G., de Mera-Rodríguez J. A., Hernández-Núñez I., Marzal A., Gañán Y., Martín-partido G., et al. (2021a). Analysis of programmed cell death and senescence markers in the developing retina of an altricial bird species. *Cells.* 10. doi:10.3390/cells10030504.
- Álvarez-Hernán G., de Mera-Rodríguez J. A., Hernández-Núñez I., Marzal A., Gañán Y., Martín-partido G., et al. (2021b). Analysis of programmed cell death and senescence markers in the developing retina of an altricial bird species. *Cells.* 10, 1–19. doi:10.3390/cells10030504.
- Álvarez-Hernán G., Hernández-Núñez I., Rico-Leo E. M., Marzal A., de Mera-Rodríguez J. A., Rodríguez-León J., et al. (2020a). Retinal differentiation in an altricial bird species,

- Taeniopygia guttata: An immunohistochemical study. *Exp Eye Res.* 190. doi:10.1016/j.exer.2019.107869.
- Álvarez-Hernán G., Hernández-Núñez I., Rico-Leo E. M., Marzal A., de Mera-Rodríguez J. A., Rodríguez-León J., et al. (2020b). Retinal differentiation in an altricial bird species, *Taeniopygia guttata*: An immunohistochemical study. *Exp Eye Res.* 190. doi:10.1016/j.exer.2019.107869.
- Álvarez-Hernán G., Sánchez-Resino E., Hernández-Núñez I., Marzal A., Rodríguez-León J., Martín-Partido G., et al. (2018a). Retinal histogenesis in an altricial avian species, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817). *J Anat.* 233, 106–120. doi:10.1111/joa.12809.
- Álvarez-Hernán G., Sánchez-Resino E., Hernández-Núñez I., Marzal A., Rodríguez-León J., Martín-Partido G., et al. (2018b). Retinal histogenesis in an altricial avian species, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*, Vieillot 1817). *J Anat.* 233, 106–120. doi:10.1111/joa.12809.
- Amini R., Rocha-Martins M., and Norden C. (2018). Neuronal Migration and Lamination in the Vertebrate Retina. *Front Neurosci.* 11. doi:10.3389/fnins.2017.00742.
- Attems J., Walker L., and Jellinger K. A. (2015). Olfaction and Aging: A Mini-Review. *Gerontology.* 61, 485–490. doi:10.1159/000381619.
- Au E., and Roskams A. J. (2003). Olfactory ensheathing cells of the lamina propria in vivo and in vitro. *Glia.* 41, 224–236. doi:10.1002/glia.10160.
- Baar M. P., Brandt R. M. C., Putavet D. A., Klein J. D. D., Derks K. W. J., Bourgeois B. R. M., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell.* 169, 132–147.e16. doi:10.1016/j.cell.2017.02.031.
- Baker C. V. H., and Bronner-Fraser M. (2001). Vertebrate Cranial Placodes I. Embryonic Induction. *Dev Biol.* 232, 1–61. doi:10.1006/dbio.2001.0156.
- Baker D. J., Childs B. G., Durik M., Wijers M. E., Sieben C. J., Zhong J., et al. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 530, 184–189. doi:10.1038/nature16932.
- Baker D. J., Wijshake T., Tchkonja T., Lebrasseur N. K., Childs B. G., Van De Sluis B., et al. (2011). Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 479, 232–236. doi:10.1038/nature10600.
- Balmer C. W., and LaMantia A. S. (2005). Noses and neurons: Induction, morphogenesis, and neuronal differentiation in the peripheral olfactory pathway. *Developmental Dynamics.* 234, 464–481. doi:10.1002/dvdy.20582.
- Banito A., and Lowe S. W. (2013). XA new development in senescence. *Cell.* 155, 977–978. doi:10.1016/j.cell.2013.10.050.
- Barrow J. R., Thomas K. R., Boussadia-Zahui O., Moore R., Kemler R., Capecchi M. R., et al. (2003). Ectodermal Wnt3 β -catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev.* 17, 394–409. doi:10.1101/gad.1044903.
- Bartkova J., Rezaei N., Lontos M., Karakaidos P., Kletsas D., and Issaeva N. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 35, 927–945.
- Bavik C., Coleman I., Dean J. P., Knudsen B., Plymate S., and Nelson P. S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 66, 794–802. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1716.
- Baye L. M., and Link B. A. (2007). Interkinetic Nuclear Migration and the Selection of Neurogenic Cell Divisions during Vertebrate Retinogenesis. *Journal of Neuroscience.* 27, 10143–10152. doi:10.1523/JNEUROSCI.2754-07.2007.
- Beauséjour C. M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S. W., Yaswen P., et al. (2003). Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO Journal.* 22, 4212–4222. doi:10.1093/emboj/cdg417.

- Beites C. L., Kawauchi S., Crocker C. E., and Calof A. L. (2005). Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res.* 306, 309–316. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.027.
- Bejarano-Escobar R., Álvarez-Hernán G., Morona R., González A., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2015). Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor *Islet-1* in the developing and mature vertebrate retina. *Exp Eye Res.* 138, 22–31. doi:10.1016/j.exer.2015.06.021.
- Bejarano-Escobar R., Blasco M., DeGrip W. J., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2009). Cell differentiation in the retina of an epibenthonic teleost, the Tench (*Tinca tinca*, Linne 1758). *Exp Eye Res.* 89, 398–415. doi:10.1016/j.exer.2009.04.007.
- Bejarano-Escobar R., Blasco M., DeGrip W. J., Oyola-Velasco J. A., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2010). Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 314B, 580–605. doi:10.1002/jez.b.21363.
- Bejarano-Escobar R., Blasco M., DeGrip W., Oyola-Velasco J., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2011a). Erratum: Eye development and retinal differentiation in an altricial fish species, the senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 316B, 162–163. doi:10.1002/jez.b.21393.
- Bejarano-Escobar R., Blasco M., Durán A. C., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2013). Chronotopographical distribution patterns of cell death and of lectin-positive macrophages/microglial cells during the visual system ontogeny of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat.* 223, 171–184. doi:10.1111/joa.12071.
- Bejarano-Escobar R., Blasco M., Durán A. C., Rodríguez C., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2012a). Retinal histogenesis and cell differentiation in an elasmobranch species, the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula*. *J Anat.* 220, 318–335. doi:10.1111/j.1469-7580.2012.01480.x.
- Bejarano-Escobar R., Blasco M., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2012b). Light-induced degeneration and microglial response in the retina of an epibenthonic pigmented teleost: age-dependent photoreceptor susceptibility to cell death. *Journal of Experimental Biology.* 215, 3799–3812. doi:10.1242/jeb.072124.
- Bejarano-Escobar R., Holguín-Arévalo M. S., Montero J. A., Francisco-Morcillo J., and Martín-Partido G. (2011b). Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of Cathepsins B and D. *Developmental Dynamics.* 240, 1841–1855. doi:10.1002/dvdy.22673.
- Bejarano-Escobar R., Holguín-Arévalo M. S., Montero J. A., Francisco-Morcillo J., and Martín-Partido G. (2011c). Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of Cathepsins B and D. *Developmental Dynamics.* 240, 1841–1855. doi:10.1002/dvdy.22673.
- Ben-Porath I., and Weinberg R. A. (2004). When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation.* 113, 8–13. doi:10.1172/jci20663.
- Bernadotte A., Mikhelson V. M., and Spivak I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging.* 8, 3–11. doi:10.18632/aging.100871.
- Bhanu U. M., Mandraju R. K., Bhaskar C., and Kondapi A. K. (2010). Cultured cerebellar granule neurons as an in vitro aging model: Topoisomerase II β as an additional biomarker in DNA repair and aging. *Toxicology in Vitro.* 24, 1935–1945. doi:10.1016/j.tiv.2010.08.003.
- Bhat R., Crowe E. P., Bitto A., Moh M., Katsetos C. D., Garcia F. U., et al. (2012). Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PLoS One.* 7, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0045069.
- Biehlmaier O., Neuhaus S., and Kohler K. (2001). Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina. *Cell Tissue Res.* 306, 199–207. doi:10.1007/s004410100447.

