



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

*Desarrollo de una sonda molecular basada en el
fluoróforo Azul de Nilo para la detección de células
senescentes en modelos in vivo*

TRABAJO FIN DE GRADO

AUTORA: Rosa Vivens Sanchis

TUTOR ACADÉMICO: Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

COTUTOR: Dr. Ramón Martínez Máñez

COTUTOR COLABORADOR: Dr. Juan Francisco Blandez Barradas

CURSO ACADÉMICO: 2020/2021

Valencia, Julio 2021



Desarrollo de una sonda molecular basada en el fluoróforo Azul de Nilo para la detección de células senescentes en modelos *in vivo*.

AUTORA: Rosa Vivens Sanchis

TUTOR ACADÉMICO: Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

COTUTOR: Dr. Ramón Martínez Máñez

COTUTOR COLABORADOR: Dr. Juan Francisco Blandez Barradas

CURSO ACADÉMICO: 2020/2021

Valencia, Julio 2021

RESUMEN

La senescencia celular es un proceso que sufren las células mitóticamente competentes mediante el cual se produce el arresto del ciclo celular, y que puede ser activado de forma natural o inducida como respuesta al estrés u otros estímulos. Este proceso provoca cambios morfológicos y fenotípicos que impiden la proliferación celular. Entre estos cambios, la sobreexpresión de la enzima lisosomal β -Galactosidasa es el marcador más empleado para la detección. En el presente trabajo nos basamos en este aspecto para el desarrollo de una sonda molecular que permita la detección de células senescentes *in vivo*.

Dicha sonda molecular está constituida por el fluoróforo Azul de Nilo aceptado por la Food and Drugs Administration, accesible en formato comercial y cuya emisión de fluorescencia se encuentra en el infrarrojo cercano, y por una molécula de galactosa que actúa como unidad de reconocimiento. El enlace entre fluoróforo y unidad de reconocimiento provoca una disminución de la señal de fluorescencia. En presencia de la enzima β -Galactosidasa, se produce la hidrólisis del enlace y el subsiguiente aumento de la fluorescencia. De esta forma, se obtiene un método de análisis cualitativo, rápido y poco invasivo que permite llevar a cabo la detección directa de células senescentes en modelos *in vivo*.

PALABRAS CLAVE

Detección de senescencia celular, Azul de Nilo, Fluoróforo de infrarrojo cercano, fluoróforo aprobado por la FDA, sobreexpresión de β -Galactosidasa.

Development of a molecular probe based in Nile Blue fluorophore for the detection of senescent cells *in vivo* models.

ABSTRACT

Cellular senescence is a process that occurs in mitotically competent cells that promote the arrest of the cell cycle and can be activated by natural way or induced as response to stress or other stimuli. This process generates morphological and phenotypic changes that stops cell proliferation. Among these changes, the most used detection marker is the overexpression of lysosomal β -galactosidase enzyme. In this work, we are based on this aspect for the development of a molecular probe in order to detect senescent cells *in vivo*.

This molecular probe is based in Nile Blue fluorophore, accepted by the Food and Drugs Administration, accessible in commercial source and whose fluorescence emission is in the near infrared, and a galactose molecule that acts as recognition unit. The bond between fluorophore and recognition unit provokes the deactivation of fluorescence signal. In the presence of β -Galactosidase enzyme, bond was hydrolyzed and the activation of fluorescence takes place. In this way, is obtained a qualitative, fast, and minimally invasive analysis method that allows the direct detection of senescent cells *in vivo* models.

KEY WORDS

Cellular senescence detection, Nile Blue, NIR fluorophore, FDA approved fluorophore, β -Galactosidase overexpression.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero darte las gracias a ti, JuanFran, por haber sido mi guía durante esta etapa tan intensa de mi vida y por confiar en mí incluso cuando yo no lo hacía. Me gustaría decirte que has sido un gran profesor y referente, y que sin tu ayuda no estaría hoy escribiendo esto. Gracias por sacar tiempo para mí a pesar de tener mucho trabajo y por tus palabras de ánimo cuando algo no salía bien, pero, sobre todo, gracias por tu dedicación e infinita paciencia.

En segundo lugar, quiero agradecer a Ramón el haberme dado la oportunidad de entrar en el grupo y formar parte de un proyecto tan interesante como este. Y, por supuesto, también a Joserra, por aceptar ser mi tutor y acompañarme durante todo el proceso.

No me olvido de mi pequeña familia del 2.6, Marcia, Guillermo, Giovanni y Silvia, gracias por acogerme y por estar siempre dispuestos a echar una mano, con vosotros las horas en el laboratorio se hacían mucho más cortas.

Gracias también a mi familia por estar siempre a mi lado, por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, y por enseñarme el valor del esfuerzo y la constancia en aquello que se hace. En especial a mi madre, por aguantar todos mis días de bajón y por tener siempre una sonrisa y un abrazo para mí. Gracias, mamá, sin ti no habría conseguido llegar hasta aquí.

Por último, gracias a mis chicas de biotec por estos 4 maravillosos años. Gracias por vuestra amistad y apoyo, por levantarnos unas a otras y por estar siempre dispuestas a ayudar. Os habéis convertido en mi día a día, y aunque ahora nuestros caminos se separen, siempre tendréis un hogar esté donde esté, porque aún nos queda mucho por vivir juntas. Desde luego, lo mejor que me llevo de esto sois vosotras.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Senescencia Celular	1
1.1.1. Tipos de senescencia según el origen	3
1.1.2. Marcadores de senescencia.....	5
1.1.3. Sobreexpresión β -Galactosidasa lisosomal	7
1.1.4. Terapias mediante senescencia.....	9
1.2. Sonda molecular	10
1.2.1. Fluoróforo Azul de Nilo	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
3.1. Material.....	14
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Síntesis de NBGal	15
3.2.2. Hidrólisis enzimática.....	15
3.2.2.1. Curva Cinética.....	16
3.2.2.2 Curva de Concentración.....	17
3.2.3. Medida de interferentes.....	17
3.2.4. Ensayos <i>in vitro</i>	18
3.2.5. <i>In vivo</i>	19
3.2.6. <i>Ex vivo</i>	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
4.1. Síntesis y Caracterización de NBGal	20
4.2. Ensayo <i>in vitro</i> de NBGal	27
4.3. Ensayo <i>in vivo</i> de NBGal	29
4.4. Ensayo <i>ex vivo</i> de NBGal.....	32

5. CONCLUSIONES	35
6. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vinculación de estímulos inductores de senescencia en células con distintas rutas moleculares.....	2
Figura 2. Enfermedades relacionadas con la senescencia celular conocidas en la actualidad.....	3
Figura 3. Principales características presentes en las células senescentes.....	6
Figura 4. Reacción de hidrólisis de X-Gal mediante la enzima β -Galactosidasa.....	8
Figura 5. Reacción de hidrólisis de SPIDER- β Gal mediante la enzima β -Galactosidasa.....	8
Figura 6. Ejemplo de terapia combinada para el tratamiento de un tumor.....	10
Figura 7. Estructura molecular del fluoróforo Azul de Nilo (NB).....	12
Figura 8. Curva cinética de la reacción de hidrólisis de NBGal.....	16
Figura 9. Curva de concentración de la reacción de hidrólisis de NBGal.....	17
Figura 10. Gráfico de la medida con interferentes sobre la sonda NBGal.....	18
Figura 11. Síntesis de la sonda molecular NBGal.....	20
Figura 12. Caracterización de la sonda NBGal con medidas de RMN ^1H y ^{13}C , y HRMS.....	21-22
Figura 13. Medida de la absorbancia en un equipo de medición UV del fluoróforo NB libre y la sonda molecular NBGal.....	23
Figura 14. Medida de la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro del fluoróforo NB libre y la sonda molecular NBGal.....	23

Figura 15. Ecuación del cálculo del rendimiento cuántico (Φ_x) utilizada.....	24
Figura 16. Gráfico de la medida de distintos pH sobre la intensidad de fluorescencia emitida tras la reacción de hidrólisis de la sonda NBGal.....	25
Figura 17. Gráfico de la medida de la emisión de fluorescencia a distintas concentraciones del fluoróforo NB libre y la sonda molecular NBGal.....	25
Figura 18. Tabla comparativa de las sondas existentes para la detección de senescencia celular.....	27
Figura 19. Ensayo de toxicidad en células 4T1 tras la exposición prolongada de NBGal a diversas concentraciones.....	28
Figura 20. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células 4T1 control y senescentes incubadas con diluciones de NBGal y NB libre.....	28
Figura 21. Esquema del procedimiento realizado en los ensayos <i>in vivo</i> en modelos de ratones hembra BALB/cByJ.....	30
Figura 22. Imágenes de IVIS de ratones hembra BALB/cByJ con incubación con NBGal.....	31
Figura 23. Ensayo de cuantificación de los resultados obtenidos en las imágenes IVIS de intensidad de fluorescencia de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con NBGal.....	31
Figura 24. Imágenes de IVIS de los tumores y órganos extraídos de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con NBGal.....	32-33
Figura 25. Ensayo de cuantificación de intensidad de fluorescencia en los tumores extraídos de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con NBGal.....	33-34
Figura 26. Comparativa de la cantidad de fluorescencia emitida de los tumores y órganos extraídos (pulmones, hígado, tumor, riñón, bazo y vejiga) de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con NBGal.....	34

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
Br-Gal	Acetobromo- α -D-galactosa
CDKs	Quinasas dependientes de ciclinas
CIPF	Centro de Investigación Príncipe Felipe
4T1	Células cancerosas de mama de ratón. Línea celular utilizada
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ER	Receptor de estrógeno
FBS	Suero bovino fetal
FDA	Food and Drug Administration
FELASA	Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio
Hex	Hexano
HRMS	Espectroscopia de masas
IVIS	Spectrum <i>in vivo</i> imaging system
MIDAS	Senescencia asociada a disfunción mitocondrial
NB	Fluoróforo Azul de Nilo (Nile Blue)

NBGal	Sonda molecular fluorogénica diseñada en el presente proyecto
NIR	Región del Infrarrojo cercano
OIS	Senescencia inducida por oncogén
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PET	Tomografía por emisión de positrones
Rb	Proteína del retinoblastoma
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA-β-Gal	Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia
SASP	Fenotipo secretor asociado a senescencia
SPECT	Tomografía por emisión de fotón único
SPIDER-βGal	6'-(Dietilamino)-4'-(fluorometil)spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanten]-3'-il β-D-galactopiranosido
TIS	Senescencia inducida terapéuticamente
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Senescencia Celular

El mecanismo de senescencia celular fue descrito por Hayflick y Moorhead en 1961 tras observar que los fibroblastos diploides humanos sufrían una disminución de su potencial de proliferación tras varias replicaciones, y en última instancia, un estado irreversible de incapacidad para la división celular debido al acortamiento de los telómeros (Hayflick & Moorhead, 1961). Este proceso se conoce como senescencia replicativa y está íntimamente ligado a la acumulación de estas células senescentes en enfermedades relacionadas con la edad (Gorgoulis et al., 2019).

Además de la senescencia replicativa, debida al acortamiento de los telómeros, el proceso de senescencia celular puede ser activado mediante otras vías como son el estrés oxidativo, la exposición a la radiación, medios hormonales, infecciones crónicas o el empleo de ciertos medicamentos (quimioterapia o ciertos inhibidores de la proteasa del VIH), esto se denomina como senescencia inducida (Kirkland & Tchkonja, 2015; Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

El proceso de senescencia celular se considera irreversible, ya que no se ha encontrado ningún estímulo fisiológico capaz de promover a las células senescentes para reanudar el ciclo celular. Esta detención se considera rigurosa, debido a que se establece y se mantiene mediante al menos 2 vías supresoras de tumores conocidas (*Figura 1*) (Regulski, 2017):

- La interacción entre las proteínas p53 / p21 (supresor tumoral / inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK)).
- La interacción entre las proteínas p16^{Ink4a} / retinoblastoma (pRb), que como consecuencia de su hipofosforilación se une e inhibe al factor de transcripción E2F (responsable de la expresión de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular), produciendo el arresto del ciclo celular e inhibiendo la proliferación de las células.

Estas vías de señalización pueden ser activadas por varios desencadenantes.

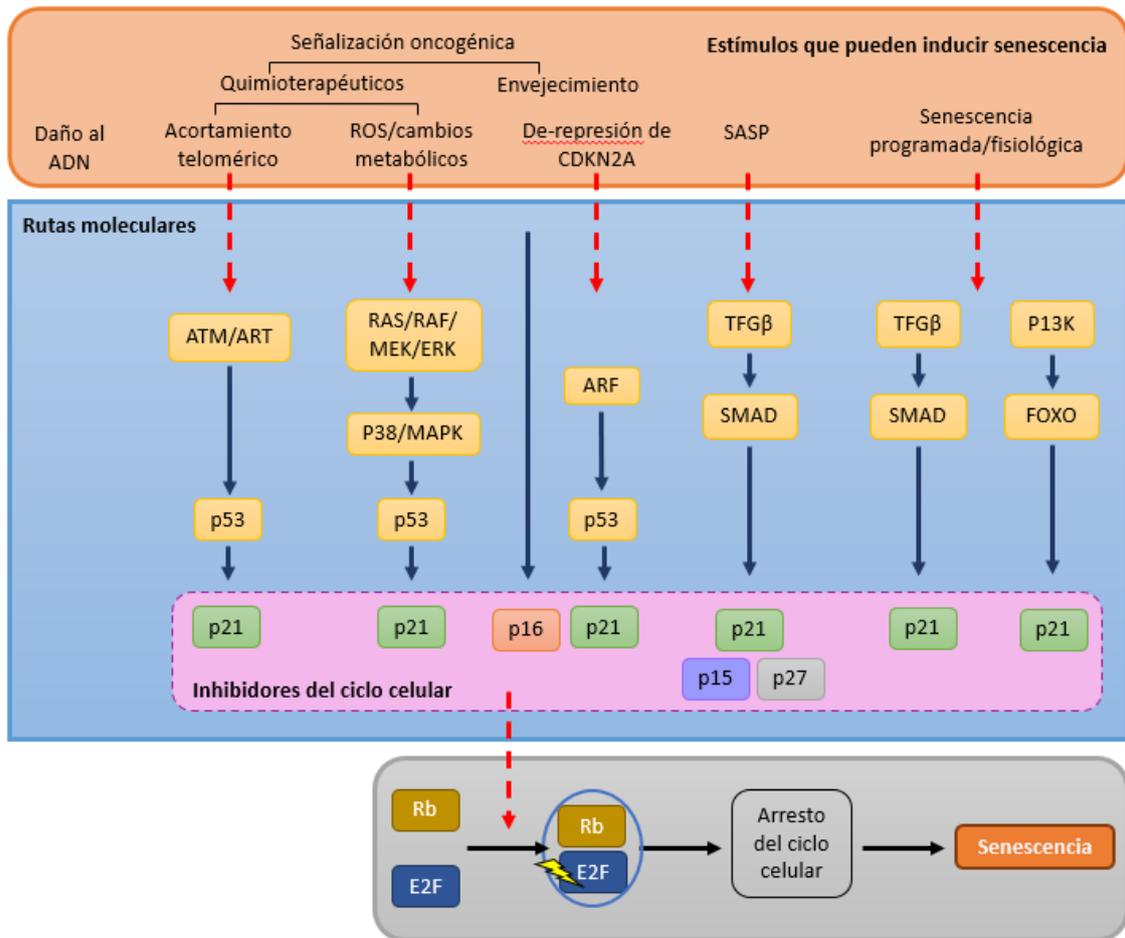


Figura 1. Vinculación de estímulos inductores de senescencia en células con las distintas rutas moleculares conocidas con capacidad para llevar a cabo el arresto del ciclo celular mediante la interacción con distintas proteínas y factores de transcripción. Adaptado de Lozano-Torres et al. (2019).

