

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



CASA ABIERTA AL TIEMPO

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE BCL-2 SOBRE LA
PROLIFERACIÓN Y SENESCENCIA DE LAS CÉLULAS
ESTELARES HEPÁTICAS *IN VITRO*.**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Presenta:
BIOL. VIRIDIANA YAZMÍN GONZÁLEZ PUERTOS**

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN**

**ASESORES
DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ-RUIZ
DR. GUILLERMO ROBLES DÍAZ.**

MÉXICO, D.F.

JULIO DE 2007

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Mina Königsberg Fainstein
Profesor titular C. Tiempo completo
Jefa del Laboratorio de **ENVEJECIMIENTO CELULAR**
Dpto. Ciencias de la Salud. C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
mkf@xanum.uam.mx

Asesores:

Dra. . María Concepción Gutiérrez-Ruiz
Profesor titular C. Tiempo completo
Jefa del Laboratorio de Fisiología
Dpto. Ciencias de la Salud. C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
mcgr@xanum.uam.mx

Dr. Guillermo Robles Díaz
Profesor titular
Dpto. Medicina Experimental
Facultad de medicina
guiberodi@yahoo.com.mx

Jurado:

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Profesor titular B. Tiempo completo
Lab. de Envejecimiento Celular
Dpto. Ciencias de la Salud. C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
norm@xanum.uam.mx

“El programa de la maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 309-1) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT PIFOP-CONACyT-SEP y cuenta con apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con la clave C/PFPN-2002-35-32”.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la directora de tesis Dra. Mina Königsberg Fainstein. El trabajo de investigación fue apoyado por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. 45921-M.

Quiero expresar que recibí apoyo de CONACYT con el número de registro 192839.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Efecto de la sobreexpresión de Bcl-2 sobre la proliferación y senescencia de las células estelares hepáticas *in Vitro*. Con fecha de 18 de Julio del 2007.”

Dra. . María Concepción Gutiérrez-Ruiz
PRESIDENTE

Dr. Guillermo Robles Díaz
SECRETARIO

Dra. Norma Edith López Díaz-guerrero
VOCAL

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Mina Konigsberg Fainstein**, por ser una persona muy linda conmigo, dándome todo el apoyo , la confianza y los consejos en todo momento para ir creciendo día con día, gracias.....muchas gracias.

A la **Dra. Concepción Gutiérrez** y al **Dr. Guillermo Robles**, por todas sus observaciones que me sirvieron para mejorar este trabajo

Al **M. en Ciencias José Luis Ventura Gallegos** del Instituto de Ciencias Medicas de Nutrición "Salvador Subirán" e Instituto de Biomedicas de la UNAM, por compartir sus conocimientos.

A la **Dra. Norma Edith López Diaz-Guerrero**, al **M. en B.E. Armando Luna López** y al **Biol. Juan Cristóbal Conde Pérez-Prina**, por los momentos que hemos compartido, así como su apoyo para que yo sea una mejor persona.

A mis **Compañeros de Maestría**, Julio Almaza., Cristóbal, Erika, Julio Brito, por su compañía, y amistad sincera.

Al **Dr. Alejandro Zentella Dehesa**, por permitirme tener una pequeña estancia en su laboratorio.

Al Laboratorio de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana, en particular a la **Dra. Elizabeth Hernández**, por el espacio, el material y el apoyo brindado.

A mis **Amigos**, Claudia, Carlos, Denisse, Samuel, Oscar, Erich Zann gracias... por estar siempre ahí.

A mis **Compañeros del Laboratorio de Envejecimiento Celular** Adriana, Francisco e Irving, por su apoyo.

A mi Familia:

A mis Padres, por que son el tesoro mas grande que tengo, gracias..... por ese amor incondicional que me dan cada día.

A mis hermanos, Gerardo y Julio, por que siempre han hecho que mi vida sea una cascada de felicidad...gracias por apoyarme siempre.

A Ivon y Denisse, gracias...por ser parte de la familia y permitirme sonreír junto a ustedes

A Dolis, Claudia y Cristóbal, por ser mis hermanos del alma.

A Javier Guarneros, por ser mi fuente de energía, gracias mi amor.....

**GRACIAS A LA VIDA
QUE ME HA DADO TANTO,
ME HA DADO LA RISA
Y ME HA DADO EL LLANTO.....**

Violeta Parra, Chile.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1 Fibrosis hepática.....	5
1.2 Células estelares hepáticas.....	6
1.3 Estrés Oxidativo en el Hígado.....	8
1.4 Ciclo Celular.....	10
1.5 Senescencia replicativa.....	11
1.6 La proteína Bcl-2.....	14
2. Justificación.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos particulares.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Metodología.	19
5.1 Cultivo celular.....	19
5.2 Sobreexpresión de la proteína Bcl-2.....	20
5.2.1 Cotransfección de células 293T por el método de fosfato de calcio.....	21
5.2.2 Transfección de células CFSC-2G mediante la técnica de infección retroviral.....	22
5.2.3 Transfección por fosfato de calcio en las células CFSC-2G.....	23
5.2.4 Transfección de las células CFSC-2G por DEAE Dextran.....	23
5.2.5 Transfección de las células CFSC-2G por Lipofección.....	24
5.2.6 Selección con el antibiótico.....	25
5.2.7 Eficiencia de la transfección.....	25
5.2.8 Clonación de colonias y expansión celular en las células CFSC-2G.....	26
5.3 Extracción de proteínas para Western blot.....	27

5.4 Determinación de la proteína total por el método de Bradford.....	27
5.5 Western blot de las colonias celulares.....	28
5.5.1 Electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida-SDS.....	28
5.5.2 Transferencia de proteínas totales a la membrana de nitrocelulosa.....	29
5.5.3 Anticuerpo primario, secundario y revelado..	30
5.6 Sembrado de células para las determinaciones de proliferación, síntesis de ADN y senescencia.....	31
5.7 Tasa de proliferación celular.....	31
5.8 Niveles de síntesis de ADN.....	32
5.9 Senescencia (SA-β-gal).....	32
5.10 Tratamiento agudo con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	33
5.11 Tratamiento estadístico.....	34
6. Resultados.....	35
6.1 Curva para determinar la concentración óptima de genética en la selección celular.....	35
6.2 Eficiencia de la transfección en las células CFSC-2G.....	35
6.3 Western blot en las clonas obtenidas en la técnica de lipofectina.....	36
6.4 Efecto de la sobreexpresión de bcl-2 en las células CFSC-2G con respecto a:.....	38
6.4.1 Proliferación celular.....	38
6.4.2 Síntesis de ADN.....	38
6.4.3 Senescencia.....	38
6.5 Tratamiento agudo con H ₂ O ₂	39

7. Discusión.....	40
8. Conclusiones.....	49
9. Perspectivas.....	50
10. Referencias.....	51

RESUMEN

La fibrosis hepática es una enfermedad multifactorial causada por varios agentes tóxicos, se sabe que el estrés oxidativo es uno de los principales agentes que promueve la activación de las células estelares.

Estas células aumentan la producción de las proteínas que constituyen la matriz extracelular, como es el caso de colágena tipo I y III, dañando al hígado.

Por otro lado, la proteína Bcl-2 es una molécula de 26 KDa, que está relacionada con la supervivencia celular y la protección contra el estrés oxidativo. Así mismo se ha observado que en algunos tipos celulares al sobreexpresar a dicha proteína, se induce un proceso llamado senescencia replicativa. Durante la senescencia las células detienen su ciclo en la fase G0/G1, además presentan cambios tales como, la resistencia a estímulos apoptóticos, incremento en la cantidad de vacuolas pero permanecen metabólicamente activas.

De modo que el objetivo de este trabajo fue sobreexpresar a la proteína Bcl-2 en una línea de células estelares hepáticas con el fin de inducir la senescencia replicativa y así disminuir la proliferación celular, y por lo tanto la fibrosis.

Se utilizó la línea celular estelar hepática CFSC-2G, a la cual se le indujo la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 mediante la técnica de lipofección.

Se obtuvieron tres clonas que sobre-expresaron 2, 5 y 9 veces a la proteína Bcl-2 en relación con los controles. Esto se corroboró mediante un inmunoanálisis tipo Western blot.

Al mismo tiempo se obtuvo una línea que únicamente sobreexpresa a la proteína verde reportera, como control de transfección (GFP+).

Para evaluar los efectos de la sobreexpresión de Bcl-2 se utilizó la clona que sobreexpresa a la proteína en 9 Veces (Bcl-2+).

No se encontraron diferencias significativas encuanto a los resultados de la proliferación y la síntesis de ADN, como tampoco en el estudio en la actividad de la enzima β -galactosidasa, que es un marcador de células senescentes. Sin embargo se encontró un efecto de protección contra el estrés oxidativo cuando las células fueron tratadas con 300 μ M H₂O₂ por una hora. Obteniéndose una protección del 35.7 % en las células Bcl-2+ en comparación con las GFP+ y CFSC-2G. Como conclusión puede decirse que en este modelo la sobreexpresión de Bcl-2 no induce senescencia replicativa pero si protege a las células estelares del estrés oxidativo.

ABSTRACT

Liver fibrosis is a multifactorial disease caused by different toxic agents. It is known that oxidative stress is one of the main agents that promotes hepatic stellate cells activation. These cells increase the extracellular matrix proteins production, such as collagen type I and III, damaging the liver.

Bcl-2 is a 26 kDa protein that has been associated with cellular survival and protection against oxidative stress. It has been observed in several cell types Bcl-2 overexpression induces replicative senescence. During senescence, cells arrest their cell cycle in G0/G1 phase, they become resistant to apoptotic stimulus, they increase their vacuolar content, but they preserve an active metabolism.

The aim of this work was to overexpress Bcl-2 protein in a hepatic stellate cell line to induce replicative senescence and by this way diminish cellular proliferation and hepatic fibrosis.

The hepatic stellate cell line CFSC-2G was used, and Bcl-2 overexpression was done by the Lipofectin reagent. Three different clones were obtained that overexpressed Bcl-2 in 2, 5 and 9 times. The overexpression was corroborated by western blot analysis. At the same time another cell line, that overexpressed only the reporter green protein was obtained as a transfection control (GFP+). The clone that

overexpressed Bcl-2 nine times was used to evaluate the effects of Bcl-2 overexpression (Bcl-2+).

No significant differences were found in relation to proliferation and DNA synthesis, neither were found in the SA-beta-galactosidase assay, which is used as a senescent marker. However, a protection effect against oxidative stress was found when the cells were treated with 300 μ M H₂O₂. Bcl-2+ cells were found to survive 35.7% more than control cells (GFP+ and CFSC-2G).

The conclusion of this work is that in this particular model, Bcl-2 overexpression did not induce senescence but it protects against oxidative stress.

1. INTRODUCCIÒN

1.1 FIBROSIS HEPÁTICA

La fibrosis hepática es el resultado del depósito excesivo y desorganizado de una gran variedad de proteínas de matriz extracelular, como la colágena tipo I y III, así como de la pérdida de la homeostasis entre la producción y la degradación de las proteínas que constituyen a la matriz extracelular. La fibrosis hepática es una consecuencia frecuente en lesiones crónicas del hígado causadas por infecciones virales (hepatitis B y C), hepatitis autoinmune, hemocromatosis (Kmiec, 2001), por daño con tóxicos, como el abuso en la ingestión de bebidas alcohólicas, etc. (Schnabl *et al.*, 2003).

En la Figura 1 se representa un lóbulo hepático, que está formado por hepatocitos, los cuales ocupan un 80% del total del volumen del hígado y realizan la mayoría de las funciones de este órgano. También se observan las células no parenquimatosas hepáticas que contribuyen sólo con el 6.5% del volumen (Hernández, 2004), y el 13.5% restante son otros tipos celulares como las células dendríticas, las células de Kupffer, etc. Sin embargo, el 40% de todos los tipos celulares se encuentran localizados en el compartimiento sinusoidal o sinusoide. Las paredes del sinusoide del hígado se encuentran formadas por tres tipos celulares principalmente: las endoteliales, las de Kupffer y las estelares hepáticas,

conocidas anteriormente como células de Ito, lipocitos o células perisinusoidales (Kmiec, 2001).

1.2 CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS

Las células estelares hepáticas son de origen mesenquimal y se localizan en el espacio de Disse. En el hígado sano normalmente se encuentran en estado quiescente (Friedman, 2004). Su función principal es la de almacenar retinoides (Vitamina A) en el citoplasma, reteniendo el 80% del total de retinoides en el cuerpo (Senoo, 2004). Sin embargo, también se les ha relacionado de manera importante con el desarrollo de la fibrosis hepática (Arteel, 2003).