- Biran A., Zada L., Abou Karam P., Vadai E., Roitman L., Ovadya Y., et al. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*. 16, 661–671. doi:10.1111/ace.12592.
- Blagosklonny M. V. (2012). Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: Terminology for TOR-driven aging. *Aging*. 4, 159–165. doi:10.18632/aging.100443.
- Brann J. H., and Firestein S. J. (2014). A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Front Neurosci*. 8, 1–11. doi:10.3389/fnins.2014.00182.
- Brusentsev E. Y., Tikhonova M. A., Herbeck Y. E., Ragaeva D. S., Rozhkova I. N., and Amstislavsky S. Y. (2017). Developmental aspects of senescence. *Russ j dev biol*. 48, 93–105.
- Buck L. B. (1992). A novel multigene family may encode odorant receptors. *Soc Gen Physiol Ser*. 47, 39–51.
- Bursuker I., Rhodes J. M., and Goldman R. (1982). β -Galactosidase—An indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes. *J Cell Physiol*. 112, 385–390. doi:10.1002/jcp.1041120312.
- Bussian T. J., Aziz A., Meyer C. F., Swenson B. L., van Deursen J. M., and Baker D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*. 562, 578–582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y.
- Cabrerizo J., Urcola J. H., and Vecino E. (2017). Changes in surface tension of aqueous humor in anterior segment ocular pathologies. *Vision (Switzerland)*. 1, 1–12. doi:10.3390/vision1010006.
- Caggiano M., Kauer J. S., and Hunter D. D. (1994). Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: A lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron*. 13, 339–352. doi:10.1016/0896-6273(94)90351-4.
- Calof A. L., and Guevara J. L. (1993). Cell Lines Derived from Retrovirus-Mediated Oncogene Transduction into Olfactory Epithelium Cultures. *Neuroprotocols*. 3, 222–231. doi:10.1006/ncmn.1993.1057.
- Calof A. L., Hagiwara N., Holcomb J. D., Mumm J. S., and Shou J. (1996). Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. *J Neurobiol*. 30, 67–81. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1<67::AID-NEU7>3.0.CO;2-E.
- Campisi J. (2003). Cellular senescence and apoptosis: How cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol*. 38, 5–11. doi:10.1016/S0531-5565(02)00152-3.
- Campisi J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120, 513–522. doi:10.1016/j.cell.2005.02.003.
- Campisi J. (2011). Cellular senescence: Putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev*. 21, 107–112. doi:10.1016/j.gde.2010.10.005.
- Campisi J., Andersen J. K., Kapahi P., and Melov S. (2011). Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 21, 354–359. doi:10.1016/j.semcancer.2011.09.001.
- Campisi J., and D’Adda Di Fagagna F. (2007a). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 729–740. doi:10.1038/nrm2233.
- Campisi J., and D’Adda Di Fagagna F. (2007b). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 729–740. doi:10.1038/nrm2233.
- Campisi J., and D’Adda Di Fagagna F. (2007c). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 729–740. doi:10.1038/nrm2233.
- Candal E., Anadón R., Degrip W. J., and Rodríguez-Moldes I. (2005). Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Developmental Brain Research*. 154, 101–119. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.10.008.
- Candal E., Ferreiro-Galve S., Anadón R., and Rodríguez-Moldes I. (2008). Morphogenesis in the retina of a slow-developing teleost: Emergence of the GABAergic system in relation to cell proliferation and differentiation. *Brain Res*. 1194, 21–27. doi:10.1016/j.brainres.2007.11.065.
- Carr, and Farbman A. I. (1993a). Carr1993EN(apoptosis).pdf.

- Carr V. M., and Farbman A. I. (1993b). The Dynamics of Cell Death in the Olfactory Epithelium. *Exp Neurol.* 124, 308–314. doi:10.1006/exnr.1993.1201.
- Carter L. A., MacDonald J. L., and Roskams A. J. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *Journal of Neuroscience.* 24, 5670–5683. doi:10.1523/JNEUROSCI.0330-04.2004.
- Chang J., Wang Y., Shao L., Laberge R. M., Demaria M., Campisi J., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 22, 78–83. doi:10.1038/nm.4010.
- Chavarría T., Baleriola J., Mayordomo R., De Pablo F., and De La Rosa E. J. (2013). Early neural cell death is an extensive, dynamic process in the embryonic chick and mouse retina. *The Scientific World Journal.* 2013, 627240. doi:10.1155/2013/627240.
- Chavarría T., Valenciano A. I., Mayordomo R., Egea J., Comella J. X., Hallböök F., et al. (2007). Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development. *Dev Neurobiol.* 67, 1777–1788. doi:10.1002/dneu.20554.
- Chen D. D., Peng X., Wang Y., Jiang M., Xue M., Shang G., et al. (2021). HSP90 acts as a senomorphic target in senescent retinal pigmental epithelial cells. *Aging.* 13, 21547–21570. doi:10.18632/aging.203496.
- Chernova T., Nicotera P., and Smith A. G. (2006). Heme deficiency is associated with senescence and causes suppression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits expression in primary cortical neurons. *Mol Pharmacol.* 69, 697–705. doi:10.1124/mol.105.016675.
- Chien Y., Scuoppo C., Wang X., Fang X., Balgley B., Bolden J. E., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 25, 2125–2136. doi:10.1101/gad.17276711.
- Childs B. G., Durik M., Baker D. J., and Van Deursen J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. *Nat Med.* 21, 1424–1435. doi:10.1038/nm.4000.
- Chimal-Monroy J., Rodríguez-León J., Montero J. A., Gañán Y., Macías D., Merino R., et al. (2003a). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol.* 257, 292–301. doi:10.1016/S0012-1606(03)00066-6.
- Chimal-Monroy J., Rodríguez-León J., Montero J. A., Gañán Y., Macías D., Merino R., et al. (2003b). Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: Sox genes and BMP signaling. *Dev Biol.* 257, 292–301. doi:10.1016/S0012-1606(03)00066-6.
- Chizhikov V. V., and Millen K. J. (2004). Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS. *nat rev neurosci.* 5, 808–812.
- Choi H. R., Cho K. A., Kang H. T., Lee J. Bin, Kaeberlein M., Suh Y., et al. (2011). Restoration of senescent human diploid fibroblasts by modulation of the extracellular matrix. *Aging Cell.* 10, 148–157. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00654.x.
- Choi R., and Goldstein B. J. (2018). Olfactory epithelium: Cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 3, 35–42. doi:10.1002/lio2.135.
- Chung H. Y., Cesari M., Anton S., Marzetti E., Giovannini S., Seo A. Y., et al. (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases.1. Chung HY, Cesari M, Anton S, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2009;8(1):18-30. doi:10.1016/j.arr.2008.07.002. *Ageing Res Rev.* 8, 18–30. doi:10.1016/j.arr.2008.07.002. Molecular.
- Chuprin A., Gal H., Biron-Shental T., Biran A., Amiel A., Rozenblatt S., et al. (2013). Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes Dev.* 27, 2356–2366. doi:10.1101/gad.227512.113.

- Church V. L., and Francis-West P. (2002). Wnt signalling during limb development The Wnt Gene Family. Available at: www.ijdb.ehu.es.
- Collado M., Blasco M. A., and Serrano M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*. 130, 223–233. doi:10.1016/j.cell.2007.07.003.
- Collado M., and Serrano M. (2010). Senescence in tumours: Evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*. 10, 51–57. doi:10.1038/nrc2772.
- Collins C. A., Olsen I., Zammit P. S., Heslop L., Petrie A., Partridge T. A., et al. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*. 122, 289–301. doi:10.1016/j.cell.2005.05.010.
- Cook B., Portera-Cailliau C., and Adler R. (1998). Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *Journal of Comparative Neurology*. 396, 12–19. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19980622)396:1<12::AID-CNE2>3.0.CO;2-L.
- Coppé J. P., Desprez P. Y., Krtolica A., and Campisi J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 5, 99–118. doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144.
- Coppé J. P., Patil C. K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D. P., Goldstein J., et al. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 6. doi:10.1371/journal.pbio.0060301.
- Correia-Melo C., and Passos J. F. (2015). Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 1847, 1373–1379. doi:10.1016/j.bbabi.2015.05.017.
- Cruickshanks H. A., McBryan T., Nelson D. M., VanderKraats N. D., Shah P. P., Tuyn J. van, et al. (2013). Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nat Cell Biol*. 50, 381–389. doi:10.1038/ncb2879.Senescent.
- Czarkwiani A., and Yun M. H. (2018). Out with the old, in with the new: senescence in development. *Curr Opin Cell Biol*. 55, 74–80. doi:10.1016/j.ceb.2018.05.014.
- Da Silva-Álvarez S., Guerra-Varela J., Sobrido-Cameán D., Quelle A., Barreiro-Iglesias A., Sánchez L., et al. (2020). Developmentally-programmed cellular senescence is conserved and widespread in zebrafish. *Aging*. 12, 17895–17901. doi:10.18632/aging.103968.
- Da Silva-Álvarez S., Lamas-González O., Ferreirós A., González P., Gómez M., García-Caballero T., et al. (2018). Pkd2 deletion during embryo development does not alter mesonephric programmed cell senescence. *International Journal of Developmental Biology*. 62, 637–640. doi:10.1387/ijdb.180078mc.
- Da Silva-Álvarez S., Picallos-Rabina P., Antelo-Iglesias L., Triana-Martínez F., Barreiro-Iglesias A., Sánchez L., et al. (2019). The development of cell senescence. *Exp Gerontol*. 128, 110742. doi:10.1016/j.exger.2019.110742.
- D’Adda Di Fagagna F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *nat rev Cancer*. 8, 512–522. doi:10.1038/nrc2440.
- D’Adda Di Fagagna F., Reaper P., Clay-Farrace L., H F., and P C. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 426, 194–198.
- Davaapil H., Brockes J. P., and Yun M. H. (2017). Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development*. 144, 106–114. doi:10.1242/dev.138222.
- Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J. D., Campisi J., and Toussaint O. (2009a). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 4, 1798–1806. doi:10.1038/nprot.2009.191.
- Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J. D., Campisi J., and Toussaint O. (2009b). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 4, 1798–1806. doi:10.1038/nprot.2009.191.
- Deckner M. L., Risling M., and Frisén J. (1997). Apoptotic death of olfactory sensory neurons in the adult rat. *Exp Neurol*. 143, 132–140. doi:10.1006/exnr.1996.6352.