La capacidad de detención del ciclo celular que presenta la senescencia celular juega un doble papel. Por un lado, la acumulación crónica de este tipo de células en tejidos, ya que las células senescentes presentan resistencia a la apoptosis, se encuentra relacionada con múltiples enfermedades como son la obesidad abdominal, diabetes, Alzheimer, o aquellas vinculadas a la edad (*Figura 2*). En el caso opuesto, podemos encontrar este tipo de células en tejidos provenientes del desarrollo embrionario, o tras procesos de cirugía y remodelamiento celular (Myriantopoulos et al., 2019).

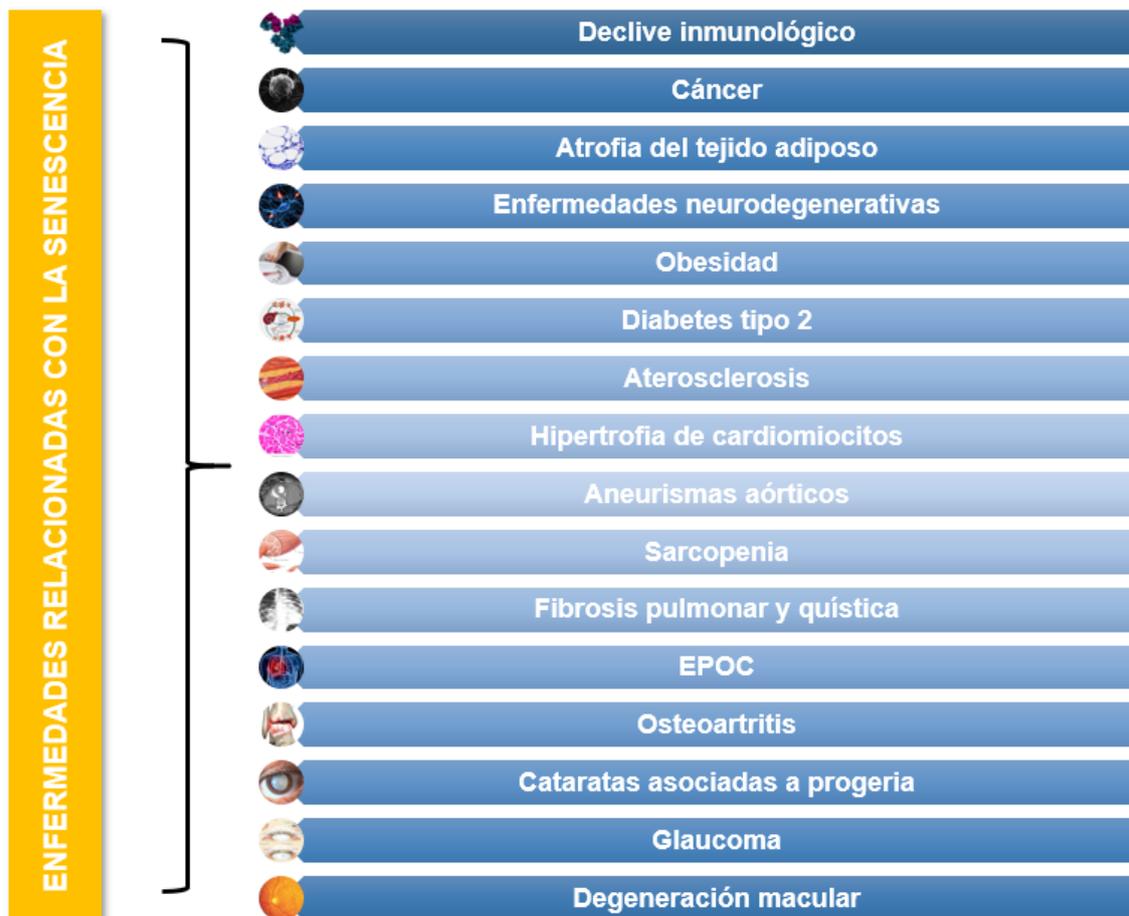


Figura 2. Enfermedades relacionadas con la senescencia celular conocidas en la actualidad. Adaptado de Myriantopoulos et al. (2019).

La activación de procesos senescentes en células es utilizada en diversas terapias médicas, por ejemplo, se considera una fuerte protección contra la tumorigénesis (Sharpless & Sherr, 2015). También es conveniente mencionar que las funciones deletéreas de las células senescentes se han convertido recientemente en objetivo para los enfoques antienvjecimiento (Soto-Gamez & Demaria, 2017), pero no existe en la actualidad ningún programa de este tipo que no incurra en toxicidades.

1.1.1. Tipos de senescencia según el origen

Se pueden distinguir distintos tipos de senescencia que son utilizados en investigación, Hernandez-Segura et al. (2018) establecen la siguiente clasificación según los diferentes orígenes posibles:

- Senescencia replicativa: entendida como la bajada del potencial de proliferación celular tras múltiples divisiones en consecuencia del acortamiento telomérico, que deriva finalmente en un arresto irreversible del ciclo celular.
- Senescencia inducida por daño al ADN: algún daño en el ADN puede derivar en senescencia o apoptosis, dependiendo de la intensidad del daño. Para inducir estos daños se pueden utilizar diferentes agentes, como la radiación (ionizante o ultravioleta) o múltiples fármacos.
- Senescencia inducida por oncogén (OIS): es generada a partir de la activación de oncogenes como Ras o BRAF, o de la inactivación de supresores tumorales como PTEN.
- Senescencia inducida por estrés oxidativo: es posible inducir senescencia a través de productos oxidativos derivados del metabolismo celular y de agentes oxidantes (Ej. H₂O₂). El estrés oxidativo en las células producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) afecta a diversos procesos metabólicos y también puede producir cambios en el ADN.
- Senescencia inducida terapéuticamente (TIS): diversos fármacos y terapias pueden inducir senescencia, por ejemplo, mediante daños en el ADN (bleomicina o doxorubicina) o la inhibición de CDKs (abemaciclib o palbociclib).
- Senescencia asociada a disfunción mitocondrial (MiDAS): como consecuencia de inducir la pérdida de mitocondrias en células, también se produce senescencia. El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) también es característico de este modelo de senescencia.
- Senescencia inducida epigenéticamente: se sabe que se puede inducir senescencia con agentes inhibidores de ADN metilasas (ej. 5-aza-2'-deoxicitidina) o con histona deacetilasas (ej. butirato de sodio).
- Senescencia paracrina: se produce debido al SASP de una célula senescente vecina.

1.1.2. Marcadores de senescencia

Actualmente se sabe que la senescencia celular implica una serie de cambios morfológicos y fenotípicos (*Figura 3*), que a pesar de diferir en algunos aspectos en cultivos *in vitro* e *in vivo* y entre diferentes líneas celulares, se han considerado como marcadores moleculares para detectar el estado de senescencia en células. Así pues, el conocimiento de estas características morfológicas y fenotípicas de las células senescentes es fundamental para su detección y para el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades que tengan como base la senescencia.

Entre estos cambios se puede encontrar los siguientes junto a su característica principal de detección (Hernandez-Segura et al., 2018; Myrianthopoulos et al., 2019):

- Daño irreparable en el ADN: medida del nivel de p53 fosforilado.
- Arresto del ciclo celular: medida de la capacidad de formar colonias y cuantificación de la expresión de las CDKs p16 y p21.
- Aumento de los niveles intracelulares de ROS.
- Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP): citoquinas, quemoquinas y metaloproteinasas con inmunotinción y ELISA.
- Resistencia a la apoptosis: alta regulación de proteínas BCL (BCL-2, BCL-w y BCL-xL).
- Metabolismo alterado.
- Estrés del retículo endoplasmático.
- Tamaño celular: en cultivos *in vitro* se distingue perfectamente un cuerpo de mayor tamaño y con forma irregular en células senescentes.
- Composición de la membrana plasmática: vimentina oxidada, DEP1 y DPP4.
- Aumento del número y contenido lisosomal: sobreexpresión de β -Galactosidasa lisosomal y otras enzimas hidrolasas.
- Aumento del potencial mitocondrial.
- Aumento de gránulos de lipofuscina (restos sobreoxidados de proteínas, lípidos, metales...).
- Cambios generalizados en la organización de la cromatina y la expresión génica.

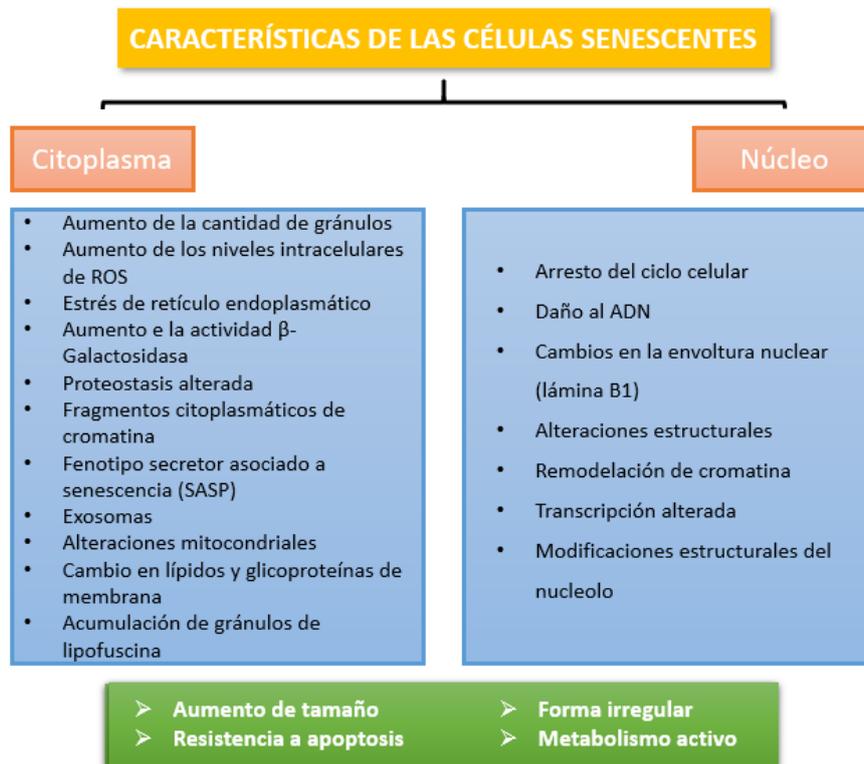


Figura 3. Principales características presentes en las células senescentes. Adaptado de Myrianthopoulos et al. (2019).

De los nombrados anteriormente, el SASP es el que presenta mayor relevancia ya que altera el estado de las células vecinas favoreciendo su cambio hacia células senescentes. Entre sus principales características se encuentran el aumento de la secreción de factores proinflamatorios y remodeladores tisulares, como lo son TGF- β , NF- κ B, IL-1a, IL-6, IL-8, entre otros (Coppé et al., 2010; Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Como consecuencia a estas respuestas, las células senescentes muestran cambios estructurales entre los cuales se puede encontrar, como se ha enumerado en el párrafo anterior, morfología engrandecida y aplanada, composición alterada de la membrana plasmática, acumulación de contenido lisosomal y potencial mitocondrial, y alteraciones en la estructura del núcleo celular.

En las primeras etapas de los procesos de senescencia, los factores proinflamatorios del SASP como las citoquinas, actúan sobre migración e invasión de las células inmunes efectoras interactuando con la liberación de factores de crecimiento y proteasas que aceleran los procesos de reparación y remodelación de tejidos. Tras este efecto beneficioso inicial, la continua liberación de SASP por células senescentes promueve un efecto negativo en el entorno celular adyacente al afectar a la homeostasis tisular (Xavier et al., 2020).

Por otro lado, la sobreexpresión de la enzima lisosomal β -Galactosidasa es el marcador de senescencia más empleado para la detección de senescencia, también denominado como **β -Galactosidasa asociada a senescencia**, (SA- β Gal).

1.1.3. Sobreexpresión β -Galactosidasa lisosomal

Como se ha explicado anteriormente, el estado de senescencia se caracteriza por la sobreexpresión de muchas proteínas lisosomales y un mayor contenido lisosómico (Cho & Hwang, 2012). El marcador SA- β Gal es una consecuencia de esto, y específicamente se trata de una de las múltiples transcripciones codificadas por el gen GLB1 (Lee et al., 2006).

La regulación transcripcional y postraduccional de esta enzima incluye la presencia de sitios de unión a Sp1 en su promotor, la regulación del corte y empalme alternativo y la escisión del péptido traducido, lo que da como resultado dos péptidos más pequeños que se asocian entre sí y conforman la enzima activa (Morreau et al., 1989). Sin embargo, los mecanismos que participan en esta sobreproducción son actualmente desconocidos. A pesar de esto, recientemente se ha demostrado que GLB1 está regulado negativamente por la vía NOTCH1 a nivel transcripcional (Hoare et al., 2016).

La sobreexpresión de SA- β Gal se puede detectar mediante kits comerciales como son el X-Gal y el SPiDER- β Gal. Sin embargo, estos kits tienen la gran limitación de que solo es posible su utilización *in vitro*. Por otro lado, en la bibliografía se encuentran gran número de kits desarrollados para solventar estos problemas. La mayoría se suelen basar en sondas moleculares constituidas por un fluoróforo, el cual actúa como unidad de señalización, unido de forma covalente a una molécula de galactosa, que actúa como unidad de reconocimiento. Este enlace covalente, N ó O glucosídico, conlleva la disminución de la fluorescencia del fluoróforo. En presencia de la sobreexpresión de la enzima, se produce la desconexión entre el fluoróforo y la galactosa y la subsiguiente activación de fluorescencia.

La tinción X-Gal (también conocida como tinción LacZ) es un método simple y rápido de realizar. Este ensayo se desarrolló utilizando el gen LacZ bacteriano (*Escherichia coli*), que codifica la enzima citoplasmática, y, posteriormente se extrapoló a su uso para la detección de β -Galactosidasa lisosomal. La β -Galactosidasa cataliza la hidrólisis de los β -galactósidos, en este caso de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-

galactopiranosido), un compuesto orgánico. La β -Galactosidasa rompe la molécula X-Gal en dos, en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol; posteriormente este segundo compuesto se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, producto insoluble de color azul (Burn, 2012) (*Figura 4*). De esta forma, la tinción con X-Gal proporciona conocimiento de una manera visual sobre la actividad de la enzima β -Galactosidasa, y, por tanto, de la presencia de células senescentes.

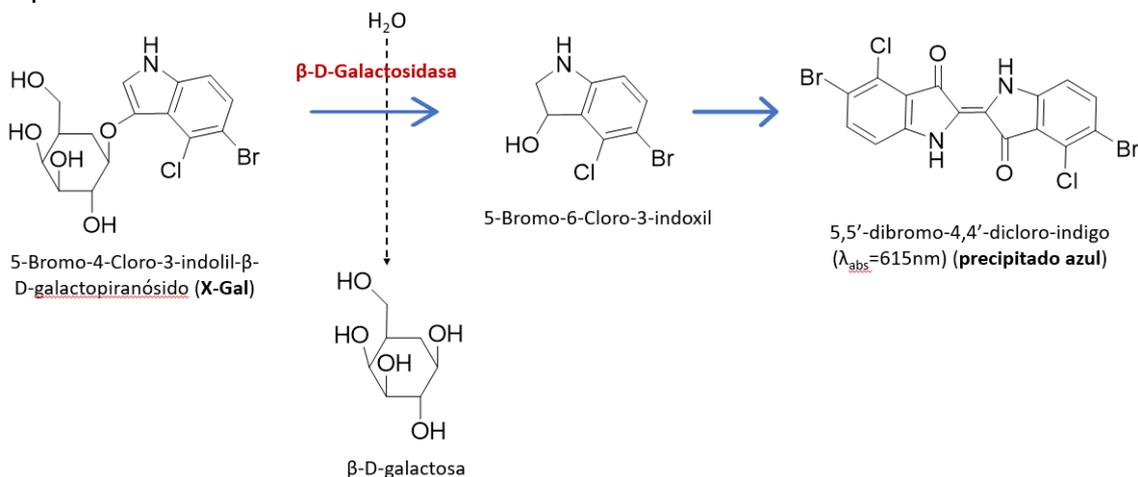


Figura 4. Reacción de hidrólisis de X-Gal mediante la enzima β -Galactosidasa, generando un producto insoluble de color azul intenso.

