

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



EL PAPEL DE LA PROTEINA Bcl-2 EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL
ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INDUCCIÓN DE LA SENESCENCIA
REPLICATIVA, UN MODELO *in vitro* DE ENVEJECIMIENTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

Director de tesis: Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Asesora: Dra. María Concepción Gutiérrez-Ruiz

Asesor: Dr. Diego González Halphen

México, D.F. 2004.

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

Este trabajo fue apoyado por el CONACyT dentro del programa para apoyos de investigadores jóvenes con el número 400200-5-J34194-M.

El Jurado designado por las
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

El día 3 de Septiembre del año de 2004

Miembros del Jurado:

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Diego González Halphen

Dr. Félix Recillas Targa

Dr. Pablo Damián Matsumura

Dr. Rubén Román Ramos



| | |
|--|----|
| ÍNDICE | 2 |
| RESUMEN | 7 |
| INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES | |
| 1. El envejecimiento como un problema sociodemográfico | 10 |
| 2. Biología molecular del envejecimiento | 11 |
| 2.1 Especies reactivas de oxígeno y teoría del envejecimiento por radicales libres. | 12 |
| 2.2 Daño oxidativo a las biomoléculas | 16 |
| 2.2.1 Lípidos | 16 |
| 2.2.2. Proteínas | 16 |
| 2.2.3. ADN nuclear | 17 |
| 2.2.4. ADN mitocondrial | 20 |
| 2.2.5. Cambios en los sistemas de defensas antioxidantes asociados al envejecimiento | 21 |
| 2.3 Senescencia replicativa | 22 |
| 2.3.1 El fenotipo senescente | 23 |
| 2.3.2 Genética de la senescencia replicativa | 25 |
| 2.3.3 Senescencia replicativa telómeros | 26 |
| 2.3.4 Senescencia replicativa y envejecimiento | 28 |
| 2.3.5 Senescencia replicativa y supresión de tumores | 29 |
| 2.4 Apoptosis, envejecimiento y senescencia | 30 |
| 2.5 Cromatina y envejecimiento | 31 |
| 2.5.1 Mecanismos involucrados en las modificaciones epigenéticas | 32 |
| 2.5.2 Metilación del ADN | 33 |
| 2.5.3 El código de las histonas | 35 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.5.4 | La familia de las desacetilasas de histonas Sir2 y la restricción calórica | 36 |
| 3. | La proteína Bcl-2 | 37 |
| 3.1 | Estructura de la proteína Bcl-2 y miembros de la familia | 38 |
| 3.2 | Mecanismo de acción de los miembros de la familia Bcl-2 | 39 |
| 3.3 | Expresión de Bcl-2 a lo largo de la vida | 41 |
| 3.4 | Bcl-2 como molécula antioxidante | 41 |
| 3.5 | Bcl-2 reguladora del ciclo celular | 42 |
| | JUSTIFICACIÓN | 45 |
| | HIPÓTESIS | 46 |
| | OBJETIVOS GENERALES | 46 |
| | OBJETIVOS PARTICULARES | 47 |
| | MATERIAL Y MÉTODOS | 48 |
| | Reactivos | 48 |
| | Modelo de estudio | 48 |
| | PARTE I: MÉTODOS PARA EVALUAR LOS PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR | |
| 1. | Obtención de los fibroblastos de pulmón | 49 |
| 2. | Parámetros de envejecimiento celular | 50 |
| 2.1 | Proliferación celular | 51 |
| 2.2 | Determinación de la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT) | 51 |
| 2.3 | Síntesis de ADN: incorporación de timidina tritiada | 52 |
| 2.4 | Determinación de la senescencia asociada a la enzima β -galactosidasa (SA- β -gal) | 53 |

PARTE II: DAÑO BASAL EN EL ADN Y RESPUESTA FRENTE A UN RETO DE
ESTRÉS OXIDATIVO

| | |
|---|----|
| 3. Inducción de estrés oxidativo <i>in vivo</i> | 53 |
| 4. Inducción de estrés oxidativo <i>in vitro</i> | 54 |
| 5. Extracción de ADN de hígado de ratón | 55 |
| 6. Cuantificación de la concentración de ADN | 56 |
| 7. Hidrólisis del ADN | 56 |
| 8. Cuantificación del daño al ADN por cromatografía líquida de alta presión | 57 |
| 9. Electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa) | 58 |
| 10. Niveles de especies reactivas de oxígeno por citometría de flujo | 59 |

PARTE III: LA PROTEÍNA Bcl-2

NIVELES ENDÓGENOS DE LA PROTEÍNA Bcl-2 60

| | |
|--|----|
| 11. Extracción de proteínas para inmunoensayo tipo Western | 60 |
| 12. Inmunoensayo tipo Western | 61 |