Cuando hay agentes que agraden al hígado, las células estelares hepáticas se activan (Gressner, 1995,1996; Friedman, 1996), y sufren una desdiferenciación. Se ha reportado que se presentan cambios en su fenotipo pasando a miofibroblastos, los cuales presentan contractilidad (Friedman, 2004), e incrementan aproximadamente en tres veces la síntesis de proteínas de matriz extracelular y en particular en 2.5 veces la síntesis de colágena. De esta manera, las células estelares hepáticas, se convierten en uno de los tipos celulares principales en la producción de colágena tipo I y III. Las células estelares activadas presentan una mayor proliferación y una respuesta a factores de crecimiento, como es el caso

del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), (Gressner, 1996). Cabe mencionar que se considera que una célula estelar activada no puede revertir a su estado original, por lo cual el daño puede progresar aun en ausencia del agente agresor (Dooley *et al.*, 2001). Sin embargo otros autores han reportado lo contrario, como es el caso del equipo de Abergel (2006) ya que reportó que el ácido palmítico en combinación con el retinol, inducen la desactivación de la células estelares hepáticas. Hay hormonas como la relaxina que revierte los marcadores de activación de las células estelares hepáticas (Bennett *et al.*, 2003).

Por otro lado, se sabe que el daño en el hígado puede ser agudo o crónico, dependiendo del agente agresor y del tiempo al que este expuesto. En el caso del daño agudo, las células estelares se activan, proliferan y tienden a migrar; se da la producción de proteínas de matriz extracelular, se lleva acabo la fibrólisis activando algunas proteinasas, dando como resultado la reparación del daño agudo en el tejido. Es en este caso cuando se ha reportado que las células estelares activadas, al terminar su función, mueren por apoptosis. Sin embargo, esto no ocurre cuando el daño es crónico, ya que las células estelares de igual manera se activan, proliferan, migran, pero nunca se presenta la señal para que las células mueran por apoptosis, mas bien reciben una autoestimulación

en la activación y en la producción de matriz extracelular por lo que se perpetúa el daño, dando como resultado una fibrosis o cirrosis hepática.

1.3 EXTRES OXIDATIVO EN EL HÍGADO

Uno de los factores que se asocian a la generación del daño crónico en el hígado es el estrés oxidativo. Este es un estado celular que se presenta cuando hay un desequilibrio entre las moléculas oxidantes y las moléculas antioxidantes. Dentro de las oxidantes se encuentran los radicales libres, que son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1994). La principal fuente generadora de radicales intracelulares es el metabolismo del oxígeno, ya que al recibir un electrón, éste da origen al radical superóxido (O_2^{\bullet}), el cual es producto de diferentes procesos fisiológicos. Entre los más importantes destacan la biotransformación de fármacos por la familia de los citocromos P450 (Hasler *et al.*, 1999), el metabolismo catalítico de los ácidos nucleicos y principalmente la cadena respiratoria mitocondrial (Turnes *et al.*, 1985). El radical O_2^{\bullet} puede aceptar un electrón más y formar el anión peróxido (O_2^{-2}), esta molécula, se protona dando lugar al H_2O_2 . El H_2O_2 no es propiamente un radical, pero puede llegar a tener un rompimiento homolítico del enlace O-O, dando origen al anión hidroxilo ($^{\ominus}OH$) y al radical libre hidroxilo ($^{\bullet}OH$). Esta reacción es catalizada por el hierro y el

cobre, y se conoce como la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1984). A todo este conjunto de moléculas se les denomina especies reactivas de oxígeno (ROS) y pueden reaccionar dañando a las biomoléculas celulares.

Se ha reportado que cuando el hígado se encuentra ante una agresión, como el estrés oxidativo, la hipoxia transitoria y los productos del metabolismo del etanol como el acetaldehído y las ROS como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se ve afectada de manera importante la función hepática, produciendo enfermedades tales como la fibrosis, por un mecanismo que aún se desconoce (Rojkind *et al.*, 2002).

Por otra parte, es de sumo interés hacer notar que una posible terapia para evitar la progresión del daño crónico hepático sería el poder contar con un mecanismo que evitara que las células estelares activadas siguieran proliferando y produciendo matriz extracelular, así como el poder controlar el estrés oxidativo. Una posibilidad sería induciendo senescencia replicativa en las células estelares activadas, ya que se evitaría que siguieran proliferando y produciendo matriz extracelular.

Otra posibilidad además del de inducir senescencia en las células estelares, es controlar la progresión del daño crónico, tratando de evitar el daño producido por el estrés oxidativo en las células estelares hepáticas.

1.4 CICLO CELULAR

El ciclo celular es el conjunto de eventos ordenados que culminan con la duplicación de la célula. Este se divide en dos periodos: la interfase y la mitosis. La interfase es una etapa de crecimiento en la cual la célula se prepara para duplicar su ADN, así como todos los componentes celulares; a su vez ésta se subdivide en 3 fases: la fase G1, en donde se acumula el ATP, se incrementa el tamaño de la célula y aumenta la síntesis de proteínas que serán requeridas en la siguiente fase. En la fase S, ocurre la replicación del ADN. En la fase G2, continúa la adquisición de ATP, se activa la síntesis de proteínas necesarias para la división y posteriormente durante la mitosis, que ya no es parte de la interfase, la célula se divide en dos.

La regulación del ciclo celular se da a varios niveles, uno de ellos depende de los puntos de control en los cuales la célula puede tomar la decisión de pasar de una fase a otra, detener o continuar el ciclo. La segunda forma de regulación del ciclo, es por medio de la presencia de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y su asociación con las ciclinas. En las transiciones que se dan de G1/S y G2/M se pueden presentar algunos inhibidores de CDK's, éstos pueden pertenecer a la familia de las ciclina-cinasas Cip-Kip (p21, p27, p57) o a la familia de las Ink4 (p16, p15, p18, p19) (Sherr y Roberts, 1995).

Los puntos de regulación son importantes para poder establecer que todo el ADN se ha replicado. En caso de que éste se encuentre dañado se puede posponer la división hasta que haya sido reparado, por ejemplo mediante la activación de la proteína p53 (Pearson *et al.*, 2000; Bond *et al.*, 1996). Además, existen otros mecanismos para prevenir la continuación de la replicación si hay problemas en la integridad del ADN, uno de ellos es un estado llamado senescencia replicativa (Toussaint *et al.*, 2000).

1.5 SENESCENCIA REPLICATIVA

Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hayflick y Moorehead (1961) en cultivos primarios de fibroblastos de pulmón. Ellos observaron que los cultivos primarios solo se dividían un determinado número de veces y luego dejaban de dividirse, pero no se morían, sino que se acumulaban. A partir de entonces, se han realizado estudios que sugieren que la senescencia es un mecanismo de supresión de tumores, así como un factor que contribuye al envejecimiento celular (Campisi, 2000). Las células senescentes tienen algunas características exclusivas: no proliferan en respuesta a estímulos mitogénicos y están detenidas en la fase G0/G1 del ciclo celular (Dimri *et al.*, 1994, 1996), son resistentes a estímulos apoptóticos y presentan cambios en su fenotipo, ya que se

distinguen como células grandes, aplanadas y con una gran cantidad de vacuolas. Así mismo, se ha reportado que presentan un incremento en la expresión de genes que detienen el ciclo celular, tales como p16 y p21 (Dulic *et al.*, 2000).

La senescencia entonces, puede verse como una respuesta celular al estrés, que limita la proliferación, así como el daño de las células (Campisi, 2001; Mathon y Lloyd, 2001). Además, se ha reportado un incremento en la actividad de la enzima beta-galactosidasa, y aunque no se sabe la implicación fisiológica de este evento, su acumulación se ha usado como un marcador enzimático de la senescencia celular (Sasaki *et al.*, 2005; Dimri, 1995).

No se sabe todavía como es que se detiene el ciclo celular, sin embargo, hay varias propuestas que tratan de explicar las causas por las cuales las células entran a la etapa de senescencia. Una de ellas está ligada al acortamiento progresivo de los telómeros después de divisiones celulares sucesivas (Schnabl *et al.*, 2003; Von Zgliniki, 2000). Sin embargo, esta idea con el tiempo ha ido perdiendo fuerza, ya que se ha logrado inducir la senescencia celular sin el acortamiento de los telómeros (Bree *et al.*, 2002).

Se sabe que el estrés oxidativo es la pérdida del equilibrio entre los antioxidantes y los oxidantes, encontrándose en mayor cantidad los

agentes oxidantes (Rikans y Hornbrook, 1997), de modo que se ha propuesto que el estrés podría promover la interrupción del ciclo celular, ya sea por el daño a nivel del ADN o por otros mecanismos. Este fenómeno se ha denominado senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) (Chen *et al.*, 2000; Bladier *et al.*, 1997). El mecanismo por el cual se induce la senescencia podría ser vía el aumento de algunos inhibidores de ciclo celular y proteínas supresoras de tumores (Pearson *et al.*, 2000).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que al sobreexpresar a la proteína Bcl-2 en fibroblastos de pulmón de ratón, se induce la senescencia (López-Díazguerrero *et al.*, 2006). El grupo de trabajo de Bonnefoy-Berard (2004) también encontró que al sobreexpresar a Bcl-2 en la línea celular BAF3 de murino, en ausencia de interleucina 3 (IL-3), se detiene el ciclo celular en la fase G1. También se ha reportado que al sobreexpresar Bcl-2 en una línea celular de carcinoma de pulmón, H1299, se logró inducir una detención permanente en el ciclo celular con características de senescencia prematura (Crescenzi *et al.*, 2003). Tang y su grupo de trabajo (2005) sugieren que al dar un pretratamiento a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno, protegen a las células PC12 contra la apoptosis, ya que se incrementan los niveles de las especies reactivas de oxígeno y se promueve la sobreexpresión de Bcl-2.

1.6 LA PROTEÍNA Bcl-2

La proteína Bcl-2 se descubrió en linfomas de células B en folículos de ganglios humanos, en la translocación inter cromosomal t(14;18), por lo que se determinó como el proto-oncogene *bcl-2* (McDonnell *et al.*, 1989). Bcl-2 tiene una masa molecular de 26 kDa. Su extremo carboxilo terminal es hidrofóbico, lo que le permite estar anclada en las membranas del núcleo, del retículo endoplásmico y de la mitocondria (Bakhshi *et al.*, 1985). Además su orientación es hacia el lado citosólico (Hockenbery, 1993). Es una proteína relacionada con la supervivencia celular y es la representante de alrededor de 20 miembros de esta familia en células de mamífero. Los miembros de la familia están agrupados en proteínas antiapoptóticas (como es el caso de Bcl-2 y Bcl-xL con 4 dominios) y proteínas proapoptóticas (como Bax y Bid con 1 a 3 dominios) (Adams y Cory, 1998). A pesar de que *bcl-2* se caracterizó en un principio como un oncogen, no estimula la proliferación, pues se ha visto que retrasa la entrada al ciclo celular (Winter *et al.*, 1998). El mecanismo molecular por el cual la proteína Bcl-2 altera el ciclo celular se desconoce, sin embargo, se ha reportado que tanto la inhibición de la apoptosis, como el efecto antiproliferativo, pueden tener mecanismos diferentes (Huang *et al.*, 1997). Así mismo, se ha relacionado a esta proteína con la protección

contra el estrés oxidativo (Hockenbery *et al.*, 1993) y la regulación del ciclo celular (Vairo *et al.*, 2000).

Esto es muy importante, ya que el inducir la senescencia prematura sobreexpresando Bcl-2, puede ser una alternativa para poder evitar que las células estelares hepáticas proliferen y produzcan colágena, así como poder llevar a cabo el control del daño generado por el estrés oxidativo evitando así, la fibrosis hepática.

2. JUSTIFICACIÓN

En México, las enfermedades hepáticas son la segunda causa de muerte en individuos con edades entre 15-64 años y en el caso de 65 años en adelante, la quinta causa de muerte (Salud pública de México, 2005). La enfermedad hepática alcohólica está caracterizada por diferentes fases, que van desde el hígado graso o esteatosis, pasando por fibrosis y pueden llegar a cirrosis. Sin embargo, hasta la fecha no hay una terapia adecuada para la reversión de esta enfermedad.

Como se mencionó antes, las células estelares hepáticas juegan un papel muy importante en el desarrollo de la fibrosis hepática, al ser activadas por diversos estímulos entre los que destaca el estrés oxidativo. Es por ello, que en los últimos años se han buscado mecanismos mediante los cuales estas células activadas disminuyan su capacidad proliferativa y de síntesis de proteínas de matriz extracelular. Una posibilidad sería inducir la senescencia en las células estelares activadas, para mantenerlas vivas y cumpliendo su función principal almacenando retinoides, pero que dejen de dividirse y de producir matriz extracelular.

Por todas estas circunstancias es importante que se continúe con las investigaciones, con el fin de tener un mayor conocimiento de la fibrosis hepática y lograr avances en el tratamiento para esta enfermedad.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en una línea de células estelares hepáticas induce la senescencia celular y protege contra el estrés oxidativo.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Obtener una línea de células estelares hepáticas que sobreexpresen a la proteína Bcl-2.

- ❖ Corroborar si las células transfectadas sobreexpresan a la proteína Bcl-2.

- ❖ Determinar el efecto de la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 sobre la tasa de proliferación celular, la síntesis de ADN, la inducción de la senescencia y verificar si se presenta la protección contra el estrés oxidativo agudo.