El ensayo SPiDER- β Gal consiste en una sonda fluorogénica funcionalizada con flúor (6'-(Dietilamino)-4'-(fluorometil)spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanten]-3'-il β -D-galactopiranosido), que es activada por la β -Galactosidasa (Nakamura et al., 2017) (*Figura 5*). La presencia de flúor permite que, una vez activada la sonda, esta quede retenida dentro de las células mediante el anclaje covalente a proteínas intracelulares, exhibiendo la señal de fluorescencia.

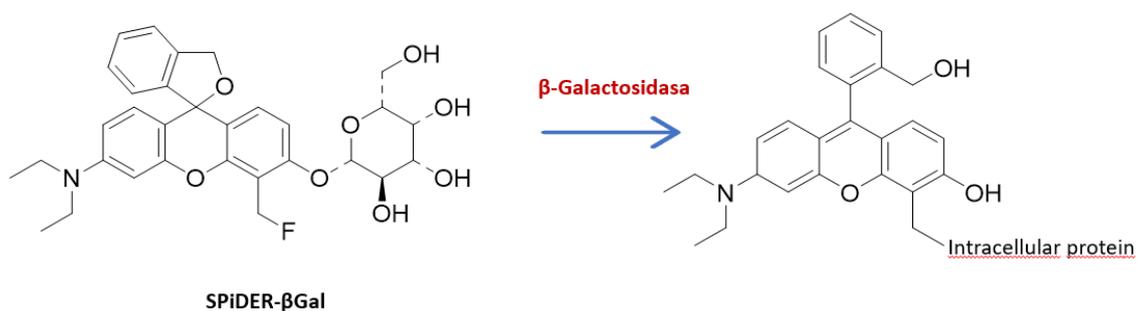


Figura 5. Reacción de hidrólisis de SPiDER- β Gal mediante la enzima β -Galactosidasa. El primer compuesto no emite ninguna señal fluorescente, mientras que la sonda una vez activada se une covalentemente a proteínas y emite una gran fluorescencia.

1.1.4. Terapias mediante senescencia

Debido a la acumulación de células senescentes en los tejidos, factor denominado también como senescencia crónica o replicativa, se desencadenan diversas patologías crónicas y envejecimiento tisular. Sin embargo, existen evidencias de que una senescencia aguda o inducida en un organismo adulto favorece un adecuado desarrollo de órganos además de homeostasis celular y tisular (Sieben et al., 2018). Es por esto por lo que la senescencia celular tiene un doble papel en el organismo, y por ello, se pueden encontrar terapias tanto pro-senescencia como anti-senescencia.

En cuanto a las terapias pro-senescencia tienen como finalidad inducir senescencia en células objetivo, limitando así su proliferación. Con este objetivo se han desarrollado diversos fármacos que tienen como actividad la interacción, inhibición y activación de factores y proteínas presentes en rutas moleculares relacionadas con el arresto del ciclo celular (Myriantopoulos et al., 2019). Algunas de estas actividades son producir daño en el ADN celular, la inhibición de la actividad telomerasa, la modulación de la actividad de CDK, la activación de p53... (Acosta & Gil, 2012).

Algunos fármacos como el abemaciclib, el palbociclib o el ribociclib (aprobados por la Food and Drug Administration, FDA) presentan una gran capacidad para inducir senescencia celular. Su uso ha demostrado grandes beneficios clínicos, un ejemplo de ello, es el tratamiento de cáncer de mama metastásico y receptor de estrógeno (ER) positivo en combinación con terapia endocrina (Kwapisz, 2017).

En cuanto a las terapias anti-senescencia encontramos 2 clasificaciones para los fármacos con este fin (Martel et al., 2020):

- Fármacos senocídicos o senolíticos, los cuales poseen la capacidad de eliminar específicamente células senescentes de un organismo. Como ejemplos de este tipo de fármacos se encuentran la quercetina, el A-1331852, el navitoclax, el venetoclax, el fisetin o el dasatinib, entre otros.

- Fármacos senomórficos: estos en concreto se basan en la modulación de la respuesta de senescencia, ya que trabajan modificando los niveles de los marcadores senescentes para evitar efectos como la señalización celular paracrina. Los más empleados son la apigenina, el 4,4'-dimetoxicalcona, la glucosamina o el kaempferol.

En el caso de utilizar una terapia pro-senescencia es necesario tener en cuenta que debe combinarse con un tratamiento anti-senescencia después, es decir, con fármacos senolíticos, para evitar la acumulación de células senescentes no deseadas, ya que dicha acumulación podría derivar en el desarrollo de diversas enfermedades relacionadas con este aspecto (*Figura 6*).

Este tipo de terapias combinadas es muy común utilizarlas en tratamientos contra el cáncer, por ejemplo. Primero, la inducción de senescencia detendría la proliferación desmesurada de las células tumorales, disminuyendo el daño y la expansión del tumor a otros tejidos y órganos del organismo huésped. En segundo lugar, el tratamiento con un fármaco anti-senescencia eliminaría las células senescentes inducidas, en este caso las tumorales, para evitar su acumulación y reduciendo en gran medida el tamaño, agresividad y metástasis del tumor (González-Gualda et al., 2020; Sieben et al., 2018).

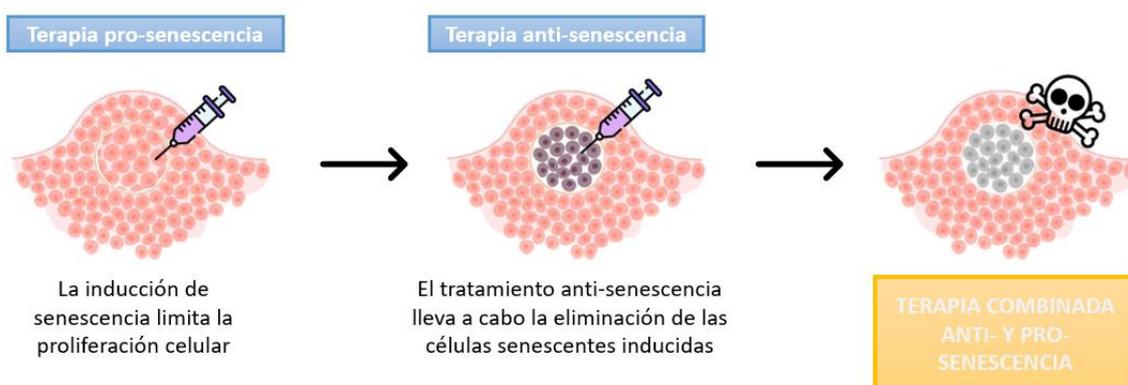


Figura 6. Ejemplo de terapia combinada para el tratamiento de un tumor: primero se lleva a cabo la inducción de senescencia en células tumorales (terapia pro-senescencia) y luego un tratamiento para eliminar las células tumorales senescentes inducidas (terapia anti-senescencia).

1.2. Sonda molecular

En los últimos tiempos se ha convertido en habitual la aplicación de sondas moleculares en biomedicina, sobre todo en la detección óptica de compuestos, biomarcadores e interacciones moleculares de interés (Zhang et al., 2012). Esto es debido a que las técnicas de "imagen molecular" permiten la obtención de imágenes, caracterización y cuantificación *in vivo* de procesos biológicos que tienen lugar a nivel celular y subcelular en humanos y otros seres vivos, y, además, con estos datos es posible mejorar el diagnóstico clínico, tratamiento y desarrollo de fármacos para multitud de patologías (Hargreaves, 2008).

Entre las metodologías que se utilizan para la obtención de imágenes moleculares *in vivo* es necesario destacar dos técnicas, la primera de ellas es la tomografía por emisión de positrones (PET) o por emisión de fotón único (SPECT), en ambos modelos la técnica se basa en la obtención de imágenes médicas nucleares de una sonda molecular radiomarcada. Por otro lado, tenemos la formación de imágenes moleculares ópticas obtenidas mediante el empleo de una sonda fluorescente que se miden con un instrumento de formación de imágenes fluorescentes (Saji, 2010).

Ambas técnicas son no destructivas, poco invasivas y permiten el estudio de biomoléculas específicas. Sin embargo, las técnicas basadas en la formación de imágenes ópticas emplean instrumentos fácilmente disponibles, económicos, comúnmente presentes en instalaciones científicas y tampoco necesitan de personal altamente cualificado (X. D. Liu et al., 2014).

Pese a ello, las técnicas de imagen óptica fluorescente presentan ciertas limitaciones debido a la absorción y la dispersión de la luz tras la interacción con los tejidos biológicos y a la auto-fluorescencia de las muestras, que reduce la precisión y la sensibilidad cuantitativas. Para solventar los problemas de auto-fluorescencia de las muestras biológicas es conveniente el uso de fluoróforos con una longitud de onda de emisión y excitación en la región del infrarrojo cercano (NIR) (700-900 nm) (Saji, 2010), a ello hay que añadir que el uso de radiaciones en el rango del NIR permite una mayor penetración en la muestra, logrando con ello evaluar información de estructuras menos superficiales.

El empleo de fluoróforos en el NIR supone igualmente una reducción de daño celular ya que es necesario la aplicación de una radiación de menor energía para obtener la señal de fluorescencia de la sonda (Achilefu, 2010).

1.2.1. Fluoróforo Azul de Nilo

El fluoróforo Azul de Nilo (NB) consiste en un sistema de fenoxazina oxidada cargada positivamente: un fenoxazinio. En su estructura se encuentra un sustituyente 9-dietilamino que funciona como donador de electrones a través del anillo, mientras que el grupo iminio presente en su estructura actúa como grupo aceptor de electrones (Jose & Burgess, 2006) (*Figura 7*).

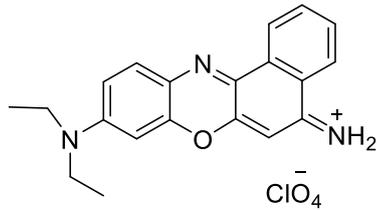


Figura 7. Estructura molecular del fluoróforo comercial Azul de Nilo (NB).

Los máximos de fluorescencia e intensidad del Azul de Nilo presentan un efecto solvatocrómico que ocasiona un desplazamiento hacia el rojo en los medios polares. Las características espectroscópicas del NB son dependientes del pH, esto se debe a que, en condiciones básicas, el grupo iminio se desprotona, mientras que en condiciones muy ácidas el 5-amino se protona.

El NB es un colorante orgánico aprobado por la FDA para uso humano, con una emisión en el infrarrojo cercano a 672 nm y disponible en formato comercial. Además, el Azul de Nilo es un fluoróforo aromático planar que se apaga a altas concentraciones o en espacios confinados, ya que forma agregados apilados π no emisivos (Lozano-Torres et al., 2020).

En el siguiente proyecto se ha diseñado y caracterizado una sonda molecular basada en el fluoróforo Azul de Nilo unido a una molécula de galactosa, que tras la interacción con la enzima β -Galactosidasa genera una emisión de imagen óptica fluorescente. Esta sonda permite la detección de forma directa de células senescentes *in vitro* e *in vivo*.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente proyecto es desarrollar una sonda molecular que permita la detección de senescencia de forma rápida, eficaz y poco invasiva que pueda utilizarse tanto *in vitro* como *in vivo*.

Debido a que la senescencia celular está relacionada con diversas patologías, su detección en las primeras fases de acumulación, así como el seguimiento de estas acumulaciones tisulares presenta gran importancia. Por esta razón, poder llevar a cabo la detección y el seguimiento de una forma más eficiente y sin molestias para los pacientes supondría una mejora en su calidad de vida.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos a desarrollar:

1. Síntesis de una sonda fluorogénica para la detección de la sobreexpresión de la enzima β -Galactosidasa mediante el uso de reactivos comerciales.
2. Caracterización y determinación de las propiedades fotoquímicas de la sonda molecular sintetizada para conocer sus condiciones óptimas de trabajo.
3. Validación *in vitro* de la capacidad de detección de la sobreexpresión enzimática de β -Galactosidasa lisosomal en células 4T1 senescentes inducidas con el fármaco palbociclib.
4. Validación *in vivo* de la sonda molecular sintetizada para la detección directa de la presencia de senescencia celular mediante imágenes de IVIS.
5. Validación *ex vivo* de la eficacia de detección de senescencia de la sonda en distintos órganos.
6. Evaluación de las ventajas de la sonda sintetizada en comparación con otras existentes para el mismo fin.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

Para la realización y obtención de resultados del presente proyecto se han utilizado diversos reactivos y dispositivos. Para la síntesis de la sonda molecular NBGal se utiliza el fluoróforo Azul de Nilo (NB), acetobromo- α -D-galactosa, K_2CO_3 y acetonitrilo anhidro (ACN).

Todos los reactivos químicos y los disolventes anhidros han sido adquiridos de Sigma-Aldrich y la solución salina tamponada con fosfato (PBS, 0.01 M) de Scharlab S.L. Ninguno de los materiales ha sufrido una purificación adicional.

Para los ensayos *in vitro* e *in vivo* se utilizó el fármaco Palbociclib, adquirido de Selleckchem. El medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) así como el suero bovino fetal (FBS) se adquirieron de Gibco. Las placas de 96 pocillos transparentes de fondo plano se obtuvieron de Promega.

Los datos de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) han sido recogidos con un espectrómetro TripleTOF T5600 (ABSciex, EE. UU.) y los espectros de RMN 1H y ^{13}C en un espectrómetro Bruker FT-NMR Avance 400 (Ettlingen, Alemania) a 300 K, usando TMS como patrón interno.

Por otro lado, para la recogida de los datos de espectrometría de fluorescencia se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia JASCO FP 8500. La intensidad de luminiscencia se midió en un lector de placas de múltiples etiquetas VICTOR (PerkinElmer). Las imágenes de fluorescencia confocal fueron tomadas con un Leica TCS SP8 AOBS y un microscopio confocal multifotón Olympus FV1000MPE. Para el análisis de las imágenes tomadas se utilizó el software ImageJ.

La línea celular de cáncer 4T1 (células de cáncer de mama) se adquirió a través de la American Type Culture Collection (ATCC), mientras que los ratones hembra BALB/cByJ se obtuvieron de los laboratorios Charles River, Francia.

3.2. Métodos

En el desarrollo del siguiente proyecto se han llevado a cabo diferentes métodos y reacciones para comprobar la hipótesis planteada.

3.2.1. Síntesis de NBGal

Para la síntesis de la sonda NBGal se lleva a cabo una sustitución nucleofílica de galactosa en el fluoróforo comercial Azul de Nilo (NB), para ello, se adicionan en un matraz de una boca de 50 mL, 208 mg de NB, 616 mg de Br-Gal y 414 mg de K_2CO_3 . Posteriormente se purga el sistema con argón, se adicionan 20 mL de ACN anhidro y se sube la temperatura a 70°C durante 4 horas. El crudo de reacción se lleva a sequedad mediante presión reducida.