- Demaria M., Ohtani N., Youssef S. A., Rodier F., Toussaint W., Mitchell J. R., et al. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 31, 722–733. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012.
- Demaria M., O’Leary M. N., Chang J., Shao L., Liu S., Alimirah F., et al. (2017). Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov*. 7, 165–176.
- Dierick J. F., Eliaers F., Remacle J., Raes M., Fey S. J., Larsen P. M., et al. (2002). Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*. 64, 1011–1017. doi:10.1016/S0006-2952(02)01171-1.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92, 9363–9367. doi:10.1016/j.jacc.2008.11.047.
- Domínguez-Bautista J. A., Acevo-Rodríguez P. S., and Castro-Obregón S. (2021). Programmed Cell Senescence in the Mouse Developing Spinal Cord and Notochord. *Front Cell Dev Biol*. 9, 1–15. doi:10.3389/fcell.2021.587096.
- Dominick B. G. A., and Krizhanovsky V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 71, 4373–4386. doi:10.1007/s00018-014-1691-3.
- Dong W., Cheng S., Huang F., Fan W., Chen Y., Shi H., et al. (2011). Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. *Medical Science Monitor*. 17, 91–96. doi:10.12659/msm.881706.
- Dörr J. R., Yu Y., Milanovic M., Beuster G., Zasada C., Däbritz J. H. M., et al. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*. 501, 421–425. doi:10.1038/nature12437.
- Dou Z., Xu C., Donahue G., Shimi T., Pan J. A., Zhu J., et al. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*. 527, 105–109. doi:10.1038/nature15548.
- Drenhaus U., Voigt T., and Rager G. (2007). Onset of synaptogenesis in the plexiform layers of the chick retina: A transmission electron microscopic study. *Microsc Res Tech*. 70, 329–335. doi:10.1002/jemt.20414.
- Edward D. P., and Kaufman L. M. (2003). Anatomy, development, and physiology of the visual system. *Pediatr Clin North Am*. 50, 1–23. doi:10.1016/S0031-3955(02)00132-3.
- Egensperger R., Maslim J., Bisti S., Holländer H., and Stone J. (1996). Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Developmental Brain Research*. 97, 1–8. doi:10.1016/S0165-3806(96)00119-8.
- El-Hifnawi E. (1995). Localization of cathepsin D in rat ocular tissues. An immunohistochemical study. *Annals of Anatomy*. 177, 11–17. doi:10.1016/S0940-9602(11)80123-8.
- Ellis J. H., Richards D. E., and Rogers J. H. (1991). Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. *Cell Tissue Res*. 264, 197–208. doi:10.1007/BF00313956.
- Erusalimsky J., and Kurz D. (2005). Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol*. 40, 634–642.
- Escada P. A., Lima C., and Madeira da Silva J. (2009). The human olfactory mucosa. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 266, 1675–1680. doi:10.1007/s00405-009-1073-x.
- Esteve P., Bovolenta P., and Trousse F. (2001). Bmp4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye. *J Neurosci*. 21, 1292–1301. doi:10.1523/JNEUROSCI.1292-01.2001 [pii].
- Fallon J. F., and Cameron J. (1977). Interdigital cell death during limb development of the turtle and lizard with an interpretation of evolutionary significance. *J Embryol Exp Morphol*. 40, 285–289.
- Fallon J. F., López A., Ros M. A., Savage M. P., Olwin B. B., and Simandl B. K. (1994). FGF-2: Apical Ectodermal Ridge Growth Signal for Chick Limb Development. *Science* (1979). 264, 104–107. doi:10.1126/science.7908145.
- Farbman A. I. (1994). Developmental biology of olfactory sensory neurons. *Cell biology*. 5, 3–10.

- Farbman A. I., and Margolis F. L. (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: Immunohistochemical localization. *Dev Biol.* 74, 205–215. doi:10.1016/0012-1606(80)90062-7.
- Ferbeyre G., De Stanchina E., Querido E., Baptiste N., Prives C., and Lowe S. W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* 14, 2015–2027. doi:10.1101/gad.14.16.2015.
- Fernández-Terán M., and Ros M. A. (2008). The Apical Ectodermal Ridge: Morphological aspects and signaling pathways. *International Journal of Developmental Biology.* 52, 857–871. doi:10.1387/ijdb.072416mf.
- Ferreiro-Galve S., Rodríguez-Moldes I., Anadón R., and Candal E. (2010a). Patterns of cell proliferation and rod photoreceptor differentiation in shark retinas. *J Chem Neuroanat.* 39, 1–14. doi:10.1016/j.jchemneu.2009.10.001.
- Ferreiro-Galve S., Rodríguez-Moldes I., and Candal E. (2010b). Calretinin immunoreactivity in the developing retina of sharks: Comparison with cell proliferation and GABAergic system markers. *Exp Eye Res.* 91, 378–386. doi:10.1016/j.exer.2010.06.011.
- Fischer A. J., Foster S., Scott M. A., and Sherwood P. (2008). Transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina. *Journal of Comparative Neurology.* 506, 584–603. doi:10.1002/cne.21578.
- Franceschi C., Capri M., Monti D., Giunta S., Olivieri F., Sevini F., et al. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 128, 92–105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016.
- Francisco-Morcillo J., Bejarano-Escobar R., Rodríguez-León J., Navascués J., and Martín-Partido G. (2014). Ontogenetic Cell Death and Phagocytosis in the Visual System of Vertebrates. *Developmental Dynamics.* 243, 1203–1225. doi:10.1002/dvdy.24174.
- Francisco-Morcillo J., Hidalgo-Sánchez M., and Martín-Partido G. (2004). Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle. *Anat Embryol (Berl).* 208, 289–299. doi:10.1007/s00429-004-0398-x.
- Francisco-Morcillo J., Hidalgo-Sánchez M., and Martín-Partido G. (2006). Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res.* 1103, 32–48. doi:10.1016/j.brainres.2006.05.052.
- Francisco-Morcillo J., Sánchez-Calderón H., Kawakami Y., Belmonte J. C. I., Hidalgo-Sánchez M., and Martín-Partido G. (2005). Expression of Fgf19 in the developing chick eye. *Developmental Brain Research.* 156, 104–109. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.12.011.
- Freund A., Laberge R.-M., Demaria M., and Campisi J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell.* 23, 2066–2075.
- Freund A., Orjalo A. V., Desprez P. Y., and Campisi J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 16, 238–246. doi:10.1016/j.molmed.2010.03.003.
- Freund A., Patil C. K., and Campisi J. (2011). P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO Journal.* 30, 1536–1548. doi:10.1038/emboj.2011.69.
- Fuchs Y., and Steller H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 147, 742–758. doi:10.1016/j.cell.2011.10.033.
- Fumagalli M., Rossiello F., Clerici M., Barozzi S., Cittaro D., Kaplunov J. M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol.* 14, 355–365. doi:10.1038/ncb2466.
- Funayama R., Saito M., Tanobe H., and Ishikawa F. (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *Journal of Cell Biology.* 175, 869–880. doi:10.1083/jcb.200604005.
- Gañán Y., Macías D., Duterque-Coquillaud M., Ros M. A., and Hurlé J. M. (1996). Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development.* 122, 2349–2357. doi:10.1242/dev.122.8.2349.

- Gañán Y., Macías D., García-Martínez V., and Hurlé J. M. (1993). In vivo experimental induction of interdigital tissue chondrogenesis in the avian limb bud results in the formation of extradigits. Effects of local microinjection of staurosporine, zinc chloride and growth factors. *Prog Clin Biol Res.* 383A, 127–39.
- García-Porrero J. A., and Ojeda J. L. (1979). Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A TEM and SEM study. *Experientia.* 35, 375–376. doi:10.1007/BF01964362.
- Gavrieli Y., Sherman Y., and Ben-Sasson S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology.* 119, 493–501. doi:10.1083/jcb.119.3.493.
- Geng Y. Q., Guan J. T., Xu X. H., and Fu Y. C. (2010). Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 396, 866–869. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.011.
- Getchell T. v., Peng X., Green C. P., Stromberg A. J., Chen K.-C., Mattson M. P., et al. (2004). In silico analysis of gene expression profiles in the olfactory mucosae of aging senescence-accelerated mice. *J Neurosci Res.* 77, 430–452. doi:10.1002/jnr.20157.
- Ghosh K., and Capell B. C. (2016). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. *J Invest Dermatol.* 136, 2133–2139. doi:10.1016/j.jid.2016.06.621.The.
- Gibaja A., Aburto M. R., Pulido S., Collado M., Hurlé J. M., Varela-Nieto I., et al. (2019). TGFβ2-induced senescence during early inner ear development. *Sci Rep.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41598-019-42040-0.
- Giudice Q. Lo, Leleu M., Manno G. La, and Fabre P. J. (2019). Single-cell transcriptional logic of cell-fate specification and axon guidance in early-born retinal neurons. *Development (Cambridge).* 146. doi:10.1242/dev.178103.
- Glusman G., Yanai I., Rubín I., and Lancet D. (2001). The complete human olfactory subgenome. *Genome Res.* 11, 685–702. doi:10.1101/gr.171001.
- Going J. J., Stuart R. C., Downie M., Fletcher-Monaghan A. J., and Nicol Keith W. (2002). “Senescence-associated” β-galactosidase activity in the upper gastrointestinal tract. *Journal of Pathology.* 196, 394–400. doi:10.1002/path.1059.
- Golde T. E., and Miller V. M. (2009). Proteinopathy-induced neuronal senescence: a hypothesis for brain failure in Alzheimer’s and other neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res Ther.* 1, 5. doi:10.1186/alzrt5.
- Goldstein B. J., Goss G., Hatzistergos K. E., and Rangel E. B. (2015). NIH Public Access. 523, 15–31. doi:10.1002/cne.23653.Adult.
- Gorgoulis V. G., and Halazonetis T. D. (2010). Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. *Curr Opin Cell Biol.* 22, 816–827. doi:10.1016/j.ceb.2010.07.013.
- Graziadei G. A. M., Stanley R. S., and Graziadei P. P. C. (1980). The olfactory marker protein in the olfactory system of the mouse during development. *Neuroscience.* 5, 1239–1252. doi:10.1016/0306-4522(80)90197-9.
- Graziadei P. P. C., and Graziadei G. A. M. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol.* 8, 1–18. doi:10.1007/BF01206454.
- Grivennikov S. I., Greten F. R., and Karin M. (2011). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883–899. *Cell.* 140, 883–899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.Immunity.
- Grotewold L., and Rüther U. (2002). Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol.* 46, 943–7.
- Guasto A., and Cormier-Daire V. (2021). Signaling pathways in bone development and their related skeletal dysplasia. *Int J Mol Sci.* 22. doi:10.3390/ijms22094321.