4. HIPÓTESIS

Bcl-2 es una proteína multifuncional, relacionada con la supervivencia, regulación del ciclo celular y protección contra estrés oxidativo en cultivo primario, se esperaría que su sobreexpresión en las células estelares hepáticas indujera una disminución, tanto en la proliferación, como en la síntesis de ADN, así como un aumento en el número de células senescentes, y una protección ante un estrés oxidativo agudo.

5. METODOLOGIA

En todos los experimentos de este trabajo se utilizó la línea de células estelares hepáticas CFSC-2G, obtenida de hígado de rata cirrótica. Esta fue aislada y amablemente donada por el Dr. Marcos Rojkind de la Escuela de Medicina de la Universidad George Washington. Esta línea celular representa un modelo de células estelares recién aisladas que en el segundo pasaje después de descongeladas adquieren el fenotipo de células estelares activada (Greenwel *et al.*1991). El presente trabajo se realizará con células de más de dos pasajes para tener el fenotipo activado.

5.1 CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea de células estelares hepáticas CFSC-2G, que se mantuvo en Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 mg/mL) y 1% de aminoácidos no esenciales (Microlab) (MEM completo). Las células se mantuvieron en incubación a 37° C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, se les cambió el medio cada tercer día.

Para obtener las partículas virales se utilizó la línea 293T, que se mantuvo en Medio Esencial Mínimo Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), penicilina

(100 U/mL), estreptomina (100 mg/mL) (DMEM completo). Las células se mantuvieron en incubación a 37° C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, se les cambió el medio cada tercer día.

5.2 SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-2.

Para lograr la introducción de la secuencia de un gen a una célula, con el objeto de incrementar la proteína de interés en al menos el doble de los niveles basales de la misma, existen distintos tipos de manipulaciones.

Por lo tanto la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en células estelares hepáticas se buscó mediante diversas técnicas. La primera fue por infección retroviral, para lo cual, primero se tuvieron que producir las partículas virales que contuvieran al transgen con la información de *bcl-2*. Para generar las partículas virales, se emplearon dos tipos de plásmidos: unos que contenían la información referente a la cápside del virus y otros con la información de la proteína de interés, que se inserta dentro de dicha cápside. Ambos plásmidos se cotransfectaron en las células que generaron a las partículas virales denominadas células empaquetadoras (células 293T). Se emplearon los plásmidos pCL-Eco con la información de la cápside del virus y el plásmido pCL-*gfpN-hbcl-2*, con la secuencia de la proteína Bcl-2, así como la de la proteína verde reportera (GFP) y

resistencia a la geneticina. Como un control de la infección se utilizó al plásmido pCL-*gfpN*, ya que este último no contiene la información del gene *bcl-2* sino sólo de *gfp*. Estos dos últimos plásmidos fueron contruidos por el Dr. Luís Covarrubias y por la Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo del Instituto de Biotecnología, UNAM (Cárdenas-Aguayo *et al.*, 2003).

5.2.1 COTRANSFECCIÓN DE CÉLULAS 293T POR EL MÉTODO DE FOSFATO DE CALCIO

Un día antes de llevar a cabo la cotransfección, se sembraron las células 293T a una densidad de 200×10^3 células por pozo en las placas de 6 pozos (Corning, Inc). Al día siguiente, 3 h antes de cotransfectar, se les cambió el medio sin antibiótico (DMEM + 10% SFB). Una hora antes de que hubieran transcurrido las 3h, se preparó la solución de contransfección usando el sistema comercial "Calcium Phosphate Transfection System "(GIBCO BLR): se prepararon por separado el contenido de los tubos 1 que eran los que contenían los fosfatos y por otro lado los tubos número 2 con el ADN plasmídico y el calcio.

Tubos 1: solución HSB 1x. Se preparó junto el volumen para todos los pozos a transfectar, incluido el control, y se consideró 100 μ l de esta solución para cada pozo. Al tubo 1 se le agregaron 88.5 μ l de agua de

transfección, 10 μ l de HSB 10 X, 1.5 μ L NaOH (vórtex) y 2 μ l de solución de fosfatos (vórtex), por pozo a transfectar. Posteriormente se separaron los tubos 1 para cada pozo.

Tubos 2: se les añadió por pozo: 85.8 μ L de agua de transfección, 0.1 μ L de ADN acarreador, 5 ng de ADN plasmídico pCL-*gfpN-hbcl-2* o pCL-*gfpN* y 5 ng de ADN plasmídico pCL-Eco. Posteriormente se les añadió 5 μ L (por pozo) de solución de calcio y se resuspendió suavemente. Se le agregaron otros 10 μ L de solución de calcio y se resuspendió. Mientras se burbujeaba el tubo 1 con una pipeta Pasteur conectada al pipeteador y se fue agregando el contenido del tubo 2 al tubo 1, esto se realizó muy lentamente. Se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 20 min y se agregó esta mezcla a los pozos con las células 293T. A las 24 h se les cambió el medio con DMEM completo. A las 48 h se recolectaron las partículas virales.

5.2.2 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CFSC-2G MEDIANTE LA TÉCNICA DE INFECCIÓN RETROVIRAL

Se infectaron los cultivos de células estelares hepáticas con una concentración 1:1 de partículas y medio nuevo, con el mínimo volumen necesario para cubrir todo el pozo. Se utilizaron placas de 6 pozos (Corning, Inc) con 500×10^3 células CFSC-2G. Antes de agregar el medio

con partículas se les agregó 500 μ l de medio (MEM completo) más Polybrene (Sigma) a cada pozo. El Polybrene se usó a una concentración de 2 μ L/mL de medio. A las 24 h se le cambió el medio por medio nuevo (MEM completo). Para saber si la infección fue eficiente se realizó un análisis con un citómetro de flujo con el programa Cell Quest para determinar la fluorescencia emitida por la proteína GFP.

5.2.3 TRANSFECCIÓN POR FOSFATO DE CALCIO EN LAS CÉLULAS CFSC-2G

La transfección se llevó a cabo en placas de 6 pozos (Corning, Inc) con una densidad de 500×10^3 células estelares hepáticas CFSC-2G por pozo. Los plásmidos que se utilizaron en la transfección fueron pCL-*gfpN-Hbcl-2* para las células que sobreexpresarán Bcl-2 y pCL-*gfpN* como control de la infección. La técnica se realizó de la misma manera descrita en el apartado 5.2.1.

5.2.4 TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CFSC-2G POR DEAE DEXTRAN

Un día antes de llevar a cabo la transfección, se sembraron las células CFSC-2G a una densidad de 500×10^3 células por pozo en las placas de 6 pozos (Corning, Inc). Al día siguiente se realizó una mezcla

de transfección (1 mL de DMEM (GIBCO) sin suero, 10 μ L de cloroquina (10mM), 2 μ g de DNA plasmídico pCL-*gfpN-Hbcl-2* para las células que sobreexpresaran Bcl-2 o pCL-*gfpN* para las células de control de la transfección, 20 μ l DEAE Dextran. Las células se lavaron 2 veces con PBS, se retiró el PBS y se les agregó la mezcla de transfección. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron durante 2 h, a 37° C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Después de transcurrido el tiempo se les cambió el medio con MEM completo.

5.2.5 TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CFSC-2G POR LIPOFECCIÓN

Un día antes de llevar a cabo la transfección, se sembraron las células CFSC-2G a una densidad de 200 x 10³ células por pozo en las placas de 6 pozos (Corning, Inc). Se realizó la transfección utilizando 2 μ g para cada plásmido pCL-*gfpN-Hbcl-2* o pCL-*gfpN* diluido en 100 μ L de Opti-MEM sin suero, etiquetado en el tubo 1, mientras que en el tubo 2 se le agregó 10 μ L de lipofectina (Invitrogen) en 100 μ L de Opti-MEM y se dejó reposar 30 min a TA. Pasado ese tiempo se mezclaron los tubos (1 y 2) suavemente en el tubo 3 y se dejaron 15 min a TA. Por otra parte se lavaron las células 1 vez con MEM sin suero y otra vez con Opti-MEM. Al tubo 3 se le adicionaron 800 μ L de Opti-MEM suavemente. Se les quitó

el Opti-MEM y se les adicionó la mezcla del tubo 3 y se dejaron incubando 24 h a 37° C, con 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Al día siguiente se les cambió el medio a MEM completo.

5.2.6 SELECCIÓN CON EL ANTIBIÓTICO

Como los plásmidos confieren resistencia frente a un antibiótico determinado, para seleccionar las clonas celulares de expresión estable y no transitoria, se retan con geneticina (SIGMA) el antibiótico de resistencia y se obtienen las células que han adquirido el plásmido. Para ello primero se realizó una curva para conocer la dosis necesaria (concentraciones 500, 600, 700, 800, 1000 µg/mL). Se sembraron las células CFSC-2G a una densidad de 42×10^3 células por pozo en las placas de 4 pozos (Corning, Inc), en 1 mL de MEM completo por cada concentración de geneticina y se fueron determinando durante 3 días continuos. De acuerdo a los resultados se eligió la concentración de 1000 µg/mL para seleccionar a las células transfectadas.

5.2.7 EFICIENCIA DE LA TRANSFECCIÓN EN LAS CÉLULAS CFSC-2G

Se llevó a cabo usando un citómetro de flujo marca FAC SCAN con el programa Cell Quest, y se verificó la intensidad media de fluorescencia

de la proteína GFP (525-530 nm). Cabe aclarar que el análisis de fluorescencia con el citómetro se realizó para las células manipuladas con todas las técnicas de transfección.

5.2.8 CLONACIÓN DE COLONIAS Y EXPANSIÓN CELULAR EN LAS CÉLULAS CFSC-2G

Las células que resultaron de la transfección por lipofección (única técnica que resultó ser exitosa), se sembraron a una densidad de 1×10^3 células en cajas de Petri 10 cm. Las células formaron colonias dispersas a partir de la duplicación de una misma célula. Estas colonias posteriormente se clonaron para ello se requirió utilizar arillos de clonación (pipetas Pasteur cortadas a 1 cm de altura) y grasa de silicón.

Se marcaron las colonias formadas con un marcador indeleble por la parte exterior de la caja Petri. Posteriormente los arillos de clonación se pegaron con la grasa de silicón, de modo que al despegar la colonia con tripsina-verseno 0.1 % no se mezclaran unas con otras. Finalmente se expandieron las colonias obtenidas hasta tener suficientes células para realizar el análisis de Western Blot.

5.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS PARA EL WESTERN BLOT

Cuatro días antes de llevar a cabo la extracción de las proteínas se sembraron 1×10^3 células en placas de 6 pozos (Corning, Inc). Para llevar a cabo la extracción se lavaron muy bien las células con PBS antes de agregarles 50 μ l de solución de lisis (solución de lisis: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO_3 , 1 mM aprotinina, 5 mM PMSF y 1 μ g/mL leupeptina). Posteriormente se incubaron en frío por 5 min y se despegaron con un gendarme de goma. Se centrifugaron a 24,000 g por 15 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en donde se encontraba la proteína total y se guardó a – 20 °C.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Las proteína totales se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Como curva patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma).

Se tomaron 2 μ L de la proteína total extraída, y se colocaron en tubos de ensayo con 800 μ L de agua destilada cada uno. Se agregaron 200 μ L de reactivo de Bradford (BIO RAD) a cada tubo y se mezcló cada uno utilizando un vórtex.

Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro a 595 nm y se determinó la concentración de proteína para cada caso usando la curva patrón.

5.5 WESTERN BLOT DE LAS COLONIAS CELULARES

5.5.1 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS TOTALES EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Para el corrimiento de las proteínas totales se prepararon 10 mL del gel de separación al 13 % (3.35 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 100 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, 4 mL de acrilamida/bis 30%, 50 μ L de persulfato de amonio 10%, 5 μ L de N,N,N',N'-tetrametiletilendmina (TEMED) y 10 mL del gel concentrador al 4% (6.1 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 100 mL de SDS 10%, 1.3 mL de bis-acrilamida al 30%, 50 μ L de persulfato de amonio al 10%, 10 μ L de TEMED). Se utilizó una cámara de electroforesis vertical (BIO RAD).

En tubos Eppendorf se colocaron 10 μ g de las proteínas totales de cada muestra, en un volumen final de 40 μ L con buffer 4X (2-mercaptoetanol, SDS, azul de bromofenol y glicerol) y agua destilada.

Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 5 min para relajar la estructura secundaria de las proteínas. Posteriormente, el marcador de

bajo peso molecular y las muestras de las proteínas totales se colocaron en los carriles del gel.

Para el corrimiento electroforético se utilizó un buffer de corrida (Tris 0.25, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). El corrimiento se realizó con un voltaje de 80 V durante 30 min y 100 V 2 h.

5.5.2 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS TOTALES A LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA.

Transcurrido el tiempo de corrimiento, se identificó el rango de la posición de la proteína Bcl-2 que correspondía a 26 KDa.