Finalmente, el compuesto obtenido se purifica en columna SiO_2 empelando una mezcla de eluyentes (hex:AcOEt 10:1) para obtener NBGal como un sólido violeta oscuro con un rendimiento del 40%.

3.2.2. Hidrólisis enzimática

La reacción de hidrólisis de la sonda NB-Gal mediante la enzima β -Galactosidasa se estudia mediante espectroscopia de fluorescencia. Para ello, se añade la enzima β -Galactosidasa humana a soluciones de la sonda NBGal a una concentración de 10^{-6} M.

En este proyecto, el comportamiento de la sonda molecular en presencia de la enzima objetivo se ha estudiado de dos formas, una midiendo la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo y otra respecto a la cantidad de enzima añadida progresivamente. Ambos casos han demostrado que la enzima β -Galactosidasa promueve la ruptura del enlace N-glucosídico de la sonda NBGal.

3.2.2.1. Curva Cinética

El ensayo se llevó a cabo mediante medidas de fluorescencia en el cual se midió la intensidad de fluorescencia de la dilución que contenía NBGal a una concentración de 10^{-6} M y la enzima β -Galactosidasa humana según el tiempo transcurrido desde la adición de ésta ($\lambda_{exc}=623$ nm).

Las medidas se realizaron transcurridos 5, 15 y 60 minutos, tras la adición de 2 μL de la enzima con una concentración 3.7 mg/mL en una disolución de NBGal 200 μL en $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ (99:1) (*Figura 8*).

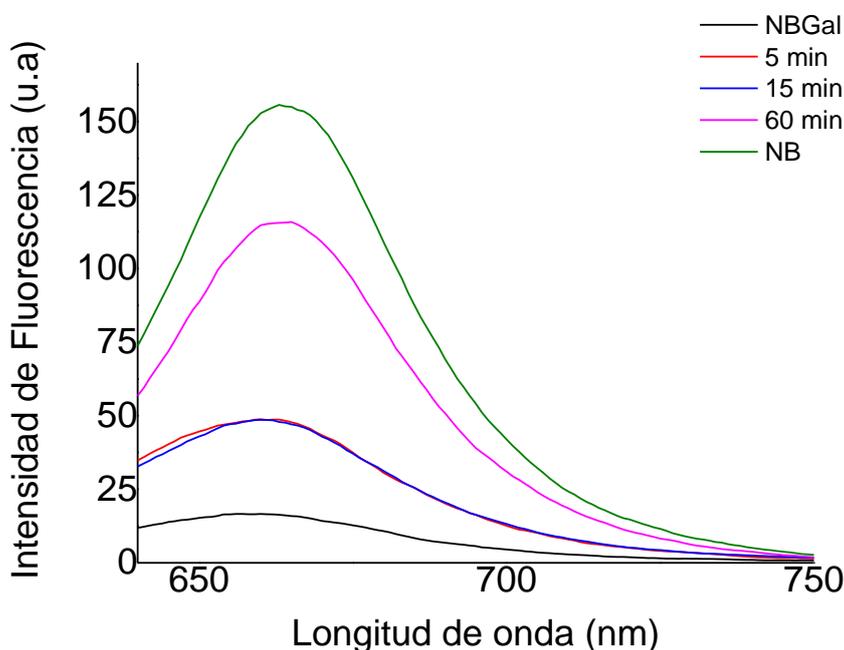


Figura 8. Curva cinética de la reacción de hidrólisis de NBGal (10^{-6} M) tras la adición de 2 μL de la enzima β -Galactosidasa humana (3.7 mg/mL) en una disolución de NBGal 200 μL en $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ (99:1). Las medidas se tomaron transcurridos 5, 15 y 60 minutos desde la adición de la enzima. $\lambda_{\text{exc}}=623$ nm.

3.2.2.2. Curva de Concentración

Este ensayo también se llevó a cabo mediante medidas de fluorescencia en el cual se midió la intensidad de fluorescencia de una dilución de NBGal (10^{-6} M) y la enzima β -Galactosidasa humana, pero en este caso se hizo tras la adición de diferentes cantidades de ésta ($\lambda_{\text{exc}}= 623$ nm).

Se añadió de manera progresiva una cantidad de 1 μL de β -Galactosidasa con una concentración 3.7 mg/mL en una disolución de NBGal 200 μL en $\text{H}_2\text{O}:\text{DMSO}$ (99:1) dejando reaccionar durante 5 minutos antes de medir (*Figura 9*).

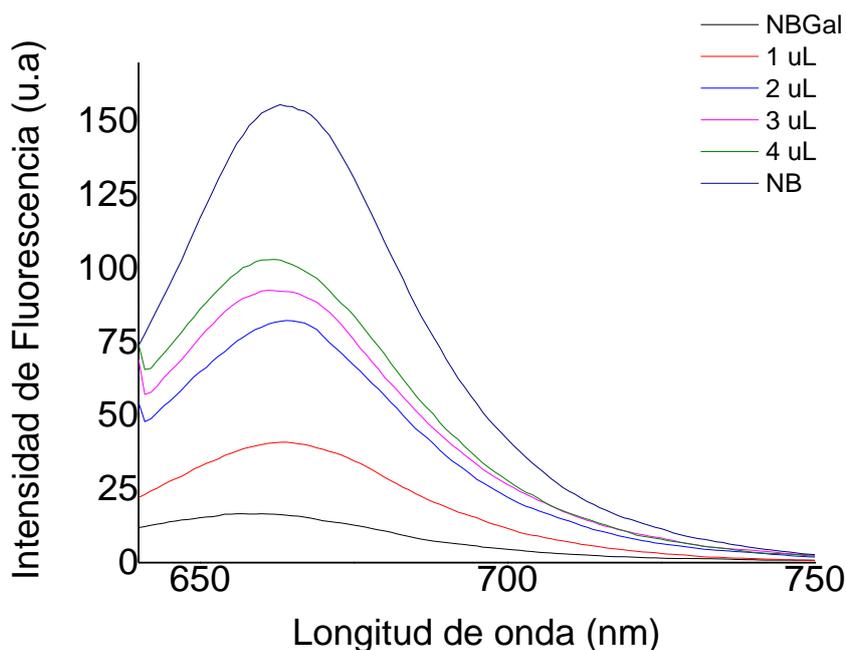


Figura 9. Curva de concentración de la reacción de hidrólisis de NBGal (10^{-6} M) tras la adición de diferentes cantidades (1, 2, 3 y 4 μ L) de la enzima β -Galactosidasa humana (3.7 mg/mL) en una disolución de NBGal 200 μ L en H₂O:DMSO (99:1). $\lambda_{exc}=623$ nm.

3.2.3. Medida de interferentes

Para determinar la selectividad de la sonda NBGal se preparó una disolución de la sonda a una concentración de 10^{-6} M en H₂O:DMSO (99:1) a la cual se le añadieron diversos compuestos. Los compuestos analizados fueron Na⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Cl⁻, S²⁻, SO₄²⁻, NO³⁻, L-Arginina, Glutación reducido, Catalasa de hígado bovino, Fosfatasa de patata, α -Amilasa de *Aspergillus oryzae*, Ribonucleasa A de páncreas bovino, Peroxidasa de rábano, Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, Alcohol deshidrogenasa de *Sacharomyces cerevisiae*, Lipasa de páncreas porcino, Proteasa de *Streptomyces griseus*, Esterasa de hígado porcino y β -Galactosidasa humana. Se midieron mediante la utilización de un equipo de fluorescencia a 666 nm ($\lambda_{exc}=623$ nm) a tiempo 0 y 60 minutos tras la adición de los estímulos (Figura 10). Las concentraciones para los reactivos químicos empleadas fueron de 150 μ M, mientras que en las enzimas y proteínas (excepto β -Galactosidasa, 3.7 mg/mL) fue de 150 mg/mL. Se observó la hidrólisis selectiva de la sonda NBGal frente a la presencia de la enzima β -Galactosidasa.

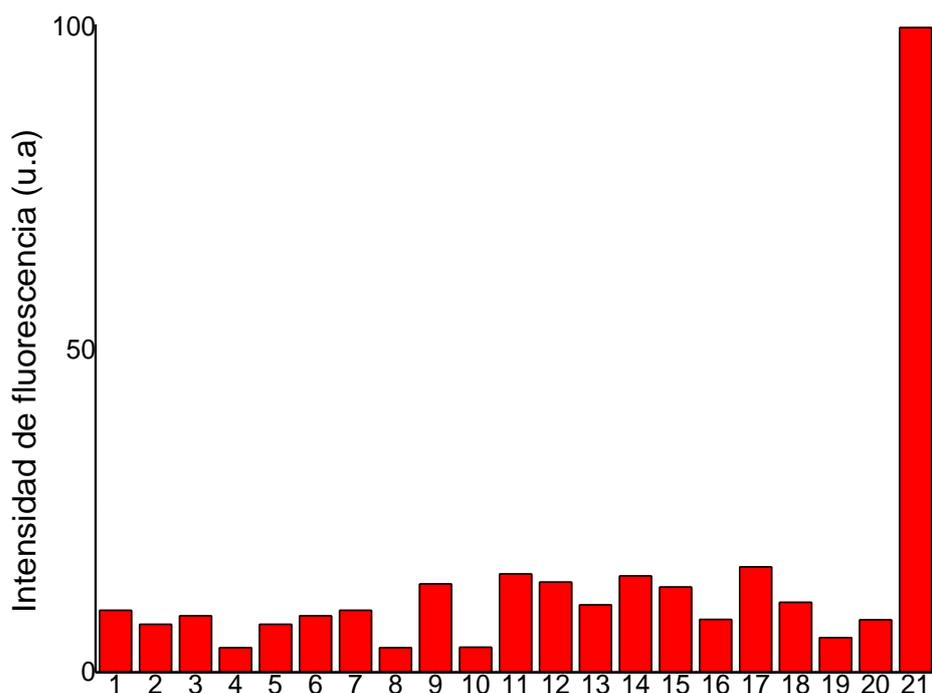


Figura 10. Gráfico de la medida con interferentes sobre la sonda NBGal. Las medidas se realizaron con los compuestos 1: Na⁺, 2: Ca²⁺, 3: Fe²⁺, 4: Fe³⁺, 5: Cl⁻, 6: S²⁻, 7: SO₄²⁻, 8: NO³⁻, 9: L-Arginina, 10: Glutación reducido, 11: Catalasa de hígado bovino, 12: Fosfatasa de patata, 13: α-Amilasa de *Aspergillus oryzae*, 14: Ribonucleasa A de páncreas bovino, 15: Peroxidasa de rábano, 16: Glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, 17: Alcohol deshidrogenasa de *Sacharomyces cerevisiae*, 18: Lipasa de páncreas porcino, 19: Proteasa de *Streptomyces griseus*, 20: Esterasa de hígado porcino, 21: β-Galactosidasa humana en una disolución H₂O:DMSO (99:1). Se midió la señal de fluorescencia a 666 nm ($\lambda_{exc}=623$ nm) de los interferentes libres y junto con la sonda molecular NBGal, a este último ensayo se le adicionó 2 μ L de la enzima β-Galactosidasa humana (3.7 mg/mL). Se recogieron datos a tiempos 0 y 60 minutos tras la adición de los estímulos.

3.2.4. Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* se realizaron con células 4T1 (células cancerosas de mama de ratón) de ATCC. Las células se mantuvieron en un medio DMEM suplementado con FBS al 10% y se incubaron con O₂ al 20% y CO₂ al 5% a una temperatura de 37°C.

Las células se analizaron de forma rutinaria para determinar la contaminación por micoplasma utilizando el sistema de detección rápida de cultivo de tejidos de micoplasma NI (MTC-NI) (Gen-Probe).

Para la inducción del estado de senescencia en las células 4T1, se cultivaron durante 2 semanas con un medio que contenía palbociclib en una concentración de 5 μM .

Para realizar el ensayo, se utilizaron células 4T1 control y células 4T1 con senescencia inducida, ambos tipos se pusieron en placas de 96 pocillos transparentes de fondo plano a una densidad de 4000 y 6000 células por pocillo, respectivamente.

Transcurridas 24 horas, ambos tipos de células se incubaron con diluciones de la sonda molecular NBGal para analizar la viabilidad pasadas 48 horas, mediante el ensayo de viabilidad de células luminiscentes CellTiter-GLO. En cuanto a la obtención de los datos brutos, se consiguieron mediante el análisis de la luminiscencia de las células en un lector de placas de etiquetas múltiples VICTOR (PerkinElmer).

Para las imágenes de microscopía confocal, las células 4T1 senescentes y control fueron incubadas con concentraciones de NBGal de 0.625 y 1.25 μM durante 2 horas. También se procedió a la incubación con NB comercial 1.25 μM en células senescentes y control también durante 2 horas. Las imágenes fueron obtenidas en el equipo microscópico confocal multifotón Olympus FV1000MPE.

3.2.5. *In vivo*

Los ensayos *in vivo* se realizaron con ratones BALB/cByJ, los cuales se estudiaron en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de acuerdo con las recomendaciones de la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA).

Las células 4T1 a partir de las cuales se obtuvo el tumor de mama se cultivaron en un medio DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina-estreptomicina. Para generar los tumores de mama las células se tripsinizaron, se cuantificaron con un contador celular automatizado LUNA y se inyectaron subcutáneamente en la mama izquierda de los ratones hembra BALB/cByJ de entre 28 y 34 semanas de edad a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células en un volumen de 100 μL .

Para generar senescencia, se administró el fármaco palbociclib a través de una sonda oral diaria durante 7 días (100 mg/kg) disuelto en lactato de sodio 50 mM, a pH=5. Posteriormente, se inyectó un volumen de 200 μL de la dilución de NBGal a una

concentración de 5 mg/mL en un medio DMEM (DMSO al 5%) a los ratones por vía intravenosa.

Para la detección de la sonda NBGal se utilizó un sistema de imágenes de espectro IVIS para la toma de las imágenes de fluorescencia, a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 623nm y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 666 nm, para posteriormente analizarlas mediante el software de imágenes en vivo de Caliper Life Sciences.