- Hahn C. G., Han L. Y., Rawson N. E., Mirza N., Borgmann-Winter K., Lenox R. H., et al. (2005). In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *Journal of Comparative Neurology*. 483, 154–163. doi:10.1002/cne.20424.
- Hall B. M., Balan V., Gleiberman A. S., Strom E., Krasnov P., Virtuoso L. P., et al. (2017). p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli. *Aging*. 9, 1867–1884. doi:10.18632/aging.101268.
- Hamburger V., and Hamilton H. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*. 88, 49–92.
- Harahush B. K., Hart N. S., Green K., and Collin S. P. (2009). Retinal neurogenesis and ontogenetic changes in the visual system of the brown banded bamboo shark, *Chiloscyllium punctatum* (hemiscyllidae, elasmobranchii). *J Comp Neurol*. 513, 83–97. doi:10.1002/cne.21953.
- Hayflick L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 37, 614–636. doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- Hayflick L., and Moorhead P. S. (1961). The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*. 25, 585–621.
- He S., and Sharpless N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*. 169, 1000–1011. doi:10.1016/j.cell.2017.05.015.
- Heavner W., and Pevny L. (2012). Eye Development and Retinogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4, a008391–a008391. doi:10.1101/cshperspect.a008391.
- Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., and Sedivy J. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science* (1979). 311, 1257.
- Herbig U., Jobling W. A., Chen B. P. C., Chen D. J., and Sedivy J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol Cell*. 14, 501–513. doi:10.1016/S1097-2765(04)00256-4.
- Hernández-Segura A., de Jong T. V., Melov S., Guryev V., Campisi J., and Demaria M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology*. 27, 2652–2660.e4. doi:10.1016/j.cub.2017.07.033.
- Hernández-Segura A., Nehme J., and Demaria M. (2018a). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 28, 436–453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001.
- Hernández-Segura A., Nehme J., and Demaria M. (2018b). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 28, 436–453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001.
- Hernández-Segura A., Nehme J., and Demaria M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 28, 436–453. doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001.
- Herranz N., and Gil J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*. 128, 1238–1246. doi:10.1172/JCI95148.
- Hinds J. W., and Hinds P. L. (1974). Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: An electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev Biol*. 37, 381–416. doi:10.1016/0012-1606(74)90156-0.
- Hjelmeland L. M. (1999). Senescence of the retinal pigmented epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40, 1–2.
- Hoenicke L., and Zender L. (2012). Immune surveillance of senescent cells-biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*. 33, 1123–1126. doi:10.1093/carcin/bgs124.
- Holbrook E. H., Szumowski K. E. M., and Schwob J. E. (1995). An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *Journal of Comparative Neurology*. 363, 129–146. doi:10.1002/cne.903630111.
- Holbrook E. H., Wu E., Curry W. T., Lin D. T., and Schwob J. E. (2011). Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope*. 121, 1687–1701. doi:10.1002/lary.21856.Immunohistochemical.

- Holt C. E., Bertsch T. W., Ellis H. M., and Harris W. A. (1988). Cellular determination in the xenopus retina is independent of lineage and birth date. *Neuron*. 1, 15–26. doi:10.1016/0896-6273(88)90205-X.
- Hori S., Nishida T., and Mukai N. (1980). Ultrastructural studies on lysosomes in retinal Muller cells of streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 19, 1295–1300.
- Horowitz L. F., Saraiva L. R., Kuang D., Yoon K. H., Buck L. B., Horowitz L. F., et al. (2014). Olfactory receptor patterning in a higher primate. *Journal of Neuroscience*. 34, 12241–12252. doi:10.1523/JNEUROSCI.1779-14.2014.
- Huang T., and Rivera-Pérez J. A. (2014a). Senescence-associated β -galactosidase activity marks the visceral endoderm of mouse embryos but is not indicative of senescence. *Genesis*. 52, 300–308. doi:10.1002/dvg.22761.
- Huang T., and Rivera-Pérez J. A. (2014b). Senescence-associated β -galactosidase activity marks the visceral endoderm of mouse embryos but is not indicative of senescence. *Genesis*. 52, 300–308. doi:10.1002/dvg.22761.
- Hurlé J. M., Ros M. A., Climent V., and García-Martínez V. (1996). Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Microsc Res Tech*. 34, 236–246. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19960615)34:3<236::AID-JEMT6>3.0.CO;2-N.
- Hutson L. D., and Bothwell M. (2001). Expression and function of *Xenopus laevis* p75NTR suggest evolution of developmental regulatory mechanisms. *J Neurobiol*. 5, 79–98. doi:10.1002/neu.1067.
- Iannello A., Thompson T. W., Ardolino M., Lowe S. W., and Raulet D. H. (2013). p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*. 210, 2057–2069. doi:10.1084/jem.20130783.
- Irvine K. M., Skoien R., Bokil N. J., Melino M., Thomas G. P., Loo D., et al. (2014). Senescent human hepatocytes express a unique secretory phenotype and promote macrophage migration. *World J Gastroenterol*. 20, 17851–17862. doi:10.3748/wjg.v20.i47.17851.
- Ivanov A., Pawlikowski J., Manoharan I., Tuyn J. Van, Nelson D. M., Singh Rai T., et al. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *Journal of Cell Biology*. 202, 129–143. doi:10.1083/jcb.201212110.
- Jeyapalan J. C., Ferreira M., Sedivy J. M., and Herbig U. (2007a). Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev*. 128, 36–44. doi:10.1016/j.mad.2006.11.008.
- Jeyapalan J., Ferreira M., ... J. S.-M. of ageing and, and 2007 U. (2007b). Accumulation of senescent cells in aging primates « Ouroboros. *Mech Ageing Dev*. 128, 36–44. doi:10.1016/j.mad.2006.11.008.
- Jpma I. A. S., and Greider C. W. (2003). Short telomeres induce a DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 14, 987–1001. doi:10.1091/mbc.02-04-0057.
- Jurk D., Wang C., Miwa S., Maddick M., Korolchuk V., Tzolou A., et al. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell*. 11, 996–1004. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x.
- Kang C., Xu Q., Martin T. D., Li M. Z., Demaria M., Aron L., et al. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* (1979). 349, aaa5612. doi:10.1126/science.aaa5612.
- Kang T.-W., Yevsa T., Woller N., Hoenicke L., Wuestefeld T., Dauch D., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 479, 547–551.
- Kawakami Y., Rodríguez-León J., Koth C. M., Büscher D., Itoh T., Raya Á., et al. (2003). MKP3 mediates the cellular response to FGF8 signalling in the vertebrate limb. *Nat Cell Biol*. 5, 513–519. doi:10.1038/ncb989.

- Kawauchi S., Beites C. L., Crocker C. E., Wu H. H., Bonnin A., Murray R., et al. (2004). Molecular signals regulating proliferation of stem and progenitor cells in mouse olfactory epithelium. *Dev Neurosci.* 26, 166–180. doi:10.1159/000082135.
- Keller A., and Margolis F. L. (1975). Immunological Studies of the Rat Olfactory. *J Neurochem.* 24, 1101–1106.
- Knabe W., Süß M., and Kuhn H. J. (2000). The patterns of cell death and of macrophages in the developing forebrain of the tree shrew *Tupaia belangeri*. *Anat Embryol (Berl).* 201, 157–168. doi:10.1007/PL00008237.
- Kolb H., Nelson R., Ahnelt P., and Cuenca N. (2001). “Chapter 1 Cellular organization of the vertebrate retina,” in 3–26. doi:10.1016/S0079-6123(01)31005-1.
- Kondo K., Kikuta S., Ueha R., Suzukawa K., and Yamasoba T. (2020). Age-Related Olfactory Dysfunction: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *Front Aging Neurosci.* 12, 1–16. doi:10.3389/fnagi.2020.00208.
- Kondo K., Suzukawa K., Sakamoto T., Watanabe K., Kanaya K., Ushio M., et al. (2010). Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: Cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death. *Journal of Comparative Neurology.* 518, 1962–1975. doi:10.1002/cne.22316.
- Kopp H. G., Hooper A. T., Shmelkov S. v., and Rafii S. (2007). β -galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histol Histopathol.* 22, 971–976. doi:10.14670/HH-22.971.
- Korolchuk V. I., Miwa S., Carroll B., and von Zglinicki T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine.* 21, 7–13. doi:10.1016/j.ebiom.2017.03.020.
- Kourtis N., and Tavernarakis N. (2007). Non-developmentally programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cancer Biol.* 17, 122–133. doi:10.1016/j.semcancer.2006.11.004.
- Kozlowski M. R. (2012). RPE cell senescence: A key contributor to age-related macular degeneration. *Med Hypotheses.* 78, 505–510. doi:10.1016/j.mehy.2012.01.018.
- Kritsilis M., Rizou S. V., Koutsoudaki P. N., Evangelou K., Gorgoulis V. G., and Papadopoulos D. (2018). Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. *Int J Mol Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19102937.
- Krizhanovsky V., Xue W., Zender L., Yon M., Hernando E., and Lowe S. W. (2008). Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73, 513–522. doi:10.1101/sqb.2008.73.048.
- Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W. J., and Peeper D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479. doi:10.1101/gad.1971610.by.
- Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld L. C. W., Douma S., van Doorn R., Desmet C. J., et al. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell.* 133, 1019–1031. doi:10.1016/j.cell.2008.03.039.
- Kuilman T., and Peeper D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *nat rev Cancer.* 9, 81–94.
- Kulaga H. M., Leitch C. C., Eichers E. R., Badano J. L., Lesemann A., Hoskins B. E., et al. (2004). Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat Genet.* 36, 994–998. doi:10.1038/ng1418.
- Kurz D. J., Decary S., Hong Y., and Erusalimsky J. D. (2000). Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 113, 3613–3622.
- Kwon W., and Freeman S. A. (2020). Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium: Recognition, Resolution, Recycling. *Front Immunol.* 11. doi:10.3389/fimmu.2020.604205.
- Laberge R. M., Awad P., Campisi J., and Desprez P. Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenvironment.* 5, 39–44. doi:10.1007/s12307-011-0069-4.