El gel de acrilamida se dividió en dos secciones. Se utilizó el gel que contenía la proteína Bcl-2. Se colocó cuidadosamente con pinzas entre papel filtro y la membrana de nitrocelulosa (BIO RAD), y sobre ésta otras 2 capas de papel filtro, todos cortados exactamente del mismo tamaño, formando un emparedado. El emparedado se colocó sobre la placa de la cámara de transferencia que contenía buffer de transferencia frío (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.05%, Metanol 20% y tween 20 1X). La transferencia se realizó con un voltaje de 100 mV durante toda la noche.

5.5.3 ANTICUERPO PRIMARIO, SECUNDARIO Y REVELADO.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 60 min a TA con TBS-tween (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, tween 200.1%, pH 7.5) + 5% de leche descremada. Después de este tiempo, se lavó 2 veces con TBS-tween.

La membrana se colocó en una solución que contenía el anticuerpo primario α -Bcl-2 (Neomarker) en TBS-tween durante 2 h a TA y en agitación ligera. El anticuerpo primario se utilizó a una dilución 1:1000.

La membrana se lavó durante 5 min con TBS-tween 3 veces. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario α -Mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) en TBS-tween, durante 1 h a TA y en agitación. El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución de 1:10000. Se lavó la membrana durante 5 min con TBS-tween 2 veces y 3 veces con TBS solo. Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 2 μ L de luminol Super Signal West Pico y 2 μ L de peróxido Super Signal West Pico Stable.

El revelado se realizó en el cuarto oscuro. Para tal efecto, se utilizó la película para diagnóstico Kodak, la cual se veló por la fluorescencia generada en la reacción de la peroxidasa, indicando la presencia de la Bcl-2.

5.6 SEMBRADO DE CÉLULAS PARA LAS DETERMINACIONES DE PROLIFERACIÓN, SINTESIS DE ADN Y SENESCENCIA.

En todos los experimentos que se describen a continuación se utilizaron los tres tipos celulares: células control a las CFSC-2G, a las células control de la transfección que sobreexpresan GFP (GFP+) y a las células que sobreexpresan a la proteína Bcl-2 en 9 veces (Bcl-2+).

Para los ensayos de proliferación celular, síntesis de ADN y ensayo SA- β -galactosidasa (SA- β -Gal) para senescencia, se sembraron en placas de 24 pozos (Corning, Inc) a una densidad aproximadamente 1×10^4 células por pozo. En este momento se sembraron 15 pozos por cada tipo de célula y por cada tipo de determinación, es decir 45 pozos para CFSC-2G, GFP+ y Bcl-2+. Esto para poder realizar las 3 determinaciones por triplicado diariamente durante 5 días.

5.7 TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación se determinó contando todas las células vivas en los pozos a lo largo del tiempo. Las células se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina-verseno 0.1%. Se tomó una alícuota de 20 μ L de suspensión celular y se le agregó 20 μ L de azul de tripano. Después se homogenizó, y se tomaron 10 μ L de esta suspensión y se contaron las células utilizando un hemocitómetro y un microscopio de contraste de

fase. Se contaron 3 campos por determinación. Las determinaciones se llevaron a cabo durante 5 días continuos.

5.8 NIVELES DE SÍNTESIS DE ADN

Para la incorporación de timidina tritiada se utilizó una alícuota de 1 $\mu\text{Ci/mL}$ MEM [^3H]-T (NEN, USA), que se agregó a los pozos después de que las células fueron lavadas con PBS. Las células se incubaron a 37° C por 4 h para permitir que la timidina fuera incorporada. Después se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 0.5 mL de solución de metanol 95% PBS por 15 min. Se retiró el metanol y las células se lavaron con PBS dos o tres veces más. Posteriormente se le agregó 500 μL de NaOH 0.2N por pozo para hidrolizar el ADN, y se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se trasladó el contenido de cada pozo a un vial que contenía 5 mL de líquido de centelleo (PACKARD). La radiactividad se cuantificó con un contador de centelleo (Beckman LS 6500).

5.9 SENESCENCIA (SA- β -GAL)

Se realizó la tinción según la técnica de Dimri (Dimri *et al.*, 1995). Se retiró el medio de las células, se les agregaron 500 μL de solución fijadora (PIPES 1.0 M, pH 6.9; 2% de paraformaldhehído; MgCl_2 2 mM y

EGTA 1.25 mM pH 8.0) y se dejaron incubar durante 1 h a 37° C. Posteriormente se retiró la solución fijadora y se realizaron tres lavados con PBS. Inmediatamente se les agregó 300 μ L de solución de X-gal (5mM de $K_3Fe(CN)_6$, 5mM de $K_3Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 2 mM $MgCl_2$ y 1 mg/mL de X-gal (PROMEGA) el pH se ajustó a 6.0) y se incubaron las células hasta el día siguiente. La cuantificación se realizó determinando el número de células teñidas consideradas positivas a la tinción de β -Gal y sin teñir por pozo, usando un microscopio de contraste de fases modelo Axiovert 40 CFL contando 100 células por pozo.

5.10 TRATAMIENTO AGUDO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se sembraron las células CFSC-2G, Bcl-2+ y GFP+ a una densidad de 50×10^3 células por pozo en las placas de 24 pozos (Corning, Inc), en 1mL de MEM completo. Al día siguiente se cambió el medio por MEM sin suero y sin antibiótico. Al siguiente día se realizó el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de 300 μ M durante 1 h. Posteriormente se contaron las células con azul de tripano como se describió en el apartado 6.7.

5.11 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los ensayos de proliferación celular, síntesis de ADN y el ensayo SA- β -gal se realizaron por triplicado en 3 experimentos independientes. Mientras que el experimento con tratamiento agudo de H₂O₂ se realizó por duplicado en 4 experimentos independientes. Para analizar los datos se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA seguida por Tukey con una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 CURVA PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE GENETICINA EN LA SELECCIÓN CELULAR

En la Figura 2 se grafica el número de células contadas por día sin tratamiento y se observa que hay un crecimiento continuo. Sin embargo, en los resultados con las células que fueron tratadas con 1000 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina, se observa que a partir del segundo día hasta el cuarto día, hay disminución del 20, 50 y 80 % respectivamente. No se presentan los resultados obtenidos con las concentraciones menores porque no se encontró muerte celular a tiempos cortos. Por lo que la concentración de geneticina que se utilizó fue de 1 mg/mL.

6.2 EFICIENCIA DE LA TRANSFECCIÓN EN LAS CÉLULAS CFSC-2G

Se muestran dos histogramas representativos de los análisis por citometría de flujo en donde se verificó la eficiencia de la transfección con las distintas técnicas usadas. El eje de las "x" representa la intensidad de fluorescencia (IF). La IF basal (M1) y el incremento en la IF debido a la presencia de GFP (M2) y el eje de la "y" representa el número de eventos. La IF es el resultado del porcentaje de eventos determinados por la medición de la fluorescencia emitida.

En la figura 2 se observa el histograma que representa a las células Bcl-2+ transfectadas por DEAE Dextran. En donde el incremento en la IF producido por la GFP después de la transfección en la región M2 es de 2.02. En el caso del histograma que representa a las células Bcl-2+ por la técnica de lipofección, se muestra que el incremento en la IF producido por GFP después de la transfección en la región M2 es de 525.4. Esto nos permite comparar los valores de IF en la región M2 entre los tipos celulares, en este caso el valor de IF en la región M2 para las células Bcl-2+ transfectadas por lipofección se considera bajo pero aceptable, mientras que el valor de IF en M2 para las células Bcl-2+ transfectadas por DEAE Dextran no se acepta.

Como se aprecia en la tabla 1, con las técnicas de infección retroviral, fosfato de calcio y DEAE Dextran, no se obtuvieron células que hubieran incorporado al plásmido con la proteína verde GFP, ya que la IF es sumamente baja. Mientras que aparentemente si se logró en las células transfectadas con la técnica de lipofección.

Por lo que se siguió trabajando únicamente con las células transfectadas por la técnica de lipofección.

6.3 WESTERN BLOT EN LAS CLONAS OBTENIDAS EN LA TÉCNICA DE LIPOFECTINA

En el inmunoanálisis que se presenta en la figura 4, se muestran los geles correspondientes al Western blot realizados para las distintas clonas obtenidas. Las bandas que se aprecian se refieren a la proteína constitutiva, que en este caso fue actina, y a la proteína Bcl-2.

En el gel **A**, en el carril de la izquierda a derecha, se aprecia el control positivo L929ELkneoE.1 (CP), control CFSC-2G, 3 clonas diferentes de células GFP+ (1cl, 3cl, 1). Luego 4 clonas de Bcl-2+ (1cl, 1, 2 y 3). En la parte inferior de este mismo gel se muestran las densitometrías que se obtuvieron al normalizar con respecto a la actina. Aquí se observa que se obtuvieron dos clonas de la línea CFSC-2G que sobreexpresan a la proteína Bcl-2 en 9.21 y 2.0 veces respectivamente (carriles 6 y 9).

Para el gel **B** se observa en el carril de la izquierda a derecha, se aprecia, el control positivo L929ELkneoE.1 (CP), control CFSC-2G, clonas 2 ,3 ,10 y 11 de GFP+ y 4,7 y 10 de Bcl-2+. Se observa que solo la clona 10 de Bcl-2+ del último carril sobreexpresa a la proteína Bcl-2 en 5 veces.

6.4 EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE Bcl-2 EN LAS CÉLULAS CFSC-2G CON RESPECTO A:

6.4.1 PROLIFERACIÓN CELULAR

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos sobre proliferación celular. Se graficó el número de células en función del día de cultivo. Se observa que hay una tendencia a incrementarse el número de células hasta el día 5, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tres tipos celulares.

6.4.2 SÍNTESIS DE ADN

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos sobre la síntesis de ADN. Se graficó el número de cuentas por minuto obtenidas en función de los días de cultivo del experimento. Se observa claramente que hasta el día 5 hay un incremento continuo en la incorporación de timidina, pero no se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar los tres tipos de células.

6.4.3 SENESCENCIA

En la figura 7 se muestran las imágenes de las células que fueron tratadas con la técnica SA- β Gal. Las imágenes A (CFSC-2G), B (GFP+) y C (Bcl-2+) corresponden a las células estelares. En las fotografías no se

observan células teñidas en ningún tipo celular. En la imagen D se presenta, a manera de control positivo, una muestra de fibroblastos primarios de pulmón de ratón teñidos con la técnica SA- β -Gal, en los cuales si se observan células teñidas de color azul, lo cual nos indica que son positivas a la tinción de β -galactosidasa y por lo tanto son células senescentes.

6.5 TRATAMIENTO AGUDO CON H₂O₂

En la figura 8 se presentan los resultados obtenidos al tratar a las células con H₂O₂. Se observa que las células transfectadas con la técnica lipofectina, que sobreexpresan a la proteína Bcl-2. Las células Bcl-2+ presentan una protección estadísticamente significativa ya que se encontró que hay 35.7% más de células vivas en comparación con las células control CFSC-2G y GFP+.

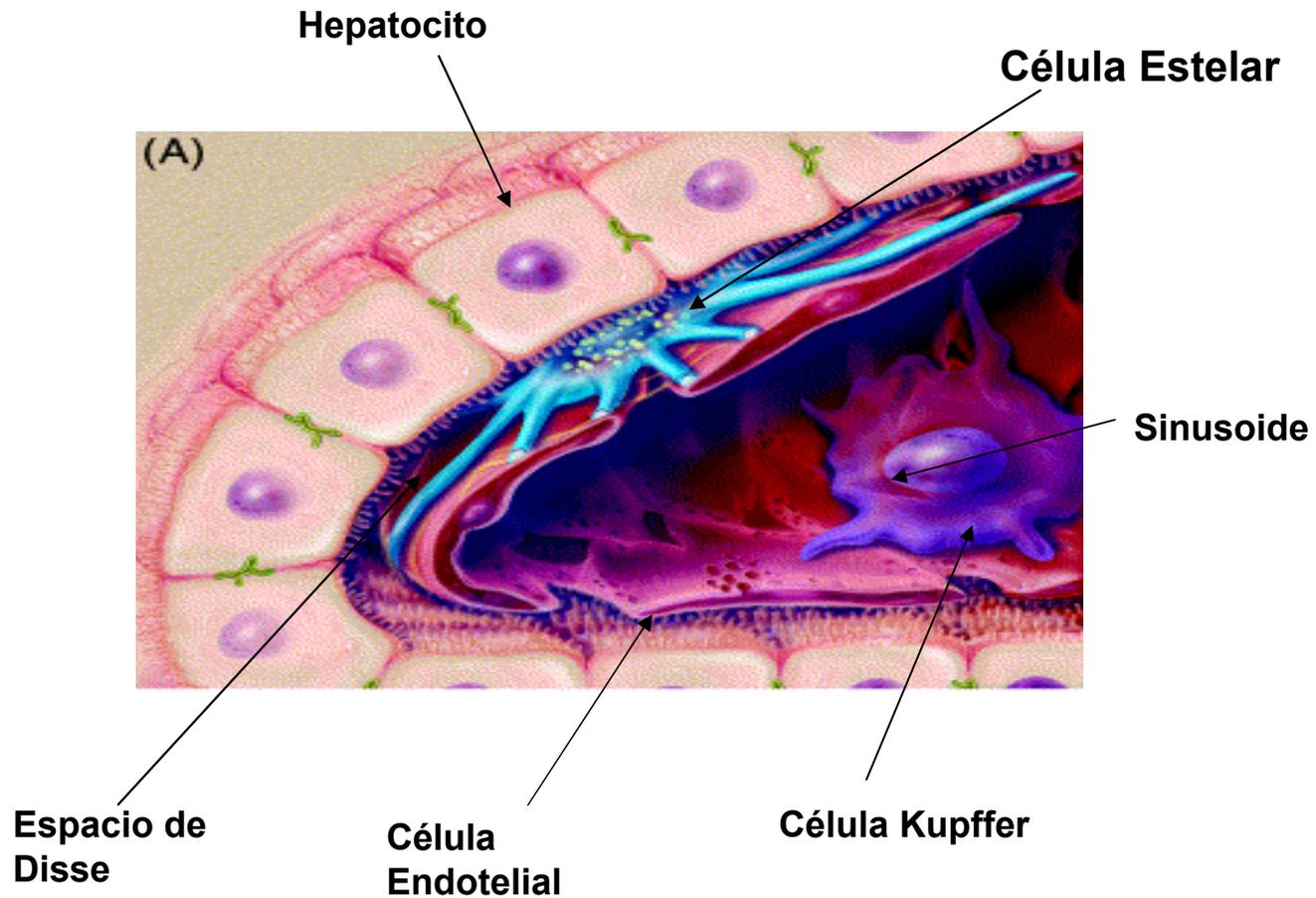


Figura 1. Esquema de un lóbulo hepático en donde se observan los tipos celulares: hepatocitos, en el sinusoides las células endoteliales, células de Kupffer, y las células estelares en el espacio de Disse.