3.2.6. *Ex vivo*

Tras 3 horas, los ratones fueron sacrificados mediante una exposición a CO₂ en una cámara de eutanasia. Los tumores y órganos (pulmón, hígado, riñón, vejiga y bazo) fueron extraídos inmediatamente para ser analizados. Las imágenes obtenidas para órganos y tumores fueron recogidas por un sistema de imágenes de espectro IVIS para la toma de las imágenes de fluorescencia, a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 623 nm y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 666 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis y Caracterización de NBGal

La sonda molecular NBGal se sintetizó mediante una reacción de sustitución nucleofílica de galactosa en el fluoróforo comercial NB como se muestra en el esquema de la *figura 11*:

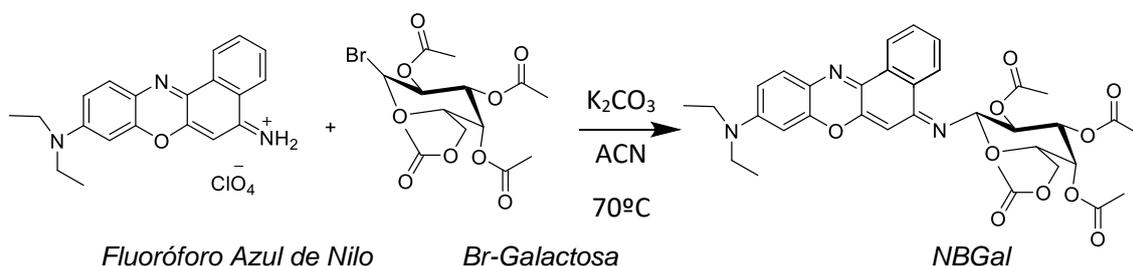
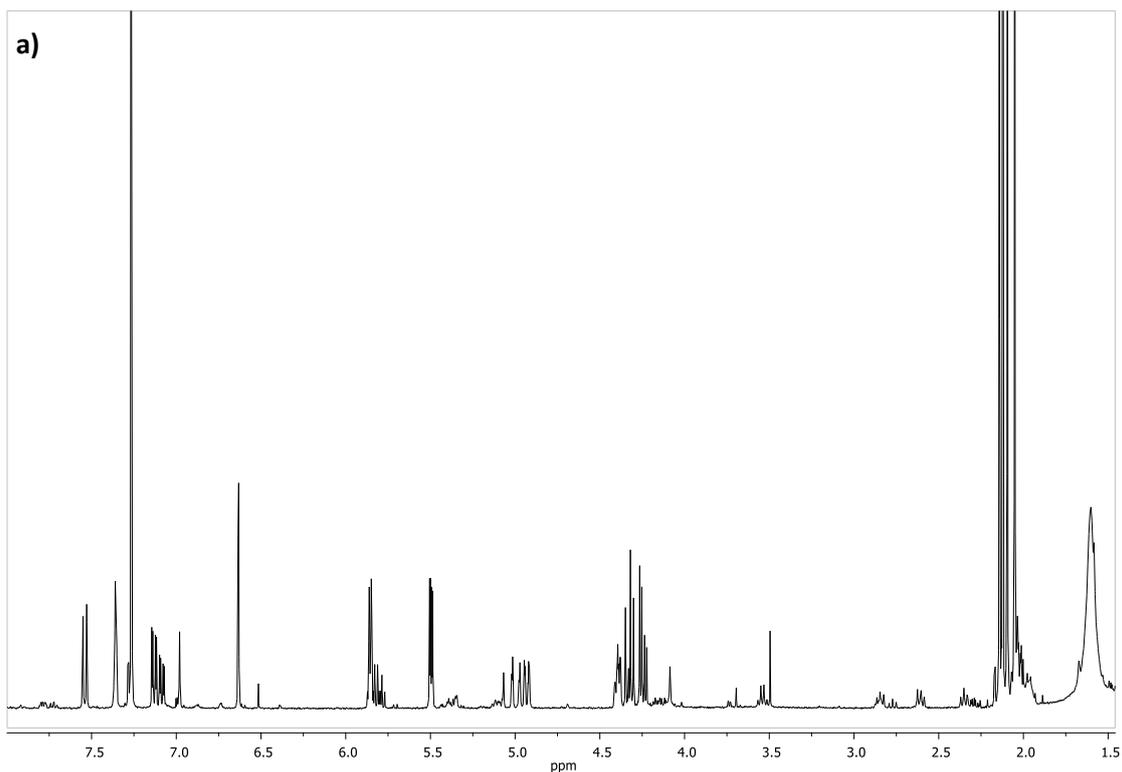
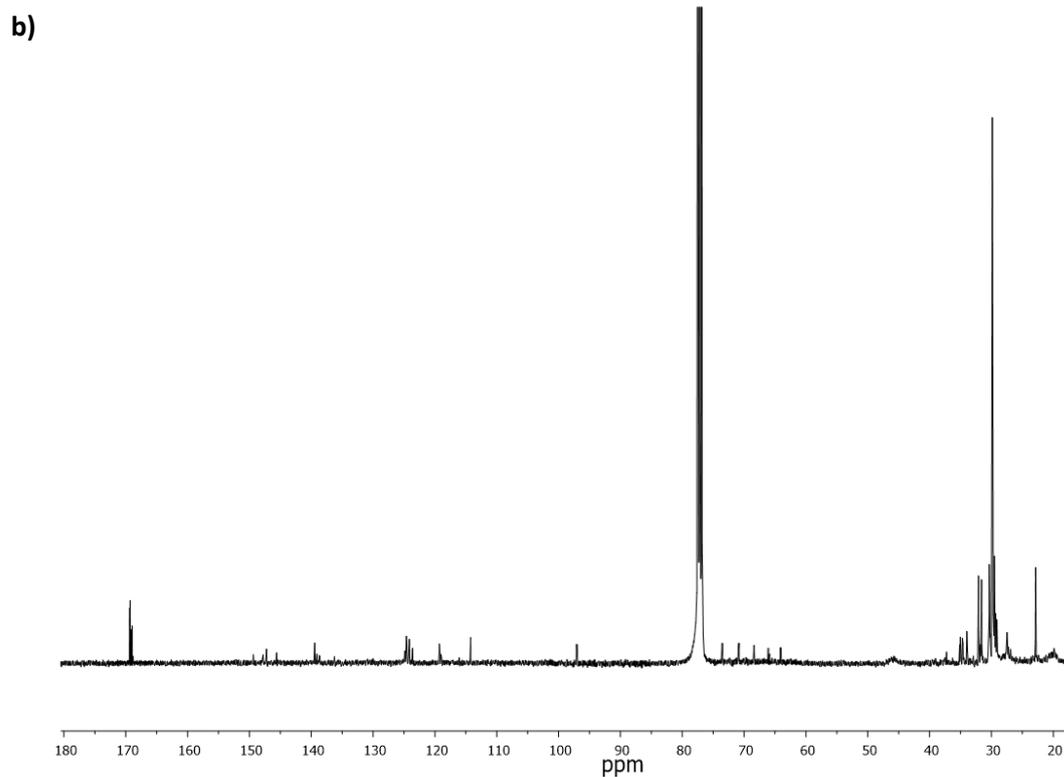


Figura 11. Síntesis de la sonda molecular NBGal.

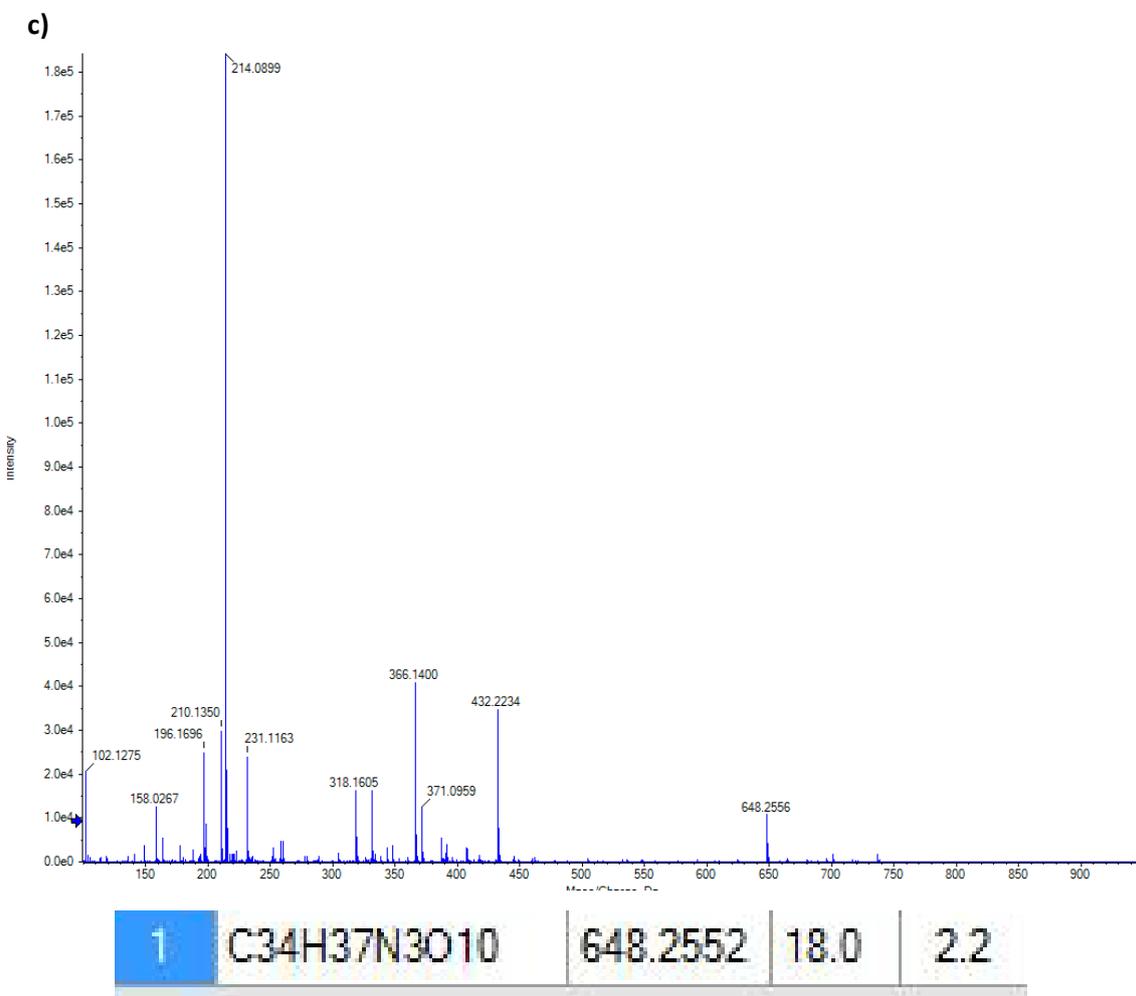
Tras la síntesis, la sonda NBGal se caracterizó mediante la utilización de medidas de resonancia magnética nuclear (RMN) ¹H, ¹³C y espectroscopia de masas (HRMS) (*Figura 12*).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.29-7.62 (m, 2H), 7.13 (dd, $J = 2.5, 8.6$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 2.5, 8.4$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 5.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.50 (dd, $J = 2.2, 4.8$ Hz, 1H), 5.02-5.04 (m, 2H), 4.41-4.38 (m, 1H), 4.35-4.30 (m, 1H), 4.26-4.22 (m, 2H), 3.54 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 2.86-2.82 (m, 1H), 2.63-2.59 (m, 1H), 2.37-2.33 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.7-1.5 (m, 6H).



^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 169.89 (2C), 169.75 (1C), 169.09 (1C), 149.36 (1C), 147.77 (1C), 147.23 (1C), 145.62 (1C), 139.44 (1C), 139.10 (1C), 138.70 (1C), 136.25 (1C), 124.87 (1C), 124.61 (1C), 124.52 (1C), 124.13 (1C), 123.63 (1C), 119.27 (1C), 119.01 (1C), 114.22 (1C), 96.84 (1C), 74.32 (1C), 71.88 (1C), 68.85 (1C), 66.14 (1C), 64.61 (1C), 32.08 (1C), 31.59 (1C), 30.35 (1C), 29.85(2C), 29.52(1C), 22.85(2C).



HRMS: Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_{10}$ (M^+) 648.205 m/z; medida 648.255 m/z

Figura 12. Caracterización de la sonda NBGal con medidas de RMN ^1H (a) y ^{13}C (b), y HRMS (c).

Los espectros de absorbancia, obtenidos mediante medidas de luz ultravioleta (UV), de NB y NBGal, mostraron una mayor absorbancia para el fluoróforo. Los espectros de fluorescencia muestran una disminución de la intensidad de fluorescencia de la sonda frente al fluoróforo en una disolución de PBS y DMSO (0.01%), la cual mostró en UV una máxima absorbancia alrededor de 600 nm y en el fluorímetro una banda de emisión intensa en 660 nm.

Estas medidas también sirvieron para comprobar que, tras la unión del NB con la molécula de galactosa, es decir, la sonda NBGal, se produce una alteración en las propiedades fotoquímicas (*Figuras 13 y 14*).

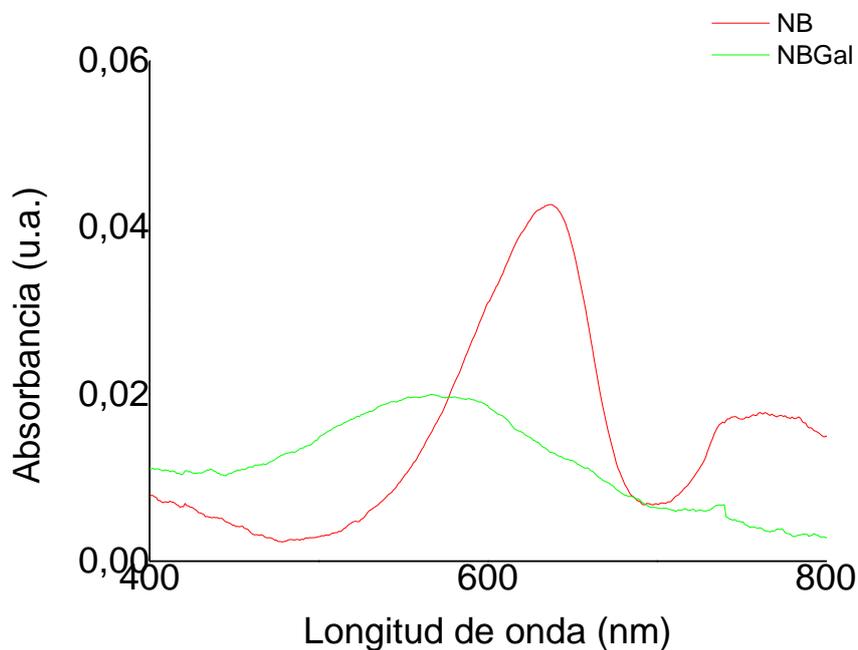


Figura 13. Medida de la absorbancia en un equipo de medición UV del fluoróforo NB (10^{-6} M) libre y la sonda molecular NBGal (10^{-6} M) en una disolución de PBS y DMSO (0.01%).

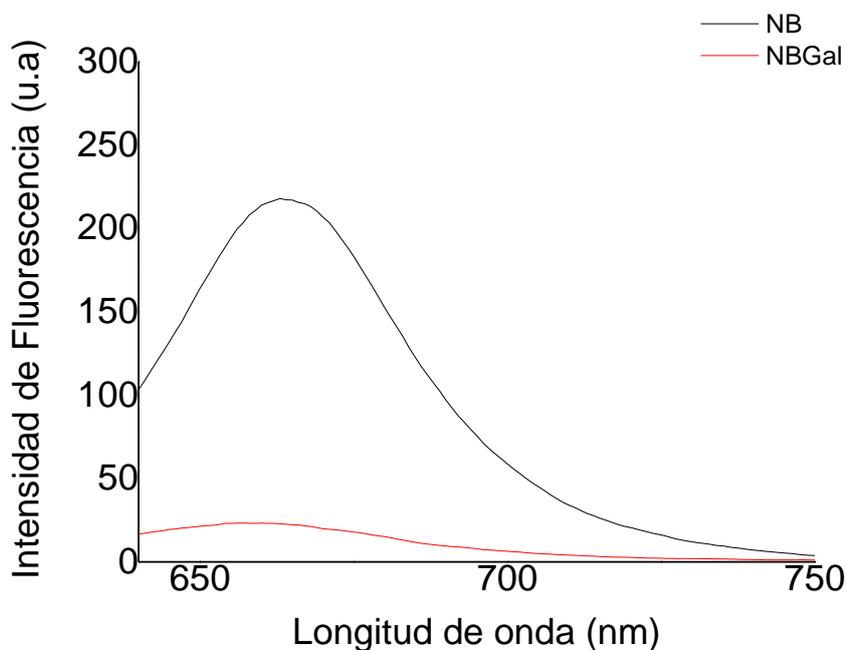


Figura 14. Medida de la intensidad de fluorescencia en un fluorímetro del fluoróforo NB libre (10^{-6} M) y la sonda molecular NBGal (10^{-6} M) en una disolución de PBS y DMSO (0.01%) a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 623 nm.