- LaMantia A.-S., Bhasin N., Rhodes K., and Heemskerk J. (2000). Mesenchymal/Epithelial Induction Mediates Olfactory Pathway Formation. *Neuron*. 28, 411–425. doi:10.1016/S0896-6273(00)00121-5.
- Lamoke F., Shaw S., Yuan J., Ananth S., Duncan M., Martin P., et al. (2015). Increased oxidative and nitrative stress accelerates aging of the retinal vasculature in the diabetic retina. *PLoS One*. 10. doi:10.1371/journal.pone.0139664.
- Lang R. A., and Bishop J. M. (1993). Macrophages are required for cell death and tissue remodeling in the developing mouse eye. *Cell*. 74, 453–462. doi:10.1016/0092-8674(93)80047-1.
- Langley B., D'Annibale M. A., Suh K., Ayoub I., Tolhurst A., Bastan B., et al. (2008). Pulse Inhibition of Histone Deacetylases Induces Complete Resistance to Oxidative Death in Cortical Neurons without Toxicity and Reveals a Role for Cytoplasmic p21waf1/cip1 in Cell Cycle-Independent Neuroprotection. *Journal of Neuroscience*. 28, 163–176. doi:10.1523/JNEUROSCI.3200-07.2008.
- Lecot P., Alimirah F., Desprez P. Y., Campisi J., and Wiley C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer*. 114, 1180–1184. doi:10.1038/bjc.2016.115.
- Lee B. Y., Han J. A., Im J. S., Morrone A., Johung K., Goodwin E. C., et al. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*. 5, 187–195. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.
- Lee K. J., Dietrich P., and Jessell T. M. (2000). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature*. 403, 734–740.
- Lee S., and Lee J. S. (2019). Cellular senescence: A promising strategy for cancer therapy. *BMB Rep*. 52, 35–41. doi:10.5483/BMBRep.2019.52.1.294.
- Leikam C., Hufnagel A. L., Otto C., Murphy D. J., Mühling B., Kneitz S., et al. (2015). In vitro evidence for senescent multinucleated melanocytes as a source for tumor-initiating cells. *Cell Death Dis*. 6, 1–13. doi:10.1038/cddis.2015.71.
- Leung C. T., Coulombe P. A., and Reed R. R. (2007). Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci*. 10, 720–726. doi:10.1038/nn1882.
- Levav-Cohen Y., Wolyniec K., Alsheich-Bartok O., Chan A. L., Woods S. J., Jiang Y. H., et al. (2012). E6AP is required for replicative and oncogene-induced senescence in mouse embryo fibroblasts. *Oncogene*. 31, 2199–2209. doi:10.1038/onc.2011.402.
- Lewandoski M., Sun X., and Martin G. (2000). Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development. *Nat Genet*. 26, 460–463.
- Li L. U., Zhao Y., and Zhang H. (2017). P16INK4a upregulation mediated by TBK1 induces retinal ganglion cell senescence in ischemic injury. *Cell Death Dis*. 8, 1–12. doi:10.1038/cddis.2017.169.
- Li Y., Zhao H., Huang X., Tang J., Zhang S., Li Y., et al. (2018). Embryonic senescent cells re-enter cell cycle and contribute to tissues after birth. *Cell Res*. 28, 775–778. doi:10.1038/s41422-018-0050-6.
- Liberia T., Martin-Lopez E., Meller S. J., and Greer C. A. (2019a). Sequential maturation of olfactory sensory neurons in the mature olfactory epithelium. *eNeuro*. 6. doi:10.1523/ENEURO.0266-19.2019.
- Liberia T., Martin-Lopez E., Meller S. J., and Greer C. A. (2019b). Sequential maturation of olfactory sensory neurons in the mature olfactory epithelium. *eNeuro*. 6, 1–19. doi:10.1523/ENEURO.0266-19.2019.
- Loganathan P. G., Nimmagadda S., Huang R., Scaal M., and Christ B. (2005). Comparative analysis of the expression patterns of Wnts during chick limb development. *Histochem Cell Biol*. 123, 195–201. doi:10.1007/s00418-005-0756-7.
- Loo A. T., Youngentob S. L., Kent P. F., and Schwob J. E. (1996). The aging olfactory epithelium: Neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 14, 881–900. doi:10.1016/S0736-5748(96)00046-9.

- López-Luppo M., Catita J., Ramos D., Navarro M., Carretero A., Mendes-Jorge L., et al. (2017). Cellular senescence is associated with human retinal microaneurysm formation during aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 58, 2832–2842. doi:10.1167/iovs.16-20312.
- López-Otín C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., and Kroemer G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell.* 153, 1194. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Lorda-Díez C. I., García-Riart B., Montero J. A., Rodríguez-León J., García-Porrero J. A., and Hurlé J. M. (2015a). Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence. *Aging.* 7, 974–985. doi:10.18632/aging.100844.
- Lorda-Díez C. I., Montero J. A., García-Porrero J. A., and Hurlé J. M. (2015b). Interdigital tissue regression in the developing limb of vertebrates. *International Journal of Developmental Biology.* 59, 55–62. doi:10.1387/ijdb.150065jh.
- Lorda-Díez C. I., Solis-Mancilla M. E., Sánchez-Fernández C., García-Porrero J. A., Hurlé J. M., and Montero J. A. (2019). Cell senescence, apoptosis and DNA damage cooperate in the remodeling processes accounting for heart morphogenesis. *J Anat.* 234, 815–829. doi:10.1111/joa.12972.
- Lujambio A., Akkari L., Simon J., Grace D., Tschaharganeh D. F., Bolden J. E., et al. (2013). Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell.* 153, 449–460. doi:10.1016/j.cell.2013.03.020.
- Ma T. C., Langley B., Ko B., Wei N., Gazaryan I. G., Zareen N., et al. (2013). A screen for inducers of p21waf1/cip1 identifies HIF prolyl hydroxylase inhibitors as neuroprotective agents with antitumor properties. *Neurobiol Dis.* 49, 13–21. doi:10.1016/j.nbd.2012.08.016.
- MacKay-Sim A. (2010). Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa. *Arch Ital Biol.* 148, 47–58. doi:10.4449/aib.v148i2.1143.
- MacKay-Sim A., and Kittel P. (1991). Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium: A quantitative autoradiographic study. *Journal of Neuroscience.* 11, 979–984. doi:10.1523/jneurosci.11-04-00979.1991.
- Magariños M., Barajas-Azpeleta R., Varela-Nieto I., and R. Aburto M. (2020). Otic Neurogenesis Is Regulated by TGFβ in a Senescence-Independent Manner. *Front Cell Neurosci.* 14, 1–9. doi:10.3389/fncel.2020.00217.
- Magklara A., Yen A., Colquitt B. M., Clowney E. J., Allen W., Markenscoff-papadimitriou E., et al. (2011). NIH Public Access. 145, 555–570. doi:10.1016/j.cell.2011.03.040.An.
- Majno G., and Joris I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *American Journal of Pathology.* 146, 3–15.
- Mannava S., Moparthy K. C., Wheeler L. J., Natarajan V., Zucker S. N., Fink E. E., et al. (2013). Depletion of deoxyribonucleotide pools is an endogenous source of DNA damage in cells undergoing oncogene-induced senescence. *American Journal of Pathology.* 182, 142–151. doi:10.1016/j.ajpath.2012.09.011.
- Mao Z., Ke Z., Gorbunova V., and Seluanov A. (2012). Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging.* 4, 431–435. doi:10.18632/aging.100467.
- Mariani F. V., Ahn C. P., and Martin G. R. (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature.* 453, 401–405. doi:10.1038/nature06876.
- Marín-Teva J. L., Calvente R., Cuadros M. A., Almendros A., and Navascués J. (1999a). Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia.* 27, 226–238. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199909)27:3<226::AID-GLIA4>3.0.CO;2-T.
- Marín-Teva J. L., Cuadros M. A., Calvente R., Almendros A., and Navascués J. (1999b). Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *Journal of Comparative Neurology.* 412, 255–275. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990920)412:2<255::AID-CNE6>3.0.CO;2-H.
- Marín-Teva J. L., Dusart I., Colin C., Gervais A., van Rooijen N., and Mallat M. (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron.* 41, 535–547. doi:10.1016/S0896-6273(04)00069-8.