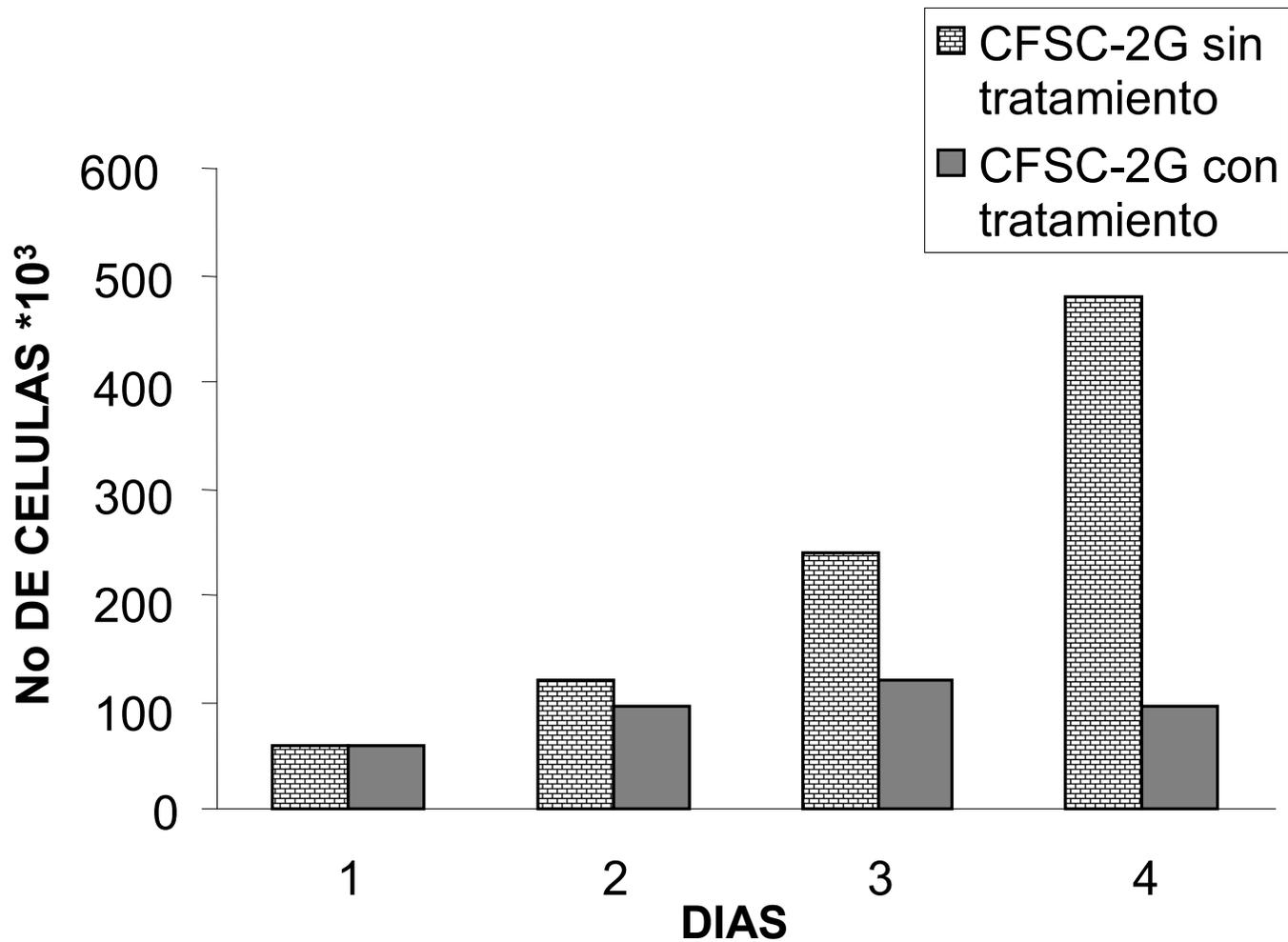


Figura 2. Células estelares hepáticas CFSC-2G tratadas con 1 mg/mL de geneticina durante 4 días. Las barras cuadriculadas representan a las células sin tratamiento y las barras lisas a las células tratadas. Los datos son el promedio de un experimento por triplicado.

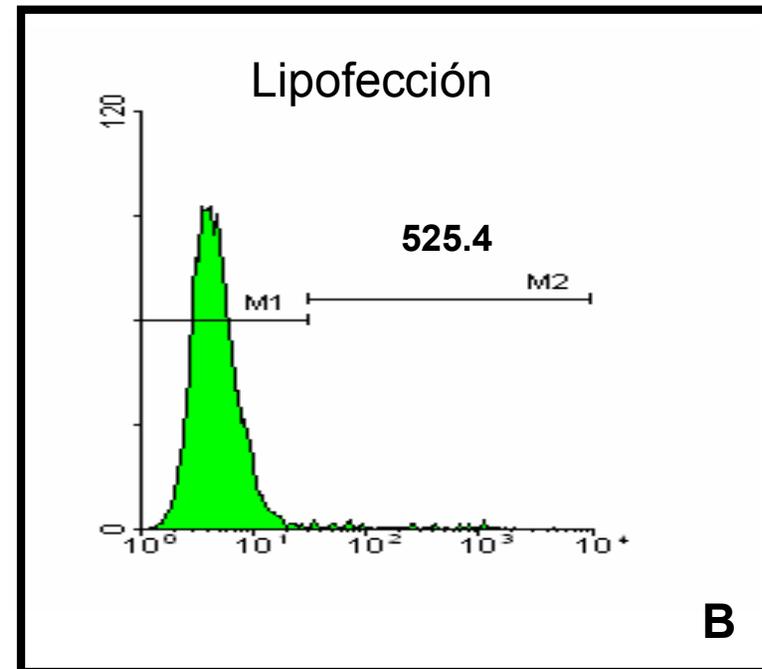
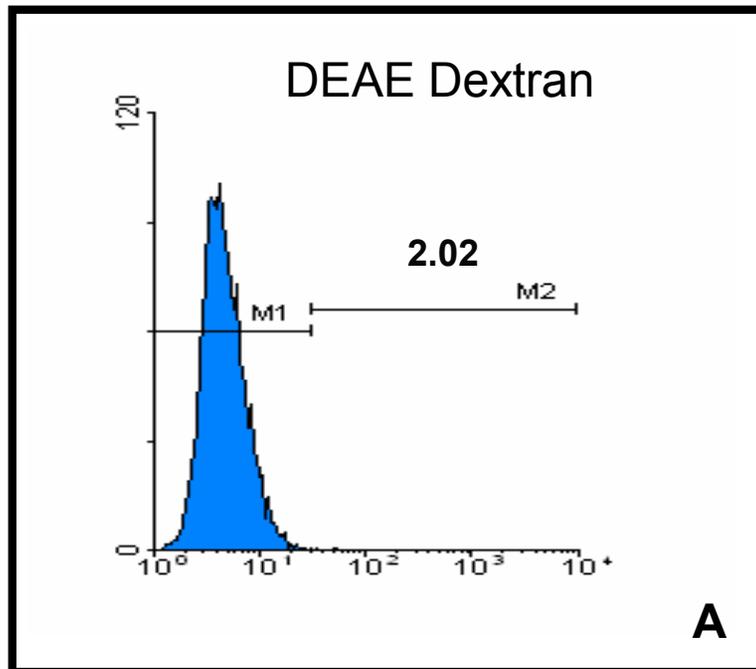


Figura 3. Eficiencia de transfección determinada por citometría de flujo midiendo la IF de GFP en las células Bcl-2+.

A) Representación de un histograma de las células Bcl-2+ transfectadas mediante la técnica DEAE Dextran.

B) Representación de un histograma de células Bcl-2+ transfectadas por lipofección.

IF (M2)			
TÉCNICA	CFSC-2G	GFP+	Bcl-2+
Infección retroviral	36.27	56.28	88.61
Fosfato de calcio	18.44	8.05	4.53
DEAE Dextran	18.44	2.23	2.02
Lipofección	18.44	672.81	525.45

Tabla 1. Eficiencia de la transfección determinada por citometría de flujo, midiendo la media de IF emitida por la proteína GFP en las células control CFSC-2G, GFP+ y Bcl-2+, según las diferentes técnicas

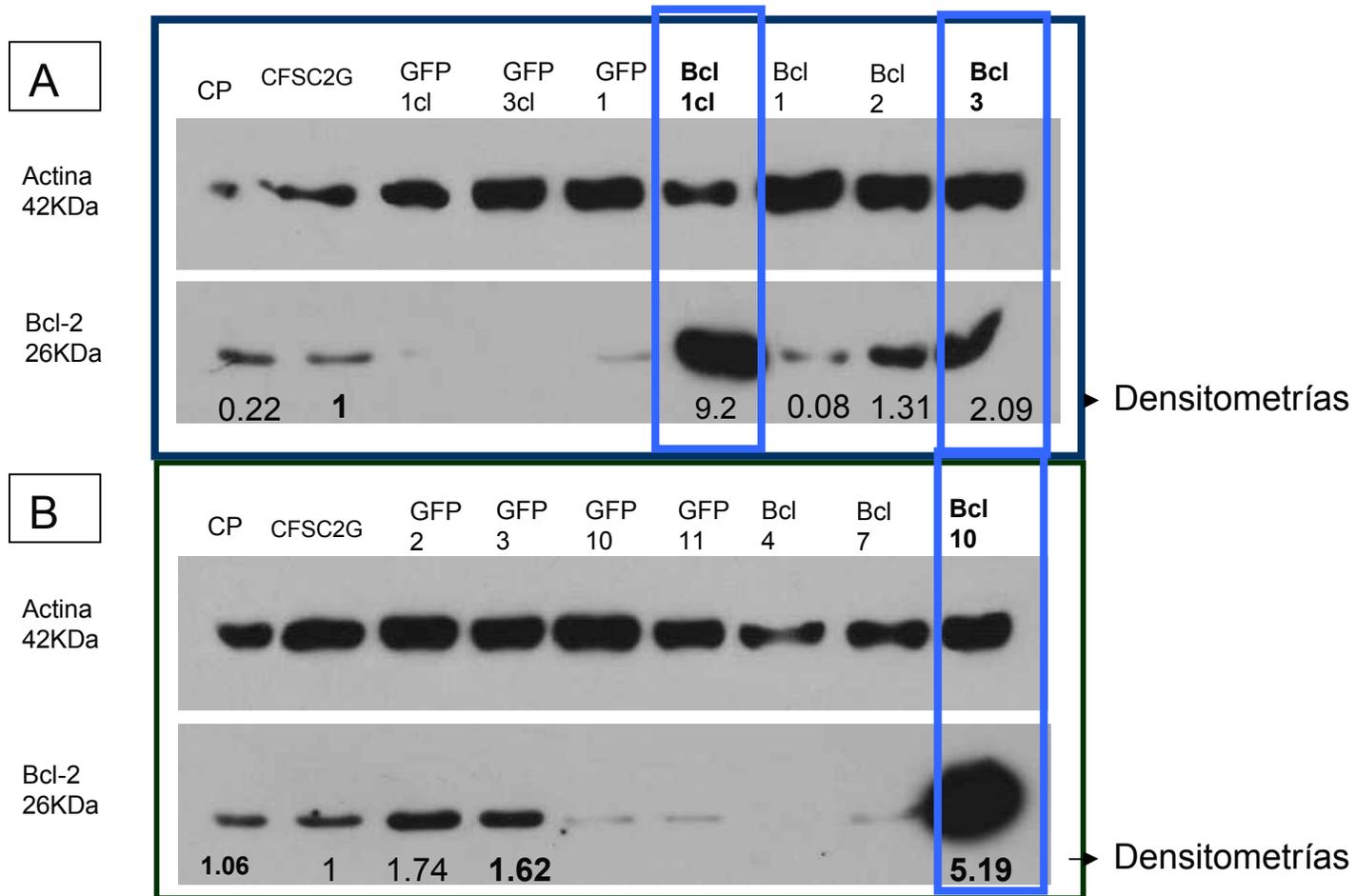


Figura 4. Inmunoanálisis tipo Western blot.