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-2 62

| | |
|---|----|
| 13. Transformación de bacterias y amplificación de plásmidos | 63 |
| 14. Purificación de ADN plasmídico por lisis alcalina | 64 |
| 15. Identificación del plásmido | 65 |
| 16. Cotransfección de las células 293T por el método de fosfato de calcio | 66 |
| 17. Infección retroviral | 69 |
| 18. Efecto de la proteína Bcl-2 frente a un reto de estrés oxidativo | 69 |

ANÁLISIS ESTADÍSTICO 70

RESULTADOS 71

PARTE I: : PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

| | |
|--|-----|
| 1. Cultivos primarios y parámetros de envejecimiento celular | 71 |
| 2. Proliferación celular | 71 |
| 3. Síntesis de ADN: Incorporación de timidina tritiada | 73 |
| 4. Funcionalidad mitocondrial (ensayo de MTT) | 74 |
| 5. Determinación de la senescencia asociada a la enzima β -galactosidasa | 75 |
| PARTE II: DIFERENCIAS EN EL LA RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ADN DE ANIMALES VIEJOS EN COMPARACIÓN CON EL DE ANIMALES JÓVENES. | |
| 6. Daño en el ADN | 76 |
| 7. Cuantificación del aducto 8-OHdG por HPLC-EC | 77 |
| 8. Cuantificación de los rompimientos de cadena sencilla mediante el ensayo cometa | 79 |
| 9. Generación de ROS en células provenientes de ratones jóvenes y viejos | 83 |
| PARTE III: LA PROTEÍNA Bcl-2 | |
| 10. Expresión endógena de la proteína Bcl-2 | 84 |
| 11. Sobreexpresión de la proteína Bcl-2 | 85 |
| 12. Efecto de la proteína Bcl-2 frente a un reto de estrés oxidativo en células provenientes de ratones jóvenes | 86 |
| 13. Efecto de la proteína Bcl-2 frente a un reto de estrés oxidativo en células Provenientes de ratones viejos | 87 |
| DISCUSIÓN | 89 |
| CONCLUSIONES | 109 |
| PERSPECTIVAS | 111 |

REFERENCIAS

113

ARTÍCULO

RESUMEN

El envejecimiento puede definirse como el deterioro de las funciones bioquímicas, estructurales y metabólicas de un organismo, aunado a una disminución de su capacidad proliferativa. Hasta ahora no se han descubierto las causas que lo inducen, sin embargo existen algunas hipótesis que tratan de explicarlo. Se ha sugerido que existen factores internos y externos, que provocan daño en las moléculas celulares generando una disfunción metabólica que puede acumularse a lo largo del tiempo. Se propone que los daños se acumulan principalmente en el ADN y que pueden ser mediados por especies reactivas de oxígeno (ROS), además alteraciones en la estructura de la cromatina. Por otro lado, se ha propuesto que el envejecimiento se induce por cambios programados de la expresión de ciertos genes, que comprometen al organismo porque las células dejan de dividirse y se acumulan manteniendo un fenotipo alterado, este estado se conoce como senescencia replicativa. Ambas hipótesis han acumulado una gran cantidad de evidencia experimental que las apoya; por lo que el tratar de integrarlas se ha convertido en un reto importante. Una proteína que podría jugar un papel protagónico en esta integración es la proteína Bcl-2, cuya función engloba mecanismos de anti-apoptosis, regulación del ciclo celular y protección antioxidante. Este trabajo constó de dos objetivos principales, uno analítico, que fue el de evaluar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 confiere un efecto protector al estrés oxidativo y si retrasa la entrada a la senescencia de cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón. Y otro descriptivo, el de evaluar si el fenotipo senescente adquirido por los fibroblastos provenientes de animales jóvenes *in vitro*, es similar al que presentan los fibroblastos de animales viejos durante el proceso de envejecimiento *in vivo*.

Para cumplirlos, se realizaron cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón joven (2 meses) y viejo (12 meses). Estos últimos fueron hembras de pie de cría con un deterioro fisiológico muy similar al fenotipo envejecido.

Se determinaron cuatro parámetros de envejecimiento a seguir: la proliferación celular, la incorporación de timidina tritiada, la funcionalidad mitocondrial y el ensayo de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal). Así mismo, se cuantificaron los niveles de ROS y la susceptibilidad del ADN al daño por estrés en este mismo modelo empleando el ensayo cometa, y por otro lado, en células de hígado cuantificando el aducto 8OHdG.

Para sobreexpresar a la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios, se realizó una infección retroviral y posteriormente se cuantificó la proliferación celular y el número de células positivas a SA- β -gal.

Los resultados indicaron que la senescencia *in vivo* e *in vitro* es fenotípicamente indistinguible, excepto por el contenido de Bcl-2, lo que sugiere que probablemente se llegue a ellas por vías distintas. Se encontró que las concentraciones de Bcl-2 aumentan conforme a la edad de organismo en homogenado de pulmón y en los cultivos primarios provenientes de animales viejos, apuntando a que Bcl-2 puede incrementar su expresión como respuesta al estrés. Asimismo, se determinó que la sobreexpresión exógena de Bcl-2 protege contra el estrés oxidativo, disminuye la proliferación e induce la senescencia. Por otro lado, se determinó que el ADN de las células de los animales viejos es más susceptible a daño por agentes que generan estrés oxidativo, probablemente debido a la acumulación de daño previo, tanto oxidativo como epigenético.