- Martín G. R. (1998). The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* 12, 1571–1586. doi:10.1101/gad.12.11.1571.
- Martínez-Salazar M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Rev Colomb Biotecnol.* 11, 152–166.
- Martín-Partido G., Rodríguez-Gallardo L., Alvarez I. S., and Navascués J. (1988). Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. *Anat Rec.* 222, 272–281. doi:10.1002/ar.1092220308.
- Matjusaitis M., Chin G., Sarnoski E. A., and Stolzing A. (2016). Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev.* 29, 1–12. doi:10.1016/j.arr.2016.05.003.
- Matsunaga H., Handa J. T., Aotaki-Keen A., Sherwood S. W., West M. D., and Hjelmeland L. M. (1999). β -Galactosidase histochemistry and telomere loss in senescent retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 197–202.
- Maurya D. K., Henriques T., Marini M., Pedemonte N., Galiotta L. J. V., Rock J. R., et al. (2015a). Development of the olfactory epithelium and Nasal Glands in TMEM16A^{-/-} and TMEM16A^{+/+} Mice. *PLoS One.* 10, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0129171.
- Maurya D. K., Henriques T., Marini M., Pedemonte N., Galiotta L. J. V., Rock J. R., et al. (2015b). Development of the olfactory epithelium and Nasal Glands in TMEM16A^{-/-} and TMEM16A^{+/+} Mice. *PLoS One.* 10, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0129171.
- Mayordomo R., Valenciano A. I., De La Rosa E. J., and Hallböök F. (2003). Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *European Journal of Neuroscience.* 18, 1744–1750. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02891.x.
- McCabe K., Gunther E., and Reh T. (1999). The development of the pattern of retinal ganglion cells in the chick retina: mechanisms that control differentiation. *Development.* 126, 5713–5724.
- McHugh D., and Gil J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology.* 217, 65–77. doi:10.1083/jcb.201708092.
- Melk A., Kittikowit W., Sandhu I., Halloran K. M., Grimm P., Schmidt B. M. W., et al. (2003). Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* 63, 2134–2143. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00032.x.
- Mellén M. A., de la Rosa E. J., and Boya P. (2008). The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. *Cell Death Differ.* 15, 1279–1290. doi:10.1038/cdd.2008.40.
- Mishima K., Handa J. T., Aotaki-Keen A., Luty G. A., Morse L. S., and Hjelmeland L. M. (1999). Senescence-associated β -galactosidase histochemistry for the primate eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 1590–1593. doi:10.1271/bbb.60305.
- Miura T., Mattson M. P., and Rao M. S. (2004). Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell.* 3, 333–343. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00134.x.
- Montero J. A., Gañán Y., Macías D., Rodríguez-León J., Sanz-Ezquerro J. J., Merino R., et al. (2001). Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development.* 128, 2075–2084. doi:10.1242/dev.128.11.2075.
- Montero J. A., and Hurlé J. M. (2010). Sculpting digit shape by cell death. *Apoptosis.* 15, 365–375. doi:10.1007/s10495-009-0444-5.
- Montero J. A., Lorda-Díez C. I., and Hurlé J. M. (2020). Confluence of Cellular Degradation Pathways During Interdigital Tissue Remodeling in Embryonic Tetrapods. 8, 1–13. doi:10.3389/fcell.2020.593761.
- Montero J. A., Sánchez-Fernández C., Lorda-Díez C. I., García-Porrero J. A., and Hurlé J. M. (2016). DNA damage precedes apoptosis during the regression of the interdigital tissue in vertebrate embryos. *Sci Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep35478.
- Mooi W. J., and Peeper D. S. (2006). Oncogene-Induced Cell Senescence — Halting on the Road to Cancer. *New England Journal of Medicine.* 355, 1037–1046. doi:10.1056/nejmra062285.
- Moon A. M., Capecchi M. R., and Genet N. (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs NIH Public Access Author Manuscript. *Nat Genet.* 26, 455–459.

- Moyes C. D. (2007). *Principios de fisiología animal*. , eds. P. M. Schulte, M. González Moreno, B. Gal Iglesias, and E. Sanjosé Román Madrid: Pearson Addison Wesley.
- Muñoz-Espín D., Cañamero M., Maraver A., Gómez-López G., Contreras J., Murillo-Cuesta S., et al. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 155, 1104–1118. doi:10.1016/j.cell.2013.10.019.
- Muñoz-Espín D., and Serrano M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15, 482–496. doi:10.1038/nrm3823.
- Murray J. R., Varian-Ramos C. W., Welch Z. S., and Saha M. S. (2013). Embryological staging of the Zebra Finch, *Taeniopygia guttata*. *J Morphol*. 274, 1090–1110. doi:10.1002/jmor.20165.
- Musi N., Valentine J. M., Sickora K. R., Baeuerle E., Thompson C. S., Shen Q., et al. (2018). Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell*. 17. doi:10.1111/acer.12840.
- Nacher V., Carretero A., Navarro M., Armengol C., Llombart C., Rodríguez A., et al. (2006). The quail mesonephros: A new model for renal senescence? *J Vasc Res*. 43, 581–586. doi:10.1159/000096076.
- Nagashima M., Barthel L. K., and Raymond P. A. (2013). A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development*. 140, 4510–4521. doi:10.1242/dev.090738.
- Narita M., Núñez S., Heard E., Lin A., and Hearn S. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 113, 703–716.
- Navascués J., and Martín-Partido G. (1990). Glial cells in the optic chiasm arise from the suboptic necrotic centers of the diencephalon floor: Morphological evidence in the chick embryo. *Neurosci Lett*. 120, 62–65. doi:10.1016/0304-3940(90)90168-9.
- Navascués J., Moujahid A., Almendros A., Marin-Teva J. L., and Cuadros M. A. (1995). Origin of microglia in the quail retina: Central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *Journal of Comparative Neurology*. 354, 209–228. doi:10.1002/cne.903540205.
- Nedelec S., Dubacq C., and Trembleau A. (2005a). Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol*. 34, 49–64. doi:10.1007/s11068-005-5047-7.
- Nedelec S., Dubacq C., and Trembleau A. (2005b). Morphological and molecular features of the mammalian olfactory sensory neuron axons: What makes these axons so special? *J Neurocytol*. 34, 49–64. doi:10.1007/s11068-005-5047-7.
- Nelson G., Wordsworth J., Wang C., Jurk D., Lawless C., Martin-Ruiz C., et al. (2012). A senescent cell bystander effect: Senescence-induced senescence. *Aging Cell*. 11, 345–349. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x.
- Nguyen-ba-charvet K. T., and Rebsam A. (2020). Neurogenesis and specification of retinal ganglion cells. *Int J Mol Sci*. 21. doi:10.3390/ijms21020451.
- Nishitani K., and Sasaki K. (2006). Macrophage localization in the developing lens primordium of the mouse embryo - An immunohistochemical study. *Exp Eye Res*. 83, 223–228. doi:10.1016/j.exer.2005.12.008.
- Ohtani N., Yamakoshi K., Takahashi A., and Hara E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: Molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *Journal of Medical Investigation*. 51, 146–153. doi:10.2152/jmi.51.146.
- O’Koren E. G., Yu C., Klingeborn M., Wong A. Y. W., Prigge C. L., Mathew R., et al. (2019). Microglial Function Is Distinct in Different Anatomical Locations during Retinal Homeostasis and Degeneration. *Immunity*. 50, 723–737. doi:10.1016/j.immuni.2019.02.007.
- Ori A., Toyama B. H., Harris M. S., Bock T., Iskar M., Bork P., et al. (2015). Integrated Transcriptome and Proteome Analyses Reveal Organ-Specific Proteome Deterioration in Old Rats. *Cell Syst*. 1, 224–237. doi:10.1016/j.cels.2015.08.012.