En el texto se indican las distintas clonas que aparecen en los paneles A y B

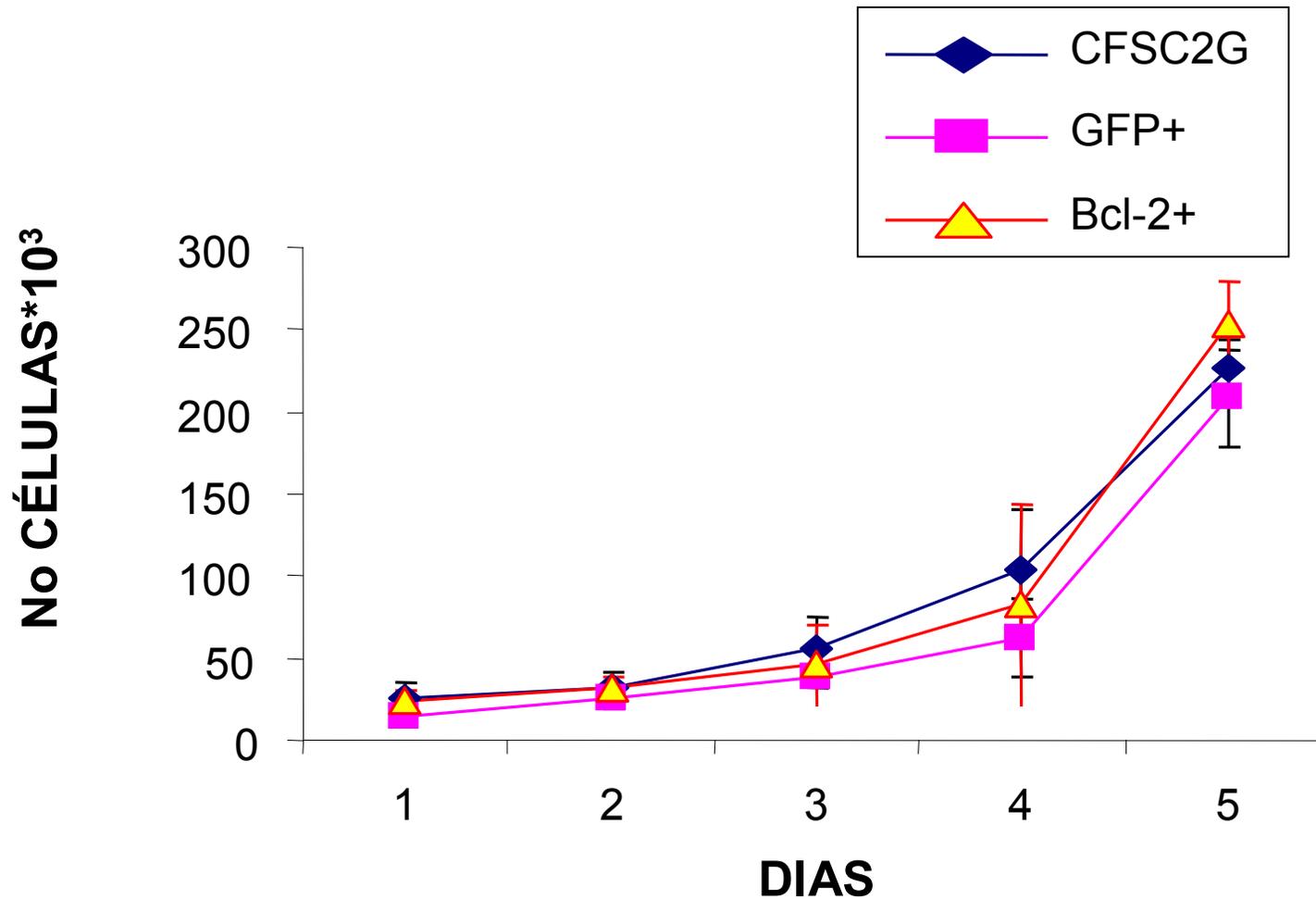


Figura 5. Tasa de proliferación celular de las células estelares hepáticas CFSC-2G, GFP+ y Bcl-2+. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar. Las determinaciones se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes

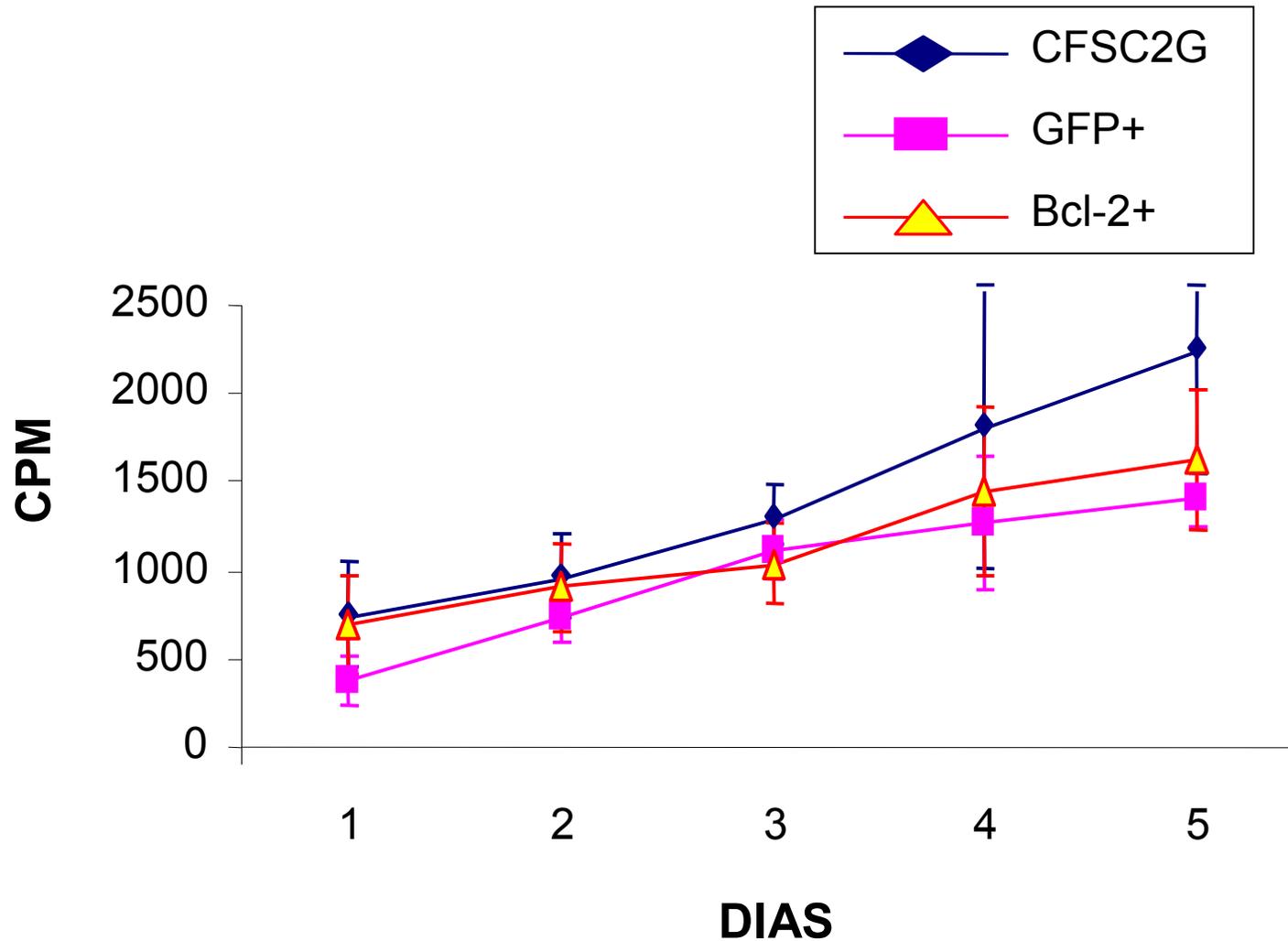


Figura 6. Síntesis de ADN en células estelares hepáticas, determinada por la incorporación de timidina tritiada en los diferentes tipos celulares CFSC-2G, GFP+ y Bcl-2+. Se muestran los valores promedio con su desviación estándar. Las determinaciones se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

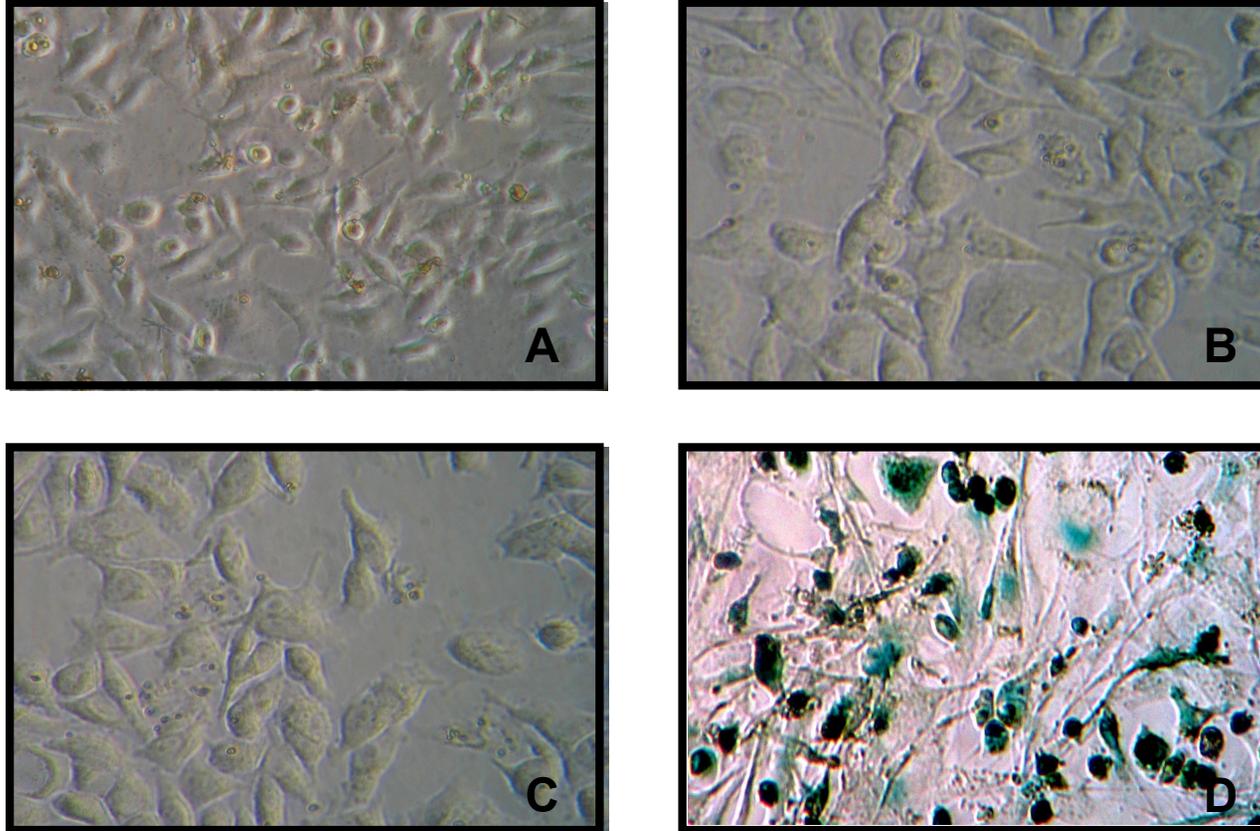


Figura 7. Tinción de β -galactosidasa asociada a la senescencia en las células estelares hepáticas

A) CFSC-2G 100X,

B) GFP+, 200X,

C) Bcl-2+ 200X,

D) Control positivo: Células de fibroblasto de pulmón de ratón, 200x.