La baja intensidad de emisión de la sonda NBGal en comparación con la del NB es debida al proceso de transferencia de electrones foto-inducido desde la unidad de galactosa al fluoróforo excitado. Se podría decir que, tras la unión con la molécula de azúcar, el NB “se apaga”.

Gracias a los datos obtenidos en las medidas de fluorescencia, se calculó el rendimiento cuántico de la sonda NBGal siguiendo la siguiente ecuación:

$$\frac{\Phi_x}{\Phi_s} = \frac{S_x}{S_s} \times \frac{1 - 10^{-A_s}}{1 - 10^{-A_x}} \times \frac{n_x^2}{n_s^2}$$

Figura 15. Ecuación del cálculo del rendimiento cuántico (Φ_x) utilizada. Donde se considera S_x al área bajo la curva de fluorescencia de la muestra y S_s al área de la referencia NB, A_s y A_x a la absorbancia respectivamente, mientras que n_x^2 y n_s^2 indican los valores del índice de reflexión en el que han sido medidos.

Tras realizar los cálculos y sabiendo que $\Phi_{NB}=0,004$ (Jose et al., 2009), se obtuvo como resultado que $\Phi_{NBGal}=0,0015$.

Para la caracterización de la sonda NBGal también se estudió el efecto de diferentes pH en su intensidad de emisión de fluorescencia (*Figura 16*). Se observa una tendencia de disminución de fluorescencia según aumenta el pH. El fluoróforo NB muestra una buena señal de fluorescencia a pH=6, que es el pH lisosomal de células senescentes (Raffaele et al., 2020), permitiendo su visualización.

Por estos motivos se concluyó que el pH no afecta de manera significativa en la emisión de fluorescencia del fluoróforo generado tras la hidrólisis de la sonda NBGal en las condiciones de trabajo.

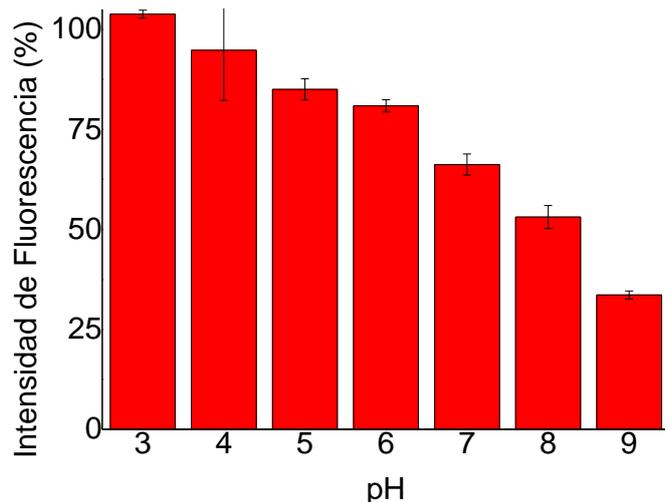


Figura 16. Gráfico de la medida de distintos pH (3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) para determinar la intensidad de fluorescencia emitida a 666 nm por el fluoróforo liberado tras la reacción de hidrólisis de la sonda NBGal (10^{-6} M) en una disolución de PBS y DMSO (0.01%) a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 623 nm.

Las medidas de fluorescencia a diferentes concentraciones de la sonda nos permitieron la optimización de los ensayos de hidrólisis. Estas medidas mostraron igualmente que a concentraciones superiores a 10^{-4} M se produce la disminución de la señal de fluorescencia debido a problemas de solubilidad del fluoróforo por efectos de π stacking (Figura 17).

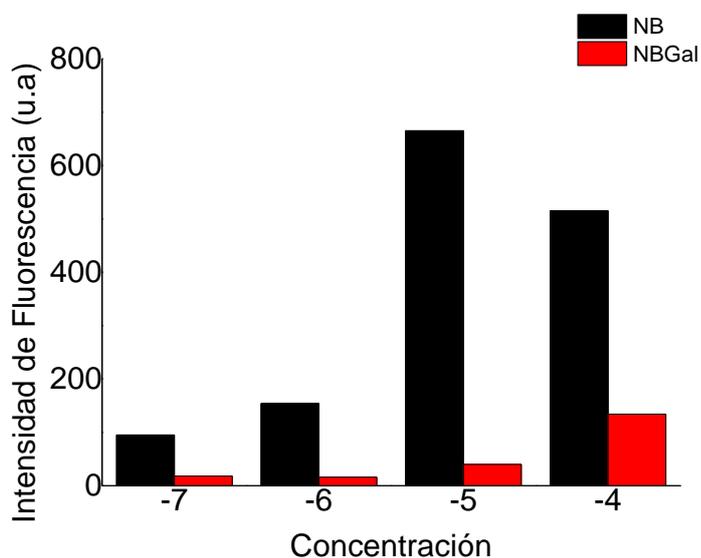


Figura 17. Gráfico de la medida de la emisión de fluorescencia a distintas concentraciones del fluoróforo NB libre y la sonda molecular NBGal en una disolución de PBS y DMSO (0.01%) a una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 623 nm, para determinar la concentración óptima de trabajo de la sonda según la intensidad de fluorescencia emitida.

Siguiendo con el proceso de caracterización de NBGal, se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática de la sonda tras la adición de la enzima β -Galactosidasa humana mediante espectroscopia de fluorescencia, según el tiempo transcurrido desde la adición y según la cantidad de enzima añadida.

Como se puede observar en la *Figura 8*, que muestra la curva cinética de hidrólisis de NBGal, la intensidad de fluorescencia aumenta significativamente tras 5 minutos. También se observa un notable aumento de fluorescencia a los 60 minutos. Esto confirma la hidrólisis de la sonda NBGal y la consiguiente liberación del fluoróforo. En cuanto a la curva de concentración obtenida, como se observa en la *Figura 9*, la intensidad de fluorescencia aumenta según la cantidad de enzima añadida a la dilución.

En ambos casos se demuestra que la enzima β -Galactosidasa hidroliza la sonda molecular NBGal liberando el fluoróforo Azul de Nilo, responsable de la emisión de fluorescencia.

Debido a que el objetivo del proyecto es detectar senescencia en células en modelos *in vivo*, es correcto pensar que en las células existen compuestos que puedan interferir en la medición y obtención de resultados, y por tanto obtener unos datos incorrectos.

Es por esto por lo que se realizó un ensayo con interferentes, para demostrar que otros compuestos que pueden estar presentes en células vivas no influyen en la hidrólisis de NBGal ni en la obtención de los resultados tras las medidas de emisión de fluorescencia. Como se observa en la *Figura 10*, gracias al ensayo realizado se demuestra que ningún compuesto afecta de manera significativa en la hidrólisis de la sonda NBGal.

Esto confirma que la sonda supone un método eficaz y selectivo de detección de células senescentes *in vitro* mediante la hidrólisis selectiva de la sonda NBGal en presencia de la enzima β -Galactosidasa.

La sonda NBGal muestra varias ventajas en comparación con las últimas sondas mostradas en la bibliografía para la detección de senescencia. Entre ellas, la sonda NBGal presenta una emisión de fluorescencia en el NIR. Esta longitud de onda de excitación permite una mayor penetrabilidad del tejido, menos fototoxicidad y una menor dispersión de la luz. Además, la molécula generada después de la hidrólisis de NBGal con la enzima β -Galactosidasa (es decir, el fluoróforo NB) permite la medida *in vivo* directa de la sonda (*Figura 18*) (Kim et al., 2018; J. Liu et al., 2020; Lozano-Torres et al., 2017, 2021; Makau et al., 2020; Safir Filho et al., 2018; Wang et al., 2019).

SONDA	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Línea Celular	Inducción Senescencia Celular	Modelo in vivo	Inducción Senescencia in vivo	Multifotón	IVIS	Referencia
AH-Ga	750	540	SK-Mel-103	Palbociclib	SK-Mel-103 xenoinjerto	Palbociclib	SI	NO	Lozano-Torres et al., 2017
NIR-BG	680	708	MCF7	Camptotecina y Radiación	CT26 xenoinjerto	Camptotecina	NO	SI	Wang et al., 2019
			HeLa		HeLa xenoinjerto				
NIR-BG2	650	709	HeLa	Camptotecina	HeLa xenoinjerto	Camptotecina	NO	SI	J. Liu et al., 2020
SRP	495	545	HUVEC	H ₂ O ₂	-	-	-	-	Kim et al., 2018
CBT- β -Gal	365	510	HeLa	H ₂ O ₂	-	-	-	-	Makau et al., 2020
β Gal-1-4	361-370	426-480	A375 HT-29	Hidroxiurea	-	-	-	-	Safir Filho et al., 2018
HeckGal	950	550	SK-Mel-103 4T1	Palbociclib	Tumor de mama ortotópico 4T1	Palbociclib	SI	SI	Lozano-Torres et al., 2021
			A549	Cisplatino	Fibrosis renal	Ácido Fólico			
			SK-Mel-103 BJ fibroblast	Doxorrubicina					
NBGal	623	666	4T1	Palbociclib	Tumor de mama ortotópico 4T1	Palbociclib	NO	SI	Presente Proyecto

Figura 18. Tabla comparativa de las sondas existentes para la detección de senescencia celular.

4.2. Ensayo *in vitro* de NBGal

En los ensayos para evaluar la toxicidad y viabilidad celular en células 4T1 (células cancerosas de mama de ratón) de ATCC, tras la exposición prolongada a la sonda molecular NBGal se observó una nula toxicidad para 4T1, tanto en las células control como en las células con senescencia inducida, en las concentraciones de trabajo utilizadas en el presente proyecto (0.625 y 1.25 μ L), ya que se observa una viabilidad celular de alrededor del 100% (*Figura 19*).

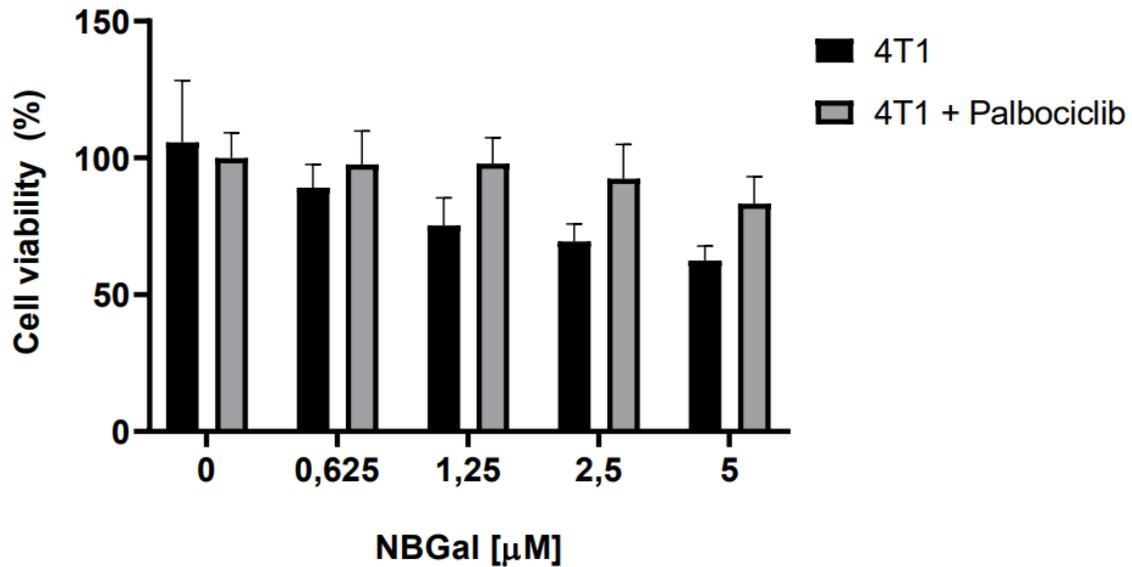


Figura 19. Ensayo de toxicidad en células 4T1 tras la exposición prolongada (48 horas) de NBGal a diversas concentraciones (0, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 μM).

Se sembraron células senescentes y control en placas de 96 pocillos transparentes de fondo plano y se incubaron con soluciones de 0.625 y 1.25 μM de NBGal en un medio DMEM (DMSO al 0.1%) durante 2 horas, además de una solución de NB libre 1.25 μM . Se obtuvieron las imágenes mediante microscopía confocal a un aumento 20x (*Figura 20*).

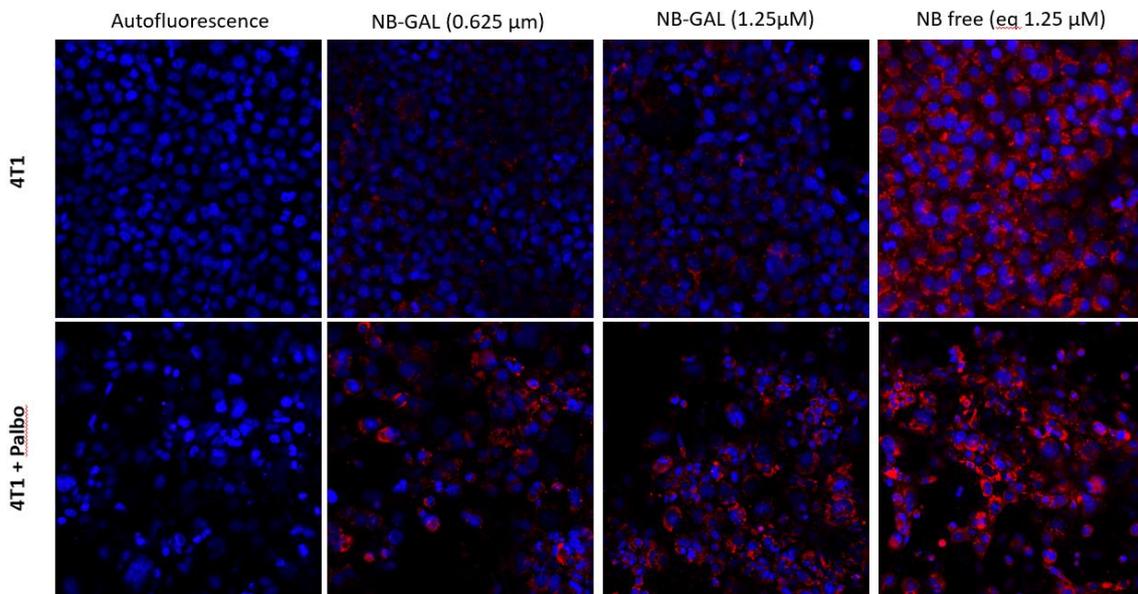


Figura 20. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células 4T1 control y senescentes incubadas con diluciones de NBGal y NB libre. En la primera columna se muestra la auto-fluorescencia celular de las células 4T1 control y las células 4T1

senescentes. En la segunda y tercera columna se muestra el resultado obtenido tras incubarse ambos tipos de células con la sonda molecular NBGal a una concentración de 0.625 y 1.25 μM , respectivamente. En la cuarta y última columna se encuentra el ensayo realizado mediante la incubación de las células con el fluoróforo NB libre (1.25 μM).

Como se puede observar en la figura anterior, las células 4T1 no senescentes muestran una emisión débil y una fluorescencia mínima en presencia de la sonda NBGal en las 2 concentraciones estudiadas, mientras que las células tratadas con palbociclib muestran una intensa señal fluorescente en las mismas condiciones, la cual aumenta según la concentración de la sonda NBGal.

Además, con el ensayo de las células 4T1 tratadas con el fluoróforo NB libre, se observa una intensa fluorescencia tanto en las muestras de células senescentes inducidas como en las células tumorales sin senescencia, lo que nos confirma que el NB no posee selectividad en cuanto a la tinción de células y por tanto no se puede utilizar el fluoróforo sólo para la detección de células en estado senescente.