- O'Rourke M. P., and Tam P. P. L. (2002). Twist functions in mouse development. *Int J Dev Biol.* 46, 401–13.
- Oubaha M., Miloudi K., Dejda A., Guber V., Mawambo G., Germain M. A., et al. (2016). Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Sci Transl Med.* 8. doi:10.1126/scitranslmed.aaf9440.
- Paradis V., Youssef N., Dargère D., Bâ N., Bonvoust F., Deschatrette J., et al. (2001). Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C and hepatocellular carcinomas. 32, 327–332.
- Parry A. J., and Narita M. (2016). Old cells, new tricks: chromatin structure in senescence. *Mammalian Genome.* 27, 320–331.
- Passos J. F., Saretzki G., Ahmed S., Nelson G., Richter T., Peters H., et al. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* 5, 1138–1151. doi:10.1371/journal.pbio.0050110.
- Pavón-Muñoz T., Bejarano-Escobar R., Blasco M., Martín-Partido G., and Francisco-Morcillo J. (2016). Retinal development in the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J Fish Biol.* 88, 492–507. doi:10.1111/jfb.12802.
- Penalzoza C., Lin L., Lockshin R. A., and Zakeri Z. (2006). Cell death in development: Shaping the embryo. *Histochem Cell Biol.* 126, 149–158. doi:10.1007/s00418-006-0214-1.
- Péquignot M. O., Provost A. C., Sallé S., Taupin P., Sainton K. M., Marchant D., et al. (2003). Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Developmental Dynamics.* 228, 231–238. doi:10.1002/dvdy.10376.
- Pérez-Garijo A., and Steller H. (2014). The benefits of aging: Cellular senescence in normal development. *EMBO Journal.* 33, 99–100. doi:10.1002/embj.201387401.
- Petersen T., and Niklason L. (2007). Cellular lifespan and regenerative medicine. *Biomaterials.* 28, 3751–3756. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.012.
- Piechota M., Sunderland P., Wysocka A., Nalberczak M., Sliwinska M. A., Radwanska K., et al. (2016). Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget.* 7, 81099–81109. doi:10.18632/oncotarget.12752.
- Pinto J. M., Wroblewski K. E., Kern D. W., Schumm L. P., and McClintock M. K. (2014). Olfactory dysfunction predicts 5-year mortality in older adults. *PLoS One.* 9, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0107541.
- Pixley S. K. (1992). CNS glial cells support in vitro survival, division, and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells. *Neuron.* 8, 1191–1204. doi:10.1016/0896-6273(92)90139-5.
- Plendl J., and Schmahl W. (1988). Dolichos biflorus agglutinin: A marker of the developing olfactory system in the NMRI-mouse strain. *Anat Embryol (Berl).* 177, 459–464. doi:10.1007/BF00304744.
- Prada C., Puga J., Pérez-Méndez L., López R., and Ramírez G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *European Journal of Neuroscience.* 3, 559–569. doi:10.1111/j.1460-9568.1991.tb00843.x.
- Prinz M., Jung S., and Priller J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell.* 179, 292–311. doi:10.1016/j.cell.2019.08.053.
- Qian B.-Z., and Pollard J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell.* 141, 39–51. doi:10.1016/j.cell.2010.03.014.
- Rae F., Woods K., Sasmono T., Campanale N., Taylor D., Ovchinnikov D. A., et al. (2007). Characterisation and trophic functions of murine embryonic macrophages based upon the use of a Csf1r-EGFP transgene reporter. *Dev Biol.* 308, 232–246. doi:10.1016/j.ydbio.2007.05.027.
- Raffaele M., Kovacovicova K., Bonomini F., Rezzani R., Frohlich J., and Vinciguerra M. (2020). Senescence-like phenotype in post-mitotic cells of mice entering middle age. *Aging.* 12, 13979–13990. doi:10.18632/aging.103637.

- Rai T. S., and Adams P. D. (2012). Lessons from senescence: Chromatin maintenance in non-proliferating cells. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 1819, 322–331. doi:10.1016/j.bbagr.2011.07.014.
- Rakoczy P. E., Lai C. M., Baines M., Di Grandi S., Fitton J. H., and Constable I. J. (1997). Modulation of cathepsin D activity in retinal pigment epithelial cells. *Biochemical Journal.* 324, 935–940. doi:10.1042/bj3240935.
- Rakoczy P. E., Sarks S. H., Daw N., and Constable I. J. (1999). Distribution of cathepsin D in human eyes with or without age-related maculopathy. *Exp Eye Res.* 69, 367–374. doi:10.1006/exer.1999.0700.
- Rapaport D. H., Wong L. L., Wood E. D., Yasumura D., and LaVail M. M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol.* 474, 304–324. doi:10.1002/cne.20134.
- Reese B. E., Johnson P. T., and Baker G. E. (1996). Maturation gradients in the retina of the ferret. *J Comp Neurol.* 375, 252–273. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961111)375:2<252::AID-CNE6>3.0.CO;2-1.
- Reichenbach A., and Bringmann A. (2013). New functions of müller cells. *Glia.* 61, 651–678. doi:10.1002/glia.22477.
- Rhinn M., Ritschka B., and Keyes W. M. (2019). Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development (Cambridge).* 146. doi:10.1242/dev.151837.
- Richard M. B., Taylor S. R., and Greer C. A. (2010). Age-induced disruption of selective olfactory bulb synaptic circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 15613–15618. doi:10.1073/pnas.1007931107.
- Robinson A. M., Conley D. S., Shinnars M. J., and Kern R. C. (2002). Apoptosis in the aging olfactory epithelium. *Laryngoscope.* 112, 1431–1435. doi:10.1097/00005537-200208000-00019.
- Rodier F., and Campisi J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology.* 192, 547–556. doi:10.1083/jcb.201009094.
- Rodier F., Campisi J., and Bhaumik D. (2007). Two faces of p53: Aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.* 35, 7475–7484. doi:10.1093/nar/gkm744.
- Rodier F., Coppé J., Patil C. K., Wieteke A. M., Muñoz D. P., Raza S. R., et al. (2009). Associated Inflammatory Cytokine Secretion. 11, 973–979. doi:10.1038/ncb1909.Persistent.
- Rodríguez-Gallardo L., Lineros-Domínguez M. D. C., Francisco-Morcillo J., and Martín-Partido G. (2005a). Macrophages during retina and optic nerve development in the mouse embryo: Relationship to cell death and optic fibres. *Anat Embryol (Berl).* 210, 303–316. doi:10.1007/s00429-005-0051-3.
- Rodríguez-Gallardo L., Lineros-Domínguez M. D. C., Francisco-Morcillo J., and Martín-Partido G. (2005b). Macrophages during retina and optic nerve development in the mouse embryo: Relationship to cell death and optic fibres. *Anat Embryol (Berl).* 210, 303–316. doi:10.1007/s00429-005-0051-3.
- Rodríguez-León J., Tomas A. R., Johnson A., and Kawakami Y. (2013). “Recent advances in the study of limb development: The emergence and function of the apical ectodermal ridge,” in *Embryo Development: Stages, Mechanisms and Clinical Outcomes.*
- Rose J., Söder S., Skhirtladze C., Schmitz N., Gebhard P. M., Sesselmann S., et al. (2012). DNA damage, discoordinated gene expression and cellular senescence in osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 20, 1020–1028. doi:10.1016/j.joca.2012.05.009.
- Saiz-López P., Chinnaiya K., Towers M., and Ros M. A. (2017). Intrinsic properties of limb bud cells can be differentially reset. *Development.* 144, 479–486. doi:10.1242/dev.137661.
- Sánchez-Fernández C., Lorda-Diez C. I., Duarte-Olivenza C., Hurlé J. M., and Montero J. A. (2021). Histone Epigenetic Signatures in Embryonic Limb Interdigital Cells Fated to Die. *Cells.* 10. doi:10.3390/cells10040911.

- Sánchez-Fernández C., Lorda-Diez C. I., García-Porrero J. A., Montero J. A., and Hurlé J. M. (2019). UHRF genes regulate programmed interdigital tissue regression and chondrogenesis in the embryonic limb. *Cell Death Dis.* 10. doi:10.1038/s41419-019-1575-4.
- Sánchez-Fernández C., Lorda-Diez C. I., Hurlé J. M., and Montero J. A. (2020). The methylation status of the embryonic limb skeletal progenitors determines their cell fate in chicken. *Commun Biol.* 3, 1–12. doi:10.1038/s42003-020-1012-3.
- Sanders Y. Y., Liu H., Zhang X., Hecker L., Bernard K., Desai L., et al. (2013). Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol.* 1, 8–16. doi:10.1016/j.redox.2012.11.004.
- Santos A. M., Calvente R., Tassi M., Carrasco M.-C., Martín-Oliva D., Marín-Teva J. L., et al. (2008). Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 506, 224–239. doi:10.1002/cne.21538.
- Sapieha P., and Mallette F. A. (2018). Cellular Senescence in Postmitotic Cells: Beyond Growth Arrest. *Trends Cell Biol.* 28, 595–607. doi:10.1016/j.tcb.2018.03.003.
- Schafer M. J., Miller J. D., and LeBrasseur N. K. (2017a). Cellular senescence: Implications for metabolic disease. *Mol Cell Endocrinol.* 455, 93–102. doi:10.1016/j.mce.2016.08.047.
- Schafer M. J., White T. A., Iijima K., Haak A. J., Ligresti G., Atkinson E. J., et al. (2017b). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun.* 8. doi:10.1038/ncomms14532.
- Schwob J., Jang, Holbrook, Lin, Herrick, Peterson, et al. (2017). Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: taking poietic license. *J Comp Neurol.* 525, 1034–1054.
- Serrano M., Lin A., McCurrach M., Beach D., and Lowe S. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88, 593–602.
- Severino J., Allen R. G., Balin S., Balin A., and Cristofalo V. J. (2000). Is β -galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res.* 257, 162–171. doi:10.1006/excr.2000.4875.
- Shay J. W., and Roninson I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* 23, 2919–2933. doi:10.1038/sj.onc.1207518.
- Shay J. W., and Wright W. E. (2005). Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis.* 26, 867–874. doi:10.1093/carcin/bgh296.
- Sherr C. J., and McCormick F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2, 103–112. doi:10.1016/S1535-6108(02)00102-2.
- Shimizu H., Yokoyama S., and Asahara H. (2007). Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. *Dev Growth Differ.* 49, 449–454. doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00945.x.
- Snow R. L., and Robson J. A. (1994). Ganglion cell neurogenesis, migration and early differentiation in the chick retina. *Neuroscience.* 58, 399–409. doi:10.1016/0306-4522(94)90046-9.
- Snow R. L., and Robson J. A. (1995). Migration and Differentiation of Neurons in the Retina and Optic Tectum of the Chick. *Exp Neurol.* 134, 13–24. doi:10.1006/exnr.1995.1032.
- Sokpor G., Abbas E., Rosenbusch J., Staiger J. F., and Tuoc T. (2018). Transcriptional and Epigenetic Control of Mammalian Olfactory Epithelium Development. *Mol Neurobiol.* 55, 8306–8327. doi:10.1007/s12035-018-0987-y.
- Soto-Gómez A., and Demaria M. (2017). Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today.* 22, 786–795. doi:10.1016/j.drudis.2017.01.004.
- Storer M., and Keyes W. M. (2014). Developing senescence to remodel the embryo. *Commun Integr Biol.* 7, 1–4. doi:10.4161/cib.29098.
- Storer M., Mas A., Robert-Moreno A., Pecoraro M., Ortells M. C., Di Giacomo V., et al. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell.* 155, 1119–1130. doi:10.1016/j.cell.2013.10.041.