Las determinaciones se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

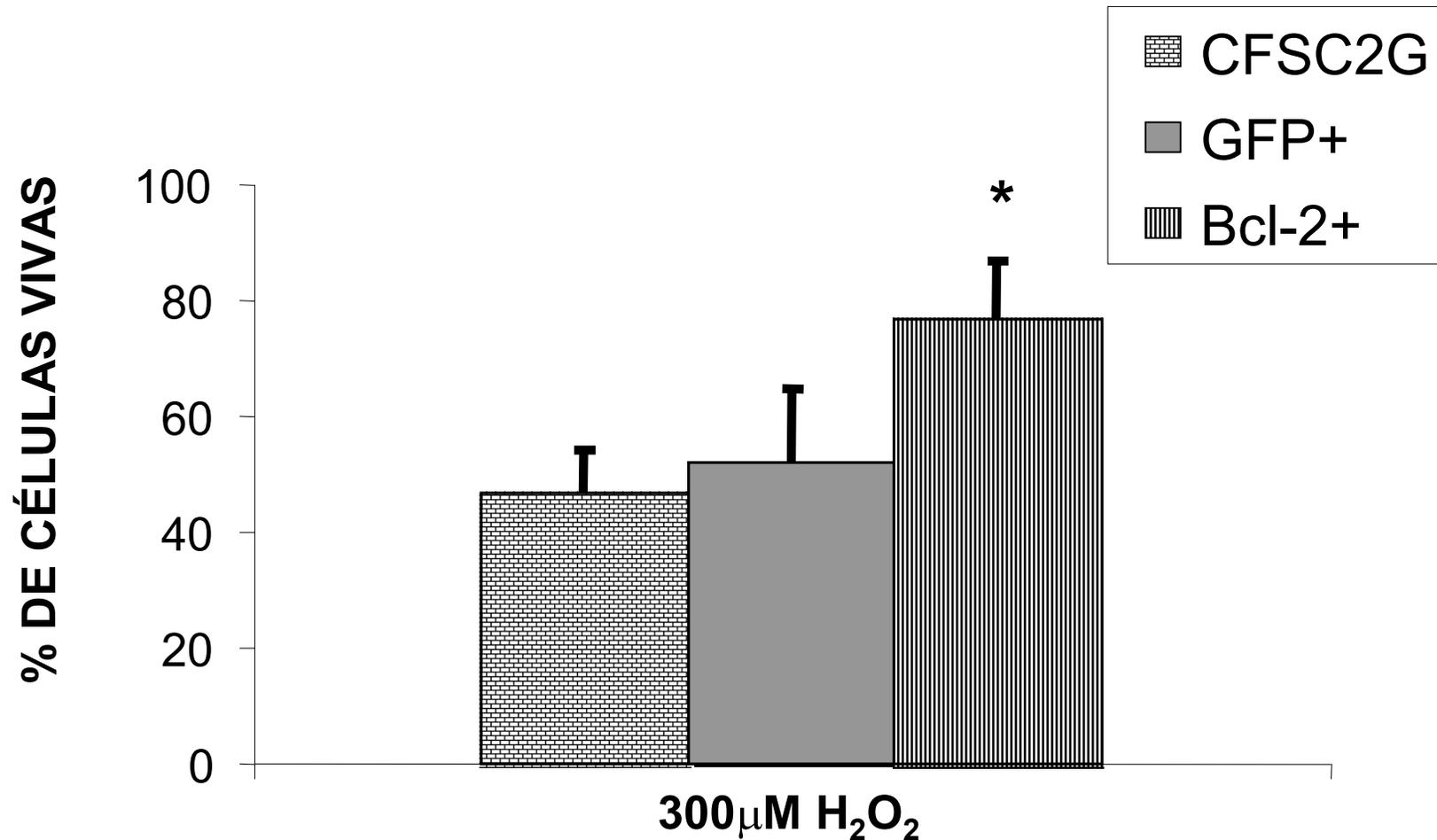


Figura 8. Células estelares hepáticas tratadas con 300 μM de H₂O₂ durante 1 h. Las barras cuadriculadas (▤) representan a las células CFSC-2G, las lisas (■) a las células GFP+ y las rayadas (▨) a las Bcl-2+ . Los datos son el promedio ± su desviación estándar, de cuatro experimentos independientes por duplicado * p<0.05.

7. DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue determinar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en una línea de células estelares hepáticas, induce la senescencia celular y protege contra el estrés oxidativo. Ya que se sabe que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos por los cuales se activan a las células estelares, generando así a la fibrosis hepática.

Para el estudio de los fenómenos relacionados con la fibrosis hepática a nivel celular y/o molecular existen diversos modelos que pueden ser utilizados. Es común que los experimentos se lleven a cabo en cultivos primarios, ya que se asemejan mas a lo que estaría ocurriendo realmente *in vivo*. Sin embargo, para nuestro estudio, este modelo no era el mas adecuado, ya que los cultivos primarios tienen una vida finita y entran en una etapa que se conoce como senescencia replicativa en un tiempo relativamente corto, dependiendo del tipo y la especie que se trate (Hayflick y Morread, 1961), por lo que una alternativa ideal para nuestro caso particular, fue utilizar una línea celular, ya que ésta permite mantener controladas una gran cantidad de variables, tener unos cultivos homogéneos, así como estudiar un fenómeno de manera particular.

Para poder cumplir con el objetivo planteado referente a determinar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 lograba inducir la senescencia celular en una línea de células estelares hepáticas, utilizamos la línea

celular CFSC-2G donada por el Dr. Rojkind, la cual fue extraída de ratas cirróticas. Dicha línea celular es un modelo que presenta ciertas ventajas como el hecho de que la tasa de crecimiento es rápida, las células mantienen la viabilidad en un periodo ilimitado, el rendimiento del cultivo es alto, se tiene la homogeneidad y caracterización en el cultivo, etc.

Sin embargo, el paso limitante para poder realizar el presente proyecto fue obtener la línea de células estelares que sobreexpresaran a la proteína Bcl-2.

Para seleccionar a las células que hubiesen incorporado al plásmido con el ADN complementario de Bcl-2 se empleó el antibiótico geneticina, por lo que previamente, se realizó un curva de geneticina para conocer la concentración necesaria para seleccionar a las células que hubieran adquirido al plásmido, teniendo así clonas celulares con una expresión de la proteína estable. La concentración de geneticina que se normalmente se emplea en la selección celular va de 100 a 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ o mas, esto varía dependiendo del tipo celular. En los datos reportados por el equipo de Crescenzi (2003) se utilizó una concentración entre 400 y 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de geneticina para seleccionar células transfectadas en la línea celular HEC1B y H1299, que son células de de carcinoma endometrial y pulmonar humanos respectivamente. Mientras que para

nuestros resultados en la línea CFSC-2G de hígado de rata, la concentración óptima fue de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Se utilizaron varias técnicas de transfección hasta lograr obtener la sobreexpresión exitosa de Bcl-2. En primera instancia, se utilizó la técnica de infección retroviral, y aunque los resultados obtenidos en la citometría de flujo indicaron que había un cierto grado de infección, las células morían en la etapa de la selección celular con la geneticina. Esto se explica ya que probablemente las células no hubieran incorporado a su genoma la información correspondiente a la proteína Bcl-2. Dicha información podría haberse mantenido solo en los plásmidos pero al ir proliferando, con cada duplicación celular la concentración de los plásmidos se iba diluyendo. De modo que al paso del tiempo las células morían al ser retadas con la geneticina.

Por lo tanto se requirió la utilización de otras técnicas de transfección. Se probaron las técnicas de Fosfato de Calcio y DEAE Dextran, sin obtener resultados positivos ya que como se muestra en la tabla 1, los valores obtenidos para la IF de M2 fueron muy bajos en comparación con las células control CFSC-2G, por lo que se descartó la posibilidad de obtener la sobreexpresión por estas técnicas. Finalmente se empleó la técnica de lípidos catiónicos con lipofectina, ya que al corroborar la eficiencia de transfección por citometría de flujo los

resultados obtenidos para la IF de M2 fueron elevados en comparación con las otras técnicas, por lo que se procedió a realizar la selección celular con la geneticina. Esta técnica permitió la obtención de tres clonas que sobreexpresaron a la proteína Bcl-2. Lo cual se confirmó mediante un ensayo inmunoanálisis Western blot. Se obtuvieron tres clonas que sobreexpresaban a la proteína Bcl-2 en 2, 5 y 9 veces respectivamente. Para los siguientes experimentos de este trabajo se utilizaron las células que sobreexpresaron 9 veces a la proteína.

Como el objetivo de este trabajo fue el determinar los efectos de sobreexpresar a la proteína Bcl-2 en la línea celular hepática, se realizaron ensayos para evaluar la proliferación celular, la síntesis de ADN y determinar así mismo el número de células senescentes.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la proliferación celular e incorporación de la timidina tritiada a lo largo 5 días continuos, denotaron que las células control CFSC-2G presentaban un crecimiento constante, pero no se encontró ninguna diferencia estadística significativa al compararlas con las células Bcl-2+ y GFP+.

Con respecto a los resultados del ensayo SA- β -Gal, no se presentó ninguna diferencia en los tres tipos celulares (Bcl-2 +, GFP+ y CFSC-2G) ya que no se tiñeron con el reactivo de X-gal, además la línea Bcl-2+ continuó proliferando desde que se llevo a cabo la transfección, hasta

varios meses después. Esto nos permitió deducir que las células no se encontraban en etapa senescente, ya que se ha reportado que las células senescentes, presentan una interrupción irreversible del ciclo celular en la fase G0/G1 y no responden a estímulos mitogénicos (Campisi 1997).

A pesar de que se ha reportado que en las células humanas como de ratones, que el fenotipo senescente es dominante sobre el fenotipo presenescente o inmortal (Wang, 1995). Es decir que sí se presenta la acumulación de células senescentes puede alterar el entorno en el que se sitúan y estos cambios, a la larga, pueden ser más importantes que la incapacidad para proliferar (Wang, 1995). Además se sabe que la proteína Bcl-2 tiene una participación en la regulación del ciclo celular relacionando el incremento en los niveles de p27 (inhibidor de CDKs), y de p130 que pertenece a la familia de pRb. Cuando aumenta p130, se une a E2F4, impidiendo que se lleve a cabo la transcripción de E2F1 necesaria para la progresión del ciclo celular (Vairo *et al.*, 2000).

Por otro lado, el equipo de Crescenzi (2003) reportó que la expresión constitutiva de la proteína Bcl-2 en una línea celular de carcinoma de endometrio humano, inducía la detención del ciclo en la fase G1 del ciclo celular de manera irreversible. En este caso, las células adquirieron un fenotipo senescente con características morfológicas alteradas y un aumento en la actividad de β -galactosidasa. Sin embargo

en este trabajo no se encontró efecto de Bcl-2 sobre la proliferación, la síntesis de ADN, ni en la senescencia.

En este punto es posible sugerir varias hipótesis explicando por que la sobreexpresión de Bcl-2 no retrasó el ciclo celular, ni indujo senescencia en las células CFSC-2G, una de ellas pudiera ser por el tipo de células que se utilizaron. La línea CFSC-2G fue modificada al ser extraída de ratas que tenían cirrosis hepática y posteriormente immortalizadas. Se sabe que para que un cultivo primario se immortalice y se convierta en línea celular, se deben producir una serie de mutaciones sobre genes que regulan el ciclo celular. Un ejemplo claro de ellos, es que se da un incremento de la expresión de proteínas que favorecen la proliferación celular, como la ciclina D1 y se disminuyen algunas proteínas que detienen el ciclo, como podrían ser los inhibidores de las CDK, y supresores de tumores pRb, p53 (Chen *et al.*, 2001). Por lo que es posible que en la línea CFSC-2G se encuentren elevados los niveles de la ciclina D1, lo cual haría difícil la detención del ciclo celular.

Por otro lado pudiera ser que esta línea celular CFSC-2G tuviera incrementada la actividad de la enzima telomerasa. Se sabe que las células immortalizadas tienen elevados los niveles de ésta enzima que podría elongar los telómeros y mantener la capacidad proliferativa, y por tanto evitar la disminución en la proliferación (Steinert *et al.*, 2000). Se

han reportado bajos niveles en la actividad de la enzima telomerasa en el hígado normal (Park *et al.*, 1998). Sin embargo se sabe que la telomerasa puede llegar a ser activada in las enfermedades crónicas de hígado.

Otro punto importante que debe discutirse, es el papel antioxidante de la proteína Bcl-2 ya que, se ha reportado que la sobreexpresión de Bcl-2 protege contra la muerte por estrés oxidativo a las células FL5.12, línea celular murina dependiente de interleucina 3, además de mantener niveles bajos de fragmentación del ADN, así como una disminución en las especies reactivas de oxígeno (Hockenbery *et al.*, 1993).

Por otro lado el hecho de que Bcl-2 posee un papel protector ante el estrés oxidativo, este fenómeno sería una nueva alternativa por la cual se pudiera evitar la progresión de la fibrosis hepática ya que se sabe que el estrés oxidativo está relacionado con el fenómeno, debido a que el estrés oxidativo es uno de los principales agentes que promueve la activación de la células estelares hepáticas (Rojkind *et al.*, 2002). Por esa razón, se evaluó si la sobreexpresión de Bcl-2 lograba proteger contra el estrés oxidativo generado por una dosis aguda de H₂O₂. Los resultados denotaron que la sobreexpresión de Bcl-2 protege en un 35.7% contra el estrés oxidativo en comparación con lo que se observó para las células GFP+ y CFSC-2G. Estos datos corroboran algunos reportes en donde el demuestra que Bcl-2 puede activar mecanismos

antioxidantes, posiblemente induciendo la síntesis de glutatión reducido (Lee *et al.*, 2001). Así mismo se sabe que la proteína Bcl-2 incrementa la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) (Hildeman *et al.*, 2003), y también disminuye la oxidación de los lípidos (Hockenbery *et al.*, 1993).