La señal fluorescente que se observa en las células 4 T1 senescentes tras la incubación con la sonda se debe a la reacción de hidrólisis de NBGal, gracias a la sobreexpresión de la enzima lisosomal β -Galactosidasa, que da como resultado el fluoróforo NB libre.

Estos resultados demuestran la alta capacidad y eficacia de detección de células senescentes *in vitro* que posee la sonda NBGal.

4.3. Ensayo *in vivo* de NBGal

Se realizaron ensayos *in vivo* con modelos de ratones hembra BALB/cByJ con tumores de cáncer de mama 4T1 tratados con el fármaco palbociclib. En este caso se pretendía estudiar el potencial de NBGal para la detección de senescencia en modelos *in vivo*, tras los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*.

Como primer paso, se inyectaron ortotópicamente células 4T1 ($0,5 \times 10^6$ células/ratón) en la almohadilla de grasa mamaria de los ratones hembra BALB/cByJ para generar tumores de mama. Después, tras siete días de crecimiento del tumor, se administró palbociclib diariamente a través de sonda oral para inducir la senescencia celular y así detener el crecimiento del tumor.

Trascurridos 7 días del inicio del tratamiento con palbociclib, se procedió a inyectar la sonda NBGal (200 μ L) por vía intravenosa a una concentración de 5 mg/mL. Los ratones se sacrificaron 3 horas después del tratamiento tras una exposición a CO₂.

Se puede observar el esquema del procedimiento seguido en la *Figura 21*:

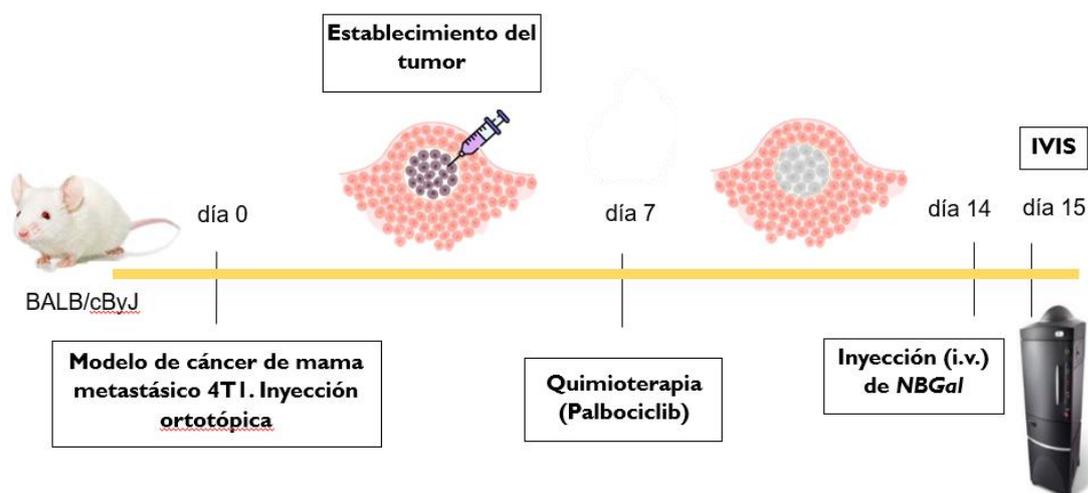


Figura 21. Esquema del procedimiento realizado en los ensayos *in vivo* en modelos de ratones hembra BALB/cByJ con tumores de cáncer de mama 4T1 tratados con el fármaco palbociclib llevados a cabo en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF).

Con las imágenes obtenidas del IVIS (*Figura 22*), se observa que los ratones con tumor y sin senescencia inducida no muestran fluorescencia tras la incubación con NBGal, lo que confirma que la sonda no emite fluorescencia en su estado normal.

Tampoco se observa ninguna emisión de fluorescencia en los ratones con tumor y senescencia inducida mediante palbociclib, en ausencia de la sonda NBGal, con este resultado se comprobó que el fármaco utilizado para inducir senescencia tiene una emisión de fluorescencia nula en las condiciones de medida, por lo que no interfiere en la obtención e interpretación de resultados.

Por último, en el ensayo realizado en los ratones con tumor y senescencia inducida mediante palbociclib, en presencia de NBGal, como se esperaba sí que se observa una gran señal de emisión de fluorescencia en el lugar donde se encuentra el tumor. Esta fluorescencia la emite el NB liberado, resultado de la hidrólisis de la sonda tras la interacción con la enzima β -Galactosidasa.

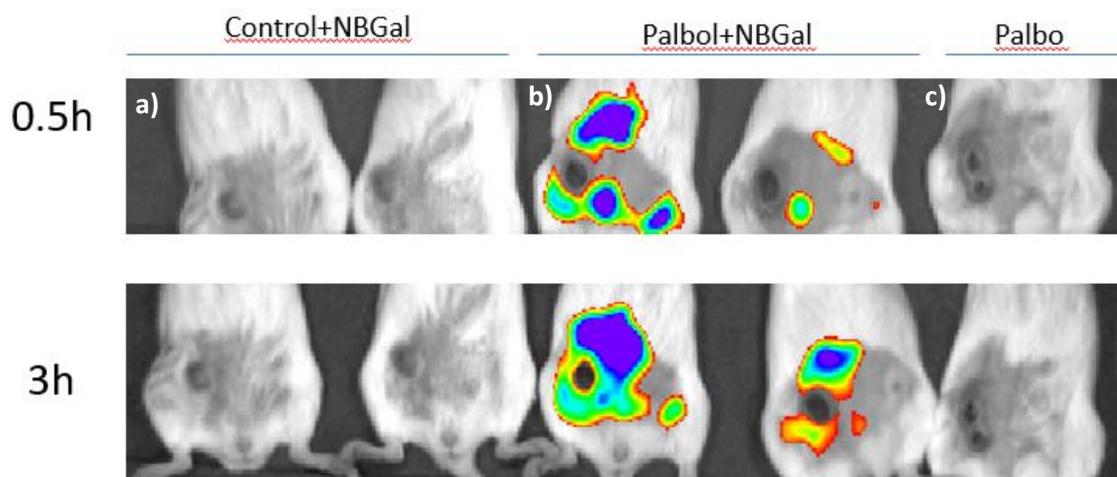


Figura 22. Imágenes de IVIS de ratones hembra BALB/cByJ con incubación con 200 μ L de NBGal 5 mg/ml en un medio DMEM sin FBS por vía intravenosa a tiempos 0.5 y 3 horas. a) Imágenes de los ratones control con inyección de la sonda NBGal. b) Imágenes de los ratones con senescencia inducida con inyección de la sonda NBGal. c) Imágenes de los ratones con senescencia inducida sin inyección de la sonda NBGal.

Tras la cuantificación de los resultados obtenidos en las imágenes de IVIS (*Figura 23*) se determina de nuevo que la sobreexpresión de la enzima β -Galactosidasa presente en las células en estado de senescencia se detecta de una manera óptima gracias a la sonda molecular NBGal, ya que se observan unos datos muy diferenciados en los ratones con senescencia inducida y con inyección de la sonda (Palbo+NBGal).

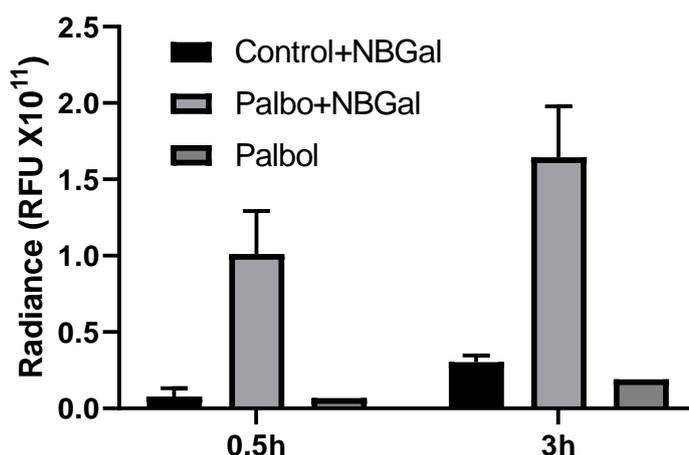


Figura 23. Ensayo de cuantificación de los resultados obtenidos en las imágenes IVIS de intensidad de fluorescencia de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con 200 μ L de NBGal 5 mg/ml en un medio DMEM sin FBS por vía intravenosa. Medidas recogidas a tiempos 0.5 y 3 horas de los ratones control con inyección de NBGal, los

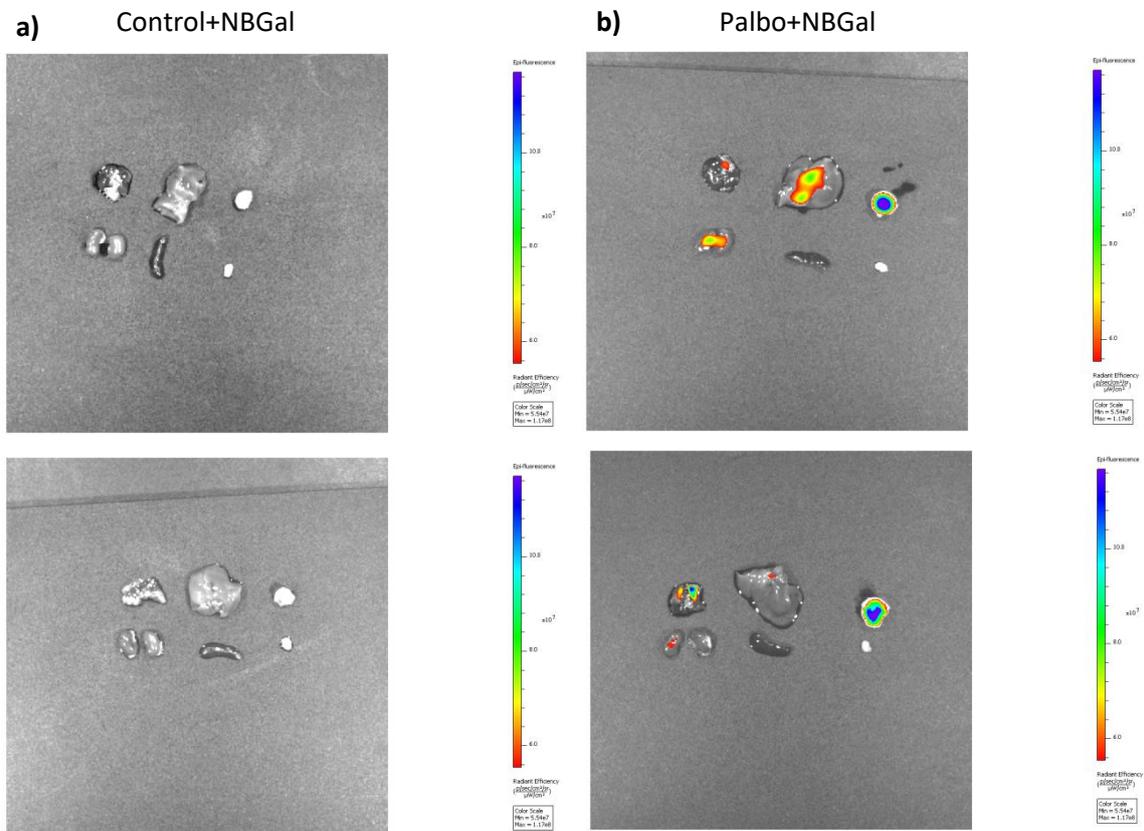
ratones con senescencia inducida e inyección de NBGal y de los ratones con senescencia inducida sin inyección de NBGal.

4.4. Ensayo *ex vivo* de NBGal

Tras sacrificar a los ratones tratados, los tumores y órganos (pulmón, hígado, riñón, vejiga y bazo) se extrajeron y se analizaron inmediatamente.

Como se puede observar en las imágenes de IVIS (*Figura 24*), no existe señal fluorescente ni en los tumores ni en el resto de los órganos analizados *ex vivo* de los ratones control (sin senescencia inducida) en presencia de NBGal. También se utilizaron los tumores de los ratones tratados con el fármaco palbociclib en ausencia de NBGal para controlar la auto-fluorescencia del tejido. No se observa ninguna emisión fluorescente.

Ambos resultados confirman que la fluorescencia que se observa en los tumores de ratones con senescencia inducida en presencia de NBGal (Palbo+NBGal) es debida al fluoróforo NB liberado tras la hidrólisis de la sonda.



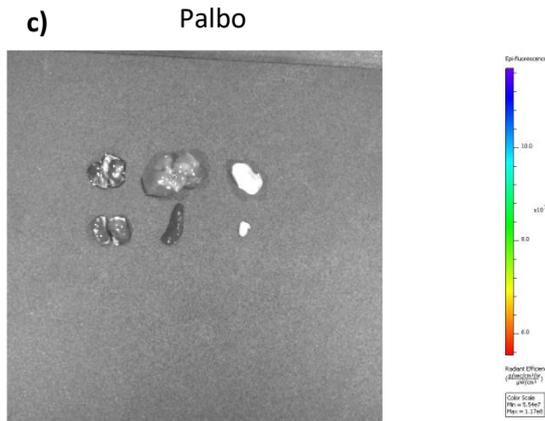


Figura 24. Imágenes de IVIS de los tumores y órganos extraídos de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con 200 μ L de NBGal 5mg/ml en un medio DMEM sin FBS por vía intravenosa. Se observa en orden de izquierda a derecha y de arriba abajo pulmones, hígado, tumor, riñones, bazo y vejiga. a) Imágenes de los órganos extraídos de los ratones control con inyección de la sonda NBGal. b) Imágenes de los órganos extraídos de los ratones con senescencia inducida con inyección de la sonda NBGal. c) Imágenes de los órganos extraídos de los ratones con senescencia inducida sin inyección de la sonda NBGal.

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia en los tumores y órganos para cada condición (*Figura 25*). Se observa un aumento de emisión de aproximadamente 7.5 veces en los tumores extraídos de los ratones con senescencia inducida con palbociclib y tras la incubación con la sonda NBGal, respecto a los tumores de los ratones control incubados también con NBGal. Se observa también un aumento de 8 X entre los tumores de los ratones Palbo+NBGal en comparación con los tumores de los ratones con senescencia inducida per en ausencia de NBGal.

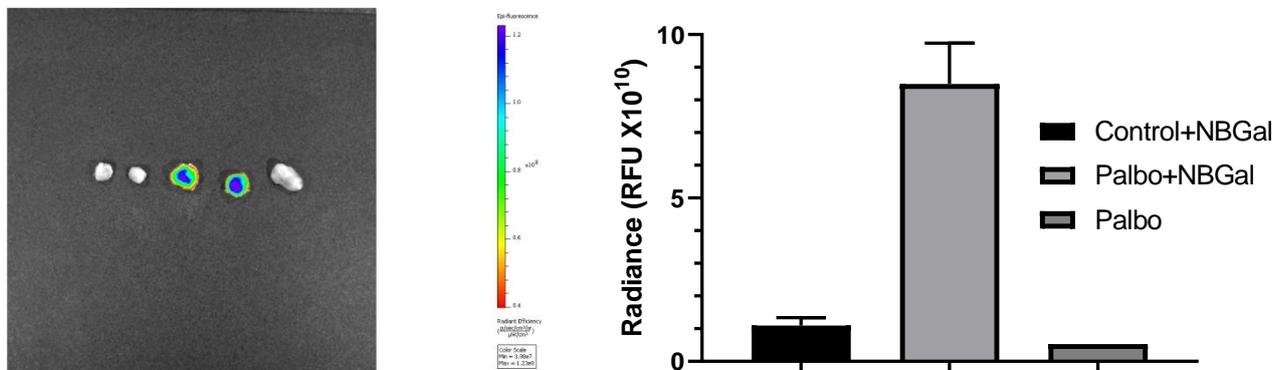


Figura 25. Ensayo de cuantificación de intensidad de fluorescencia en los tumores extraídos de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con 200 μ L de NBGal

5mg/ml en un medio DMEM sin FBS por vía intravenosa. En la primera imagen se observan en orden de izquierda a derecha dos tumores de ratones control con inyección de sonda NBGal, dos tumores de ratones con senescencia inducida y con inyección de NBGal y por último un tumor de ratón con senescencia inducida y sin inyección de NBGal.