- Studencka M., and Schaber J. (2017). Oncotarget 30656 www.impactjournals.com/oncotarget Senoptosis: non-lethal DNA cleavage as a route to deep senescence. *Oncotarget*. 8, 30656–30671.
- Suárez R., García-González D., and de Castro F. (2012). Mutual influences between the main olfactory and vomeronasal systems in development and evolution. *Front Neuroanat*. 6, 1–14. doi:10.3389/fnana.2012.00050.
- Sun X., Mariani F., and Martin G. (2002). Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*. 418, 501–508.
- Suram A., Kaplunov J., Patel P. L., Ruan H., Cerutti A., Boccardi V., et al. (2012). Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *EMBO Journal*. 31, 2839–2851. doi:10.1038/emboj.2012.132.
- Suzuki Y., Takeda M., and Farbman A. I. (1996). Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *Journal of Comparative Neurology*. 376, 509–517. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<509::AID-CNE1>3.0.CO;2-5.
- Taniguchi K., and Taniguchi K. (2008). Embryonic and postnatal differentiation of olfactory epithelium and vomeronasal organ in the Syrian hamster. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70, 57–64. doi:10.1292/jvms.70.57.
- Tominaga T., Shimada R., Okada Y., Kawamata T., and Kibayashi K. (2019). Senescence-associated- β -galactosidase staining following traumatic brain injury in the mouse cerebrum. *PLoS One*. 14, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0213673.
- Toussaint O., Medrano E., and von Zglinicki T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 35, 927–945.
- Ueha R., Shichino S., Ueha S., Kondo K., Kikuta S., Nishijima H., et al. (2018). Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa. *Front Aging Neurosci*. 10. doi:10.3389/fnagi.2018.00086.
- Valenciano A. I., Boya P., and De La Rosa E. J. (2009). Early neural cell death: Numbers and cues from the developing neuroretina. *International Journal of Developmental Biology*. 53, 1515–1528. doi:10.1387/ijdb.072446av.
- Van Deursen J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 509, 439–446. doi:10.1038/nature13193.
- Vasey D. B., Roland Wolf C., Brown K., and Whitelaw C. B. A. (2011). Spatial p21 expression profile in the mid-term mouse embryo. *Transgenic Res*. 20, 23–28. doi:10.1007/s11248-010-9385-6.
- Vecino E., García-Briñón J., Velasco A., Caminos E., and Lara J. (1993). Calbindin D-28K distribution in the retina of the developing trout (*Salmo fario* L.). *Neurosci Lett*. 152, 91–95. doi:10.1016/0304-3940(93)90491-3.
- Verhaagen J., Oestreicher A. B., Grillo M., Khew-Goodall Y.-S., Gispen W. H., and Margolis F. L. (1990). Neuroplasticity in the olfactory system: Differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B-50/GAP43 and the olfactory marker protein. *J Neurosci Res*. 26, 31–44. doi:10.1002/jnr.490260105.
- Verhaagen J., Oestreicher A., Gispen W., and Margolis F. (1989). The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *The Journal of Neuroscience*. 9, 683–691. doi:10.1523/JNEUROSCI.09-02-00683.1989.
- Vicencio J. M., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasmir E., et al. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path - A mini-review. *Gerontology*. 54, 92–99. doi:10.1159/000129697.
- Villiard É., Denis J.-F., Hashemi F. S., Igelmann S., Ferbeyre G., and Roy S. (2017). Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of amniotes. *Biol Open*. 6, 891–896. doi:10.1242/bio.025809.

- von Zglinicki T., Wan T., and Miwa S. (2020). Senescence in Post-Mitotic Cells: A Driver of Aging? *Antioxid Redox Signal.* 1, 1–44. doi:10.1089/ars.2020.8048.
- Voyron S., Giacobini P., Tarozzo G., Cappello P., Perroteau I., and Fasolo A. (1999). Apoptosis in the development of the mouse olfactory epithelium. *Developmental Brain Research.* 115, 49–55. doi:10.1016/S0165-3806(99)00055-3.
- Wagner K.-D., and Wagner N. (2022). The Senescence Markers p16INK4A, p14ARF/p19ARF, and p21 in Organ Development and Homeostasis. *Cells.* 11, 1966. doi:10.3390/cells11121966.
- Wang C., Jurk D., Maddick M., Nelson G., Martin-ruiz C., and Von Zglinicki T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell.* 8, 311–323. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x.
- Wanner E., Thoppil H., and Riabowol K. (2021). Senescence and Apoptosis: Architects of Mammalian Development. *Front Cell Dev Biol.* 8, 1–16. doi:10.3389/fcell.2020.620089.
- Wassélius J., Wallin H., Abrahamson M., and Ehinger B. (2003). Cathepsin B in the rat eye. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* 241, 934–942. doi:10.1007/s00417-003-0782-x.
- Weatherbee S. D., Behringer R. R., Rasweiler IV J. J., and Niswander L. A. (2006). Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15103–15107. doi:10.1073/pnas.0604934103.
- Weiler E., and Farbman A. I. (1997). Proliferation in the rat olfactory epithelium: Age-dependent changes. *Journal of Neuroscience.* 17, 3610–3622. doi:10.1523/jneurosci.17-10-03610.1997.
- Weiler E., and Farbman A. I. (1998). Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally. *Glia.* 22, 315–328. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199804)22:4<315::AID-GLIA1>3.0.CO;2-2.
- Wiemann S. U., SATYANARAYANA A., TSAHURIDU M., TILLMANN H. L., ZENDER L., KLEMPNAUER J., et al. (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *The FASEB Journal.* 16, 935–942. doi:10.1096/fj.01-0977com.
- Williams C. L., McIntyre J. C., Norris S. R., Jenkins P. M., Zhang L., Pei Q., et al. (2014). Direct evidence for BBSome-associated intraflagellar transport reveals distinct properties of native mammalian cilia. *Nat Commun.* 5, 1–13. doi:10.1038/ncomms6813.
- Wood W., Turmaine M., Weber R., Camp V., Maki R. A., McKercher S. R., et al. (2000). Mesenchymal cells engulf and clear apoptotic footplate cells in macrophageless PU.1 null mouse embryos. *Development.* 127, 5245–5252. doi:10.1242/dev.127.24.5245.
- Wu Y., Chen L., Scott P. G., and Tredget E. E. (2007). Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells.* 25, 2648–2659. doi:10.1634/stemcells.2007-0226.
- Xiang M. (2013). Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 70, 2519–2532. doi:10.1007/s00018-012-1183-2.
- Xiang M., and Li S. (2013). Foxn4: A multi-faceted transcriptional regulator of cell fates in vertebrate development. *Sci China Life Sci.* 56, 985–993. doi:10.1007/s11427-013-4543-8.
- Xu M., Pirtskhalava T., Farr J. N., Weigand B. M., Palmer A. K., Weivoda M. M., et al. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med.* 24, 1246–1256.
- Xu T., Sun L., Shen X., Chen Y., Yin Y., Zhang J., et al. (2019). NADPH oxidase 2-mediated NLRP1 inflammasome activation involves in neuronal senescence in hippocampal neurons in vitro. *Int Immunopharmacol.* 69, 60–70. doi:10.1016/j.intimp.2019.01.025.
- Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R. A., Hernando E., Cordon-cardo C., et al. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 445, 656–660. doi:10.1038/nature05529.Senescence.

- Yamakoshi K., Takahashi A., Hirota F., Nakayama R., Ishimaru N., Kubo Y., et al. (2009). Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *Journal of Cell Biology*. 186, 393–407. doi:10.1083/jcb.200904105.
- Yegorov Y. E., Akimov S. S., Hass R., Zelenin A. v., and Prudovsky I. A. (1998). Endogenous β -galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Exp Cell Res*. 243, 207–211. doi:10.1006/excr.1998.4169.
- Yosef R., Pilpel N., Papisov N., Gal H., Ovadya Y., Vadai E., et al. (2017). p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J*. 36, 2280–2295. doi:10.15252/embj.201695553.
- Young A. R. J., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J. F. J., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*. 23, 798–803. doi:10.1101/gad.519709.
- Young R. W. (1985). Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Developmental Brain Research*. 21, 229–239. doi:10.1016/0165-3806(85)90211-1.
- Zacarias-Fluck M. F., Moranco B., Vicario R., Luque García A., Escorihuela M., Villanueva J., et al. (2015). Effect of cellular senescence on the growth of HER2-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 107.
- Zakany J., and Duboule D. (2007). The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev*. 17, 359–366. doi:10.1016/j.gde.2007.05.011.
- Zeller R., López-Ríos J., and Zuniga A. (2009). Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet*. 10, 845–858. doi:10.1038/nrg2681.
- Zhang J., Pickering C. R., Holst C. R., Gauthier M. L., and Tlsty T. D. (2006). p16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 66, 10325–10331. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1594.
- Zhao Y., Tyshkovskiy A., Muñoz-Espín D., Tian X., Serrano M., De Magalhaes J. P., et al. (2018). Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115, 1801–1806. doi:10.1073/pnas.1721160115.