Lo anterior apoya los reportes donde se menciona que la proteína Bcl-2 promueve la supervivencia celular. Asimismo, es bien sabido que las células que sobreexpresan Bcl-2 no son susceptibles a la muerte por apoptosis, lo cual pone a esta proteína en un lugar difícil en cuanto a la supervivencia celular, ya que al ser una proteína de supervivencia, protege a las células de la muerte aun y cuando existan daños, que en condiciones de no haber un exceso de Bcl-2, inducirían muerte por apoptosis. Se ha reportado que las células con cáncer que sobreexpresan a Bcl-2 no son susceptibles a los tratamientos que promueven la apoptosis, sin embargo se ha reportado (Novo *et al.*, 2006) que al silenciar a Bcl-2 si se logra inducir dicha muerte. Así mismo, este grupo ha reportado resultados al parecer contradictorios con otros artículos de la literatura donde encuentran que las células estelares senescentes presentan una expresión disminuida de la proteína Bcl-2 y por lo tanto no son resistentes a estímulos apoptóticos (Novo *et al.*, 2006).

Bcl-2 es una proteína que se ha relacionado la senescencia celular, regula el ciclo celular, es antiapoptótica, y que protege contra el estrés oxidativo. Por lo que pudiera pensarse que la proteína Bcl-2 es una molécula que lleva acabo diversas funciones que están relacionadas con la supervivencia celular. Ya que responde al estrés oxidativo protegiendo y evitando los daños producidos por el peróxido de hidrógeno en las células Bcl-2+. Aun se desconocen los mecanismos por los que se lleva a cabo esta protección. Nuestros resultados obtenidos con el tratamiento agudo demuestran que la proteína Bcl-2 pudiera actuar de manera importante en la preservación de la supervivencia celular. De modo que sería interesante que posteriormente se realicen algunos experimentos relacionados con la cantidad de antioxidantes, con el estado redox, medir la cantidad de daño producido por el estrés oxidativo en las células que sobreexpresan a la proteína Bcl-2, para que nos permita entender el mecanismo de regulación por el que se rige esta proteína y seguir proponiendo alternativas para el mejoramiento de la medicina.

8. CONCLUSIONES

La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en células CFSC2G

- ♣ No indujo una disminución estadísticamente significativa con respecto a la tasa de proliferación celular en comparación con las células GFP+ y CFSC-2G.
- ♣ No mostró una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la síntesis de ADN comparando a las células Bcl-2 + con las células GFP+ y CFSC-2G.
- ♣ No se encontró una tinción positiva a la enzima β -galactosidasa en las células Bcl-2+, lo cual indica que no se indujo la senescencia replicativa en ninguno de los tres tipos celulares estudiados.
- ♣ Presentó una protección a las células contra el estrés oxidativo agudo, encontrándose una protección del 35.7% en comparación con los controles (GFP+ y CFSC-2G).

9. PERSPECTIVAS

- ♣ Para tratar de explicar por que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en la línea CFSC-2G no retrasa el ciclo celular ni induce la senescencia, sería interesante que se realizaran experimentos en los cuales se evalúen los niveles de algunas proteínas que regulan la progresión del ciclo celular como la ciclina D1.
- ♣ También sería prudente medir los niveles de actividad de la enzima telomerasa, ya que se ha visto que las células inmortalizadas tienen incrementados los niveles en la actividad de esta enzima.
- ♣ Sería interesante realizar experimentos relacionados con la cantidad de antioxidantes, el estado redox, y medir la cantidad de daño producido por el estrés oxidativo.

10 . REFERENCIAS

- ❖ Abergel, A. Sapin, V. Chassard, C. Darcha, C. Marcand-Sauvant, J. Gaillard-Martinie, B. Rock, E. Dechelotte, P. Sauvant, P. Dig Dis Sci. 2006; 51: 986-995.
- ❖ Adams, J., M., Cory, S. The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival. Science. 1998; 281:1322-1326.
- ❖ Arteel, G. Oxidants and Antioxidants in Alcohol-Induced Liver Disease. Gastroenterology. 2003; 124: 778-790.
- ❖ Bakhshi, A., Jensen, J., Goldman, P., Wright, J., McBride, O., Epstein, A., Korsmeyer, S. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14:18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell. 1985; 41: 899-906.
- ❖ Bennett, R. Kharbanda, K. K. Tuma, D. J. Biochim Phal. 2003; 66: 867-874.
- ❖ Bladier, C., Wolvetang, E., L., Hutchinson, P., Haan, L., B., Kola, I. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-Like growth arrest or apoptosis?. Cell Growth Differ. 1997; 8: 589-598.
- ❖ Bond, J., Haughton, M., Blades, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., Willie, F. Evidence that transcriptional activation by p53 plays a

direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene*. 1996; 13: 2097-2104.

- ❖ Bonneyfoy-Berard, N., Aouacheria, A., Verschelde, C., Quemeneur, L., Marcais, A., Marvel, J. Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1644: 159-168.
- ❖ Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.
- ❖ Bree, R., T., Stenson-Cox, C., Grealy, M., Byrnes, L., Gorman, A., M., Samali, A. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontol*. 2002; 3:195-206.
- ❖ Campisi, J. Cellular senescence. *Exp gerontol*. 1997,31 (1-2):7-12.
- ❖ Campisi, J. Cancer, ageing and cellular senescence. *In vivo*. 2000; 14: 183-188.
- ❖ Campisi, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*. 2001; 11: 27-31.
- ❖ Cárdenas-Aguayo, M., C., Santa-Olalla, J., Baizabal, J., M., Salgado, L., M., Covarrubias, L. Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl-2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hemato Stem Cell Res*. 2003; 12:735-748.

- ❖ Chen, Q. M., Liu, J., Merrett, J. B. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem J.* 2000; 347: 543-551.
- ❖ Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S., Linskens, M. H. K. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2001; 265: 294-303
- ❖ Crescenzi, E., Palumbo, G., Brandy, H. J. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J.* 2003; 375: 263-274.
- ❖ Dimri, G. P., Hara, E., Campisi, J. Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts. *J Biol. Chem.* 1994; 269: 16180-16186.
- ❖ Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl. Acad. Sci USA.* 1995; 92: 9363-9367.

- ❖ Dimri, G., P., Testori, A., Acosta, M., Campisi, J. Replicative senescence, ageing and growth-regulatory transcription factors. *Biol. Signals*. 1996; 5: 154-162.
- ❖ Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México, 2005. *Salud Pública de México*. 2005; 47:104-110.
- ❖ Dooley, S., Streckert, M., Delvoux, B., Gressner, A., M. Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283: 554-562.
- ❖ Dulic V, Beney G., E.,Frebourg, G., Drullinger, L., F., Stein, G., H. Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:6741-6754.
- ❖ Friedman, S., L. Hepatic stellate cells. *Progress Liver Dis*.1996; 14: 101-130.
- ❖ Friedman, S., L. Stellare cells: A moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatol*. 2004; 40: 1041-1043.
- ❖ Greenwel, P., Schwartz, M., Rosas, M., Peyrol, S., Grimaud, J. A., Rojkind, M. Characterization of fat-storing cell lines derived from

normal and CCl₄-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest.* 1991; 65: 644-53.

- ❖ Gressner, A., M. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol.* 1995; 22: 228-236.
- ❖ Gressner, A., M. Transdiferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblast: A key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney International.* 1996; 49: 39-45.
- ❖ Halliwell B., Gutteridge M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219:1-14.
- ❖ Hasler J., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman N., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck R., Farrell G., Kaminsky L., Spivac S., Boitier E., Beaune P. Human cytochromes P450. *Mol. Aspects, Med.* 1999; 20:1-137.
- ❖ Hayflick, L., Morread, P., S. The serial cultivation of human diluid stains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585-621.
- ❖ Hernández, E. Activación de las células estelares y su importancia en la fibrosis hepática. *Rev. de Ciencias clínicas.* 2004; 5: 39-47.
- ❖ Hildeman D.A., Mitchell T., Aronov B., Wojciechowsky S., Kappler J., Marrack P. Control of Bcl-2 Expression by reactive oxygen species. *Proc. Nat. Aspects.* 2003; 100: 15035-15040.

- ❖ Hockenbery, D., M., Oltavi, Z., Ying, X., Milliman, C., Korsmeyer, S. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993; 75:241-251.
- ❖ Huang, D., O'Reilly, L., Strasser, A., Cory, S. The antiapoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J*. 1997; 16: 4628-4638.
- ❖ Kmiec, Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2001; 161: 1-151.
- ❖ Lee, M., Hyun, D.H., Marshall, K.A., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Jenner, P., Halliwell, B. Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defences, and the proteasome. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31:1550-9.
- ❖ Lin, H., M., Lee, Y., J., Li, G., Pestell, Kim, H., R., C. Bcl-2 induce cyclin D1 promoter activity in human breast epithelial cells independent of cell anchorage. 2001; 8: 44-50.
- ❖ López-Dzguerrero, N. E., López-Araiza, H., Conde-Pérezprina, J. C., Buzio, L., Cárdenas, Aguayo M.C., Ventura, J.L., Covarrubias, L., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Zentella, A., Konigsberg, M. Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Rad Biol Med*. 2006; 40: 1161-1169.

- ❖ Mandal, M., Kumar, R. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem.* 1997; 30: 14783-7.
- ❖ Mathon, N. F., Lloyd, A. C. Cell senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2001; 1: 203-213.
- ❖ McDonnell, T., Deane, N., Platt, F., Nunez, G., Jeager, U., McKearn, J., Korsmeyer, S. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell.* 1989; 57:79-88.
- ❖
- ❖ Park Y.M., Choi, J. Y. Byun, B.H. Telomerase is strongly activated in hepatocellular carcinoma but not chronic hepatitis and cirrhosis. *Exp Mol Med.*1998; 30:35-40.
- ❖ Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cione, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P., P., Pelicci, P., G. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic. *Rev. Nature* 2000; 406: 207-210.
- ❖ Rikans, L.E., Hornbrook, K. R. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. 1997; 1362: 116-127.

- ❖ Rojkind M., Dominguez-Rosales J.A., Nieto N., Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *CMLS, Cel Mol .Life Sci.* 2002; 59: 001-20.
- ❖ Sasaki, M, Ikekda, H, Hironori, H, Manabe, T, Nakanuma Y. Frequent cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role in bile duct loss. *J. Pathol.* 2005; 205: 451-459.
- ❖ Schnabl, B., Purbeck, C., Hwang Choi, Y., Hagedorn, C., Brenner, D. Replicative Senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology.* 2003; 37:653-664.
- ❖ Senoo, H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.* 2004; 37: 3-15.
- ❖ Sherr, C., Roberts, J. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinase. *Gene Rev* 1995; 9:11-49
- ❖ Steinert, S., Shay, J., Wright, W. Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res.* 2000; 273:1095-1098.
- ❖ Tang, X. Q., Feng, J. Q., Chen, J., Chen, P. X., Zhi, J. L., Cui, Y., Guo, R. X., Yu, H. M. Protection of oxidative preconditioning

against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: Mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res.* 2005; 1057: 57-64.

- ❖ Toussaint, O., Medrano, E., von Zeglinicki, T. Cellular and molecular mechanisms of stress- induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, 2000; 35: 927-945.
- ❖ Turnes J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 237:408-414.
- ❖ Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E., Koff, A., Adams, J.M. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol*, 2000; 20: 4745-53.
- ❖ Von Zglinicki, T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann NY Acad A Sci USA.* 2000; 908: 99-110.
- ❖ Winter, J.N., Andersen, J., Reed, J.C., Krajewski, S., Variakojis, D., Bauer, K.D., Fisher, R.I., Gordon, L.I., Oken, M.M., Jiang, S., Jeffries, D., Domer, P. Bcl-2 expression correlates with lower proliferative activity in the intermedte- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas: an Eastern Cooperative Oncology Group

and Southwest Oncology Group cooperative laboratory study.

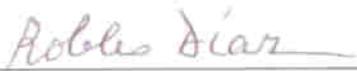
Blood.1998; 91: 1391-1398.

- ❖ Yu B.P., Yang R. Critical evaluation of the free radical theory of aging: A proposal for the oxidative stress hypothesis. Ann N.Y.Acad.Sci . 1996; 786:1-11.

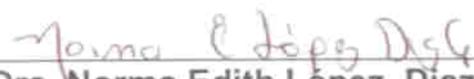
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "Efecto de la sobreexpresión de Bcl-2 sobre la proliferación y senescencia de las células estelares hepáticas *in Vitro*. Con fecha de 18 de Julio del 2007."



Dra. . María Concepción Gutiérrez-Ruiz
PRESIDENTE



Dr. Guillermo Robles Díaz
SECRETARIO



Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
VOCAL