Comparando la cantidad de fluorescencia emitida por los tumores y órganos extraídos gracias a la cuantificación de resultados, se concluye que es en el tumor donde se localizan las células senescentes inducidas, y que los otros órganos no influyen en la emisión de fluorescencia en este caso ya que no se indujo senescencia en ellos. En este sentido y gracias a la sonda NBGal se puede decir que la terapia de inducción de senescencia sobre el tumor se ha conseguido favorablemente (*Figura 26*).

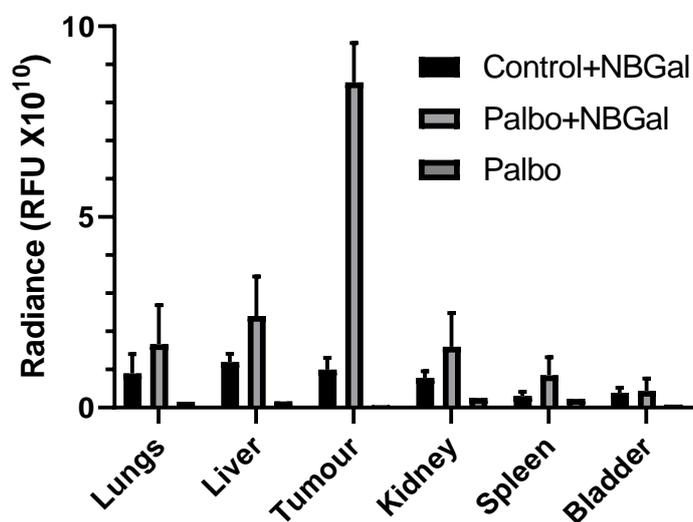


Figura 26. Comparativa de la cantidad de fluorescencia emitida de los tumores y órganos extraídos (pulmones, hígado, tumor, riñón, bazo y vejiga) de los ratones hembra BALB/cByJ con incubación con 200 μ L de NBGal 5mg/ml en un medio DMEM sin FBS por vía intravenosa.

Todos los resultados obtenidos demuestran que la sonda molecular NBGal detecta de manera eficiente células senescentes en modelos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de una manera poco invasiva, rápida y distinguible.

5. CONCLUSIONES

En relación con los resultados obtenidos y su discusión, se han obtenido diversas conclusiones en respuesta a los objetivos planteados al inicio del proyecto. Por consiguiente, estas conclusiones son:

1. La síntesis de NBGal se lleva a cabo de una manera rápida y sencilla, pues solo requiere de un único paso de síntesis y una posterior purificación para obtenerse. Además, los dos compuestos que la constituyen, el fluoróforo Azul de Nilo (NB) y la α -D-galactosa, están disponibles en formato comercial.
2. NBGal consta de un fenoxacinio unido mediante un enlace N-glucosídico a una molécula de galactosa acetilada que disminuye la emisión del fluoróforo NB. Tras el proceso de hidrólisis de la sonda en presencia de la enzima β -Galactosidasa se libera el NB, el cual emite una emisión de fluorescencia en la región óptica del infrarrojo cercano (NIR).
3. La determinación estructural mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas confirma la estructura de la sonda molecular NBGal sintetizada. Gracias a la caracterización química se han determinado mediante técnicas espectroscópicas la concentración y condiciones óptimas de trabajo de la sonda, además de confirmar que otros compuestos y el pH no interfieren en su rendimiento.
4. Los ensayos *in vitro* realizados con células 4T1 con senescencia inducida mediante el fármaco palbociclib muestran la eficacia de NBGal para detectar este tipo de células, mediante imágenes de microscopía confocal. Además, los ensayos de viabilidad validan su uso en células a las concentraciones de trabajo.
5. Los ensayos *in vivo* realizados en modelos de ratones hembra BALB/cByJ con tumores de mama 4T1 con senescencia inducida también determinan favorablemente la alta capacidad de detección de células en estado de senescencia que posee la sonda NBGal. Las imágenes de IVIS obtenidas muestran una gran emisión de fluorescencia ante la presencia de células senescentes.

6. Los ensayos *ex vivo* de los tumores y órganos de los modelos de ratón utilizados en los ensayos *in vivo* confirman que la fluorescencia observada en las imágenes de IVIS proviene de los tumores con senescencia inducida y en presencia de NBGal, y no de otros órganos.
7. La sonda molecular NBGal permite la detección directa *in vitro* e *in vivo* de senescencia. Al inyectarse por vía intravenosa es por efecto un método poco invasivo, ya que no hay que extraer muestras de tejido ni someter al paciente a ningún tipo de cirugía o intervención. Además, se obtienen resultados concluyentes en un periodo de tiempo muy corto, simplemente con la utilización de un equipo IVIS para la toma de imágenes de fluorescencia.
8. NBGal presenta diversas ventajas sobre otras sondas para la detección de senescencia existentes, la más importante es su emisión de fluorescencia en el NIR.

Con todos los resultados obtenidos se espera que la sonda molecular NBGal sirva para ayudar en la detección de células senescentes, ya sea por terapias anti- o pro- senescencia, por el desarrollo de cualquier enfermedad o por envejecimiento tisular. Gracias a la rápida y fácil detección de este tipo de células con NBGal se podría obtener un método de diagnóstico muy eficaz, y, por tanto, una mejora en el tratamiento de pacientes a nivel mundial.

En cuanto a las proyecciones de futuro del proyecto realizado, actualmente se está estudiando la forma de mejorar la solubilidad de la sonda mediante la modificación de la estructura del fluoróforo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ACHILEFU, S. (2010). The insatiable quest for near-infrared fluorescent probes for molecular imaging. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(51), 9816–9818.
- ACOSTA, J. C., & GIL, J. (2012). Senescence: A new weapon for cancer therapy. *Trends in Cell Biology*, 22(4), 211–219.
- BURN, S. F. (2012). Chapter 21 Detection of β -Galactosidase Activity : X-gal Staining. *Kidney Development: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 886, 241–250.
- CHO, S., & HWANG, E. S. (2012). Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. *Molecules and Cells*, 33(6), 597–604.
- COPPÉ, J.-P., DESPREZ, P.-Y., KRTOLICA, A., & CAMPISI, J. (2010). Annu Rev Pathol_NIH Public Access. *Annu Rev Pathol*, 8(9), 99–118.
- GONZÁLEZ-GUALDA, E., PÀEZ-RIBES, M., LOZANO-TORRES, B., MACIAS, D., WILSON, J. R., GONZÁLEZ-LÓPEZ, C., OU, H. L., MIRÓN-BARROSO, S., ZHANG, Z., LÉRIDA-VISO, A., BLANDEZ, J. F., BERNARDOS, A., SANCENÓN, F., ROVIRA, M., FRUK, L., MARTINS, C. P., SERRANO, M., DOHERTY, G. J., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., & MUÑOZ-ESPÍN, D. (2020). Galacto-conjugation of Navitoclax as an efficient strategy to increase senolytic specificity and reduce platelet toxicity. *Aging Cell*, 19(4), 1–19.
- GORGOLIS, V., ADAMS, P. D., ALIMONTI, A., BENNETT, D. C., BISCHOF, O., BISHOP, C., CAMPISI, J., COLLADO, M., EVANGELOU, K., FERBEYRE, G., GIL, J., HARA, E., KRIZHANOVSKY, V., JURK, D., MAIER, A. B., NARITA, M., NIEDERNHOFER, L., PASSOS, J. F., ROBBINS, P. D., SCHMITT, C. A., SEDIVY, J., VOUGAS, K., ZGLINICKI, T., ZHOU, D., SERRANO, M., DEMARIA, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813–827.
- HARGREAVES, R. J. (2008). The role of molecular imaging in drug discovery and development. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83(2), 349–353.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 1, 585 – 621.
- HERNANDEZ-SEGURA, A., NEHME, J., & DEMARIA, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436–453.
- HOARE, M., ITO, Y., KANG, T. W., WEEKES, M. P., MATHESON, N. J., PATTEN, D. A.,

- SHETTY, S., PARRY, A. J., MENON, S., SALAMA, R., ANTROBUS, R., TOMIMATSU, K., HOWAT, W., LEHNER, P. J., ZENDER, L., & NARITA, M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature Cell Biology*, 18(9), 979–992.
- JOSE, J., & BURGESS, K. (2006). Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. *Tetrahedron*, 62(48), 11021–11037.
- JOSE, J., UENO, Y., & BURGESS, K. (2009). Water-soluble Nile blue derivatives: syntheses and photophysical properties. *Chemistry - A European Journal*, 15(2), 418–423.
- KIM, E. J., PODDER, A., MAITI, M., LEE, J. M., CHUNG, B. G., & BHUNIYA, S. (2018). Selective monitoring of vascular cell senescence via B-Galactosidase detection with a fluorescent chemosensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 274(April), 194–200.
- KIRKLAND, J. L., & TCHKONIA, T. (2015). Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Experimental Gerontology*, 68, 19–25.
- KWAPISZ, D. (2017). Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast Cancer Research and Treatment*, 166(1), 41–54.
- LEE, B. Y., HAN, J. A., IM, J. S., MORRONE, A., JOHUNG, K., GOODWIN, E. C., KLEIJER, W. J., DIMAIO, D., & HWANG, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195.
- LIU, J., MA, X., CUI, C., WANG, Y., DEENIK, P., & CUI, L. (2020). A Self-Immobilizing NIR Probe for Non-invasive Imaging of Senescence.
- LIU, X. D., FAN, C., SUN, R., XU, Y. J., & GE, J. F. (2014). Nile-red and Nile-blue-based near-infrared fluorescent probes for in-cellulo imaging of hydrogen sulfide. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 7059–7070.
- LOZANO-TORRES, B., BLANDEZ, J. F., GALIANA, I., GARCÍA-FERNÁNDEZ, A., ALFONSO, M., MARCOS, M. D., ORZÁEZ, M., SANCENÓN, F., & MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. (2020). Real-Time In Vivo Detection of Cellular Senescence through the Controlled Release of the NIR Fluorescent Dye Nile Blue. *Angewandte Chemie - International Edition*, 59(35), 15152–15156.
- LOZANO-TORRES, B., BLANDEZ, J. F., GALIANA, I., LOPEZ-DOMINGUEZ, J. A., ROVIRA, M., PAEZ-RIBES, M., GONZÁLEZ-GUALDA, E., MUÑOZ-ESPÍN, D., SERRANO, M., SANCENÓN, F., & MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. (2021). A Two-Photon Probe Based on Naphthalimide-Styrene Fluorophore for the in Vivo Tracking of Cellular

- Senescence. *Analytical Chemistry*, 93(5), 3052–3060.
- LOZANO-TORRES, B., ESTEPA-FERNÁNDEZ, A., ROVIRA, M., ORZÁEZ, M., SERRANO, M., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., & SANCENÓN, F. (2019). The chemistry of senescence. *Nature Reviews Chemistry*, 3(7), 426–441.
- LOZANO-TORRES, B., GALIANA, I., ROVIRA, M., GARRIDO, E., CHAIB, S., BERNARDOS, A., MUÑOZ-ESPÍN, D., SERRANO, M., MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R., & SANCENÓN, F. (2017). An OFF-ON Two-Photon Fluorescent Probe for Tracking Cell Senescence in Vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 139(26), 8808–8811.
- MAKAU, J. N., KITAGAWA, A., KITAMURA, K., YAMAGUCHI, T., & MIZUTA, S. (2020). Design and Development of an HBT-Based Ratiometric Fluorescent Probe to Monitor Stress-Induced Premature Senescence. *ACS Omega*, 5(20), 11299–11307.
- MARTEL, J., OJCIUS, D. M., WU, C. Y., PENG, H. H., VOISIN, L., PERFETTINI, J. L., KO, Y. F., & YOUNG, J. D. (2020). Emerging use of senolytics and senomorphics against aging and chronic diseases. *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2114–2131.
- MORREAU, H., GALJART, N. J., GILLEMANS, N., WILLEMSSEN, R., VAN DER HORST, G. T. J., & D'AZZO, A. (1989). Alternative splicing of β -galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a β -galactosidase-related protein. *Journal of Biological Chemistry*, 264(34), 20655–20663.
- MUÑOZ-ESPÍN, D., & SERRANO, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482–496.
- MYRIANTHOPOULOS, V., EVANGELOU, K., VASILEIOU, P. V. S., COOKS, T., VASSILAKOPOULOS, T. P., PANGALIS, G. A., KOULOUKOUSSA, M., KITTAS, C., GEORGAKILAS, A. G., & GORGOLIS, V. G. (2019). Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 193, 31–49.
- NAKAMURA, Y., MOCHIDA, A., NAGAYA, T., OKUYAMA, S., OGATA, F., CHOYKE, P. L., & KOBAYASHI, H. (2017). A topically-sprayable, activatable fluorescent and retaining probe, SPiDER- β Gal for detecting cancer; Advantages of anchoring to cellular proteins after activation. *Oncotarget*, 8(24), 39512–39521.
- RAFFAELE, M., KOVACOVICOVA, K., BONOMINI, F., REZZANI, R., FROHLICH, J., & VINCIGUERRA, M. (2020). Senescence-like phenotype in post-mitotic cells of mice entering middle age. *Aging*, 12(14), 13979–13990.

- REGULSKI, M. J. (2017). Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, 29(6), 168—174.
- SAFIR FILHO, M., DAO, P., GESSON, M., MARTIN, A. R., & BENHIDA, R. (2018). Development of highly sensitive fluorescent probes for the detection of β -galactosidase activity-application to the real-time monitoring of senescence in live cells. *Analyst*, 143(11), 2680–2688.
- SAJI, H. (2017). In Vivo Molecular Imaging. *Biol. Pharm. Bull.*, 40(10), 1605–1615.
- SHARPLESS, N. E., & SHERR, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 397–408.
- SIEBEN, C. J., STURMLECHNER, I., VAN DE SLUIS, B., & VAN DEURSEN, J. M. (2018). Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends in Cell Biology*, 28(9), 723–737.
- SOTO-GAMEZ, A., & DEMARIA, M. (2017). Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discovery Today*, 22(5), 786–795.
- WANG, Y., LIU, J., MA, X., CUI, C., DEENIK, P. R., HENDERSON, P. K. P., SIGLER, A. L., & CUI, L. (2019). Real-time imaging of senescence in tumors with DNA damage. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
- XAVIER, S., MOSCOSO, A., PATRICIO, M., VILLAGÓMEZ, M., GONZÁLEZ, E. J., ANDRÉS, P., PÁEZ, V., GUSTAVO, C., MONTERO, V., LUIS, J., PÁEZ, V., CRÍTICA, M., PABLO, H., & SUÁREZ, A. (2020). *Código ISSN 2588-0551 Quiescencia y senescencia : enfoque traslacional al paciente oncológico y críticamente enfermo . Quiescence and senescence : translational approach to the cancer patient and critically ill . Resumen : Revista científica digital INSPI.* 1–23.
- ZHANG, X., BLOCH, S., AKERS, W., & ACHILEFU, S. (2012). Near-infrared molecular probes for in vivo imaging. *Current Protocols in Cytometry*, SUPPL.60, 1–20.