Se obtuvieron, además otros resultados interesantes que no estaban planteados dentro de los objetivos del proyecto, como el hecho de que el estrés generado por la infección

viral indujo la senescencia prematura en las células de los animales viejos, y de manera muy interesante, el modelo de estudio de los ratones hembra con múltiples partos, en las cuales se encontró una relación entre el deterioro fisiológico provocado por los múltiples embarazos y el fenotipo de envejecimiento prematuro.

Finalmente y como conclusión, puede decirse que la proteína Bcl-2 tiene un papel de pro-supervivencia celular que está constituido por su ingeniería en varias vías metabólicas y que valdría la pena continuar su estudio.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

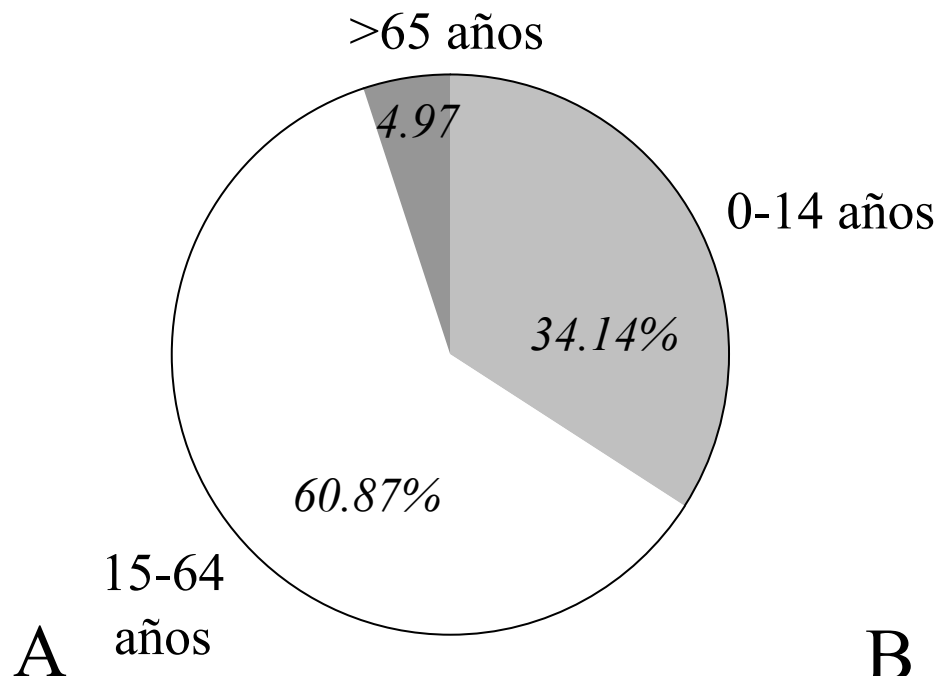
1. EL ENVEJECIMIENTO COMO UN PROBLEMA SOCIODEMOGRÁFICO

La población mexicana atraviesa por una fase de plena y acelerada transición demográfica, en un proceso que inició en la década de los treinta con el descenso paulatino de la mortalidad y posteriormente se acentuó, a mediados de los sesenta, con la declinación de la fecundidad (Tuirán, 1999). Según el censo de población realizado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) en el año 2000, en la actualidad el número de niños y adolescentes es significativamente mayor al de los “*adultos mayores*” (≥ 65 años), uno de cada tres mexicanos tiene menos de 15 años, en tanto que sólo uno de cada veinte tiene más de 65. Sin embargo, el Consejo Nacional de Población (CONAPO) estima que para el año 2050 esta proporción se verá profundamente alterada. Se prevé que uno de cada siete mexicanos estará en edad escolar, mientras que los adultos mayores representarán a uno de cada cuatro habitantes del país (figura 1).

Este hecho constituye un problema tanto desde el punto de vista social, como económico, laboral y de salud entre otros. Dentro de las consideraciones que se deben tomar en cuenta al reflexionar sobre el envejecimiento se encuentran ciertas dificultades como son la pérdida en las capacidades físicas y mentales, la disminución de la autonomía y adaptabilidad, el menoscabo de roles familiares y sociales, el retiro del trabajo, la pérdida de la capacidad económica y el deterioro en la salud con consecuencias incurables y progresivas.

Es por ello que en 1999 se realizó en México un taller auspiciado por el CONAPO donde se señaló que el proceso de envejecimiento deberá ser tomado muy en cuenta si se quiere aspirar a un futuro con planeación y perspectivas adecuadas. Al igual que las variables de

Censo de Población 2000, INEGI



Estimación del CONAPO Para el 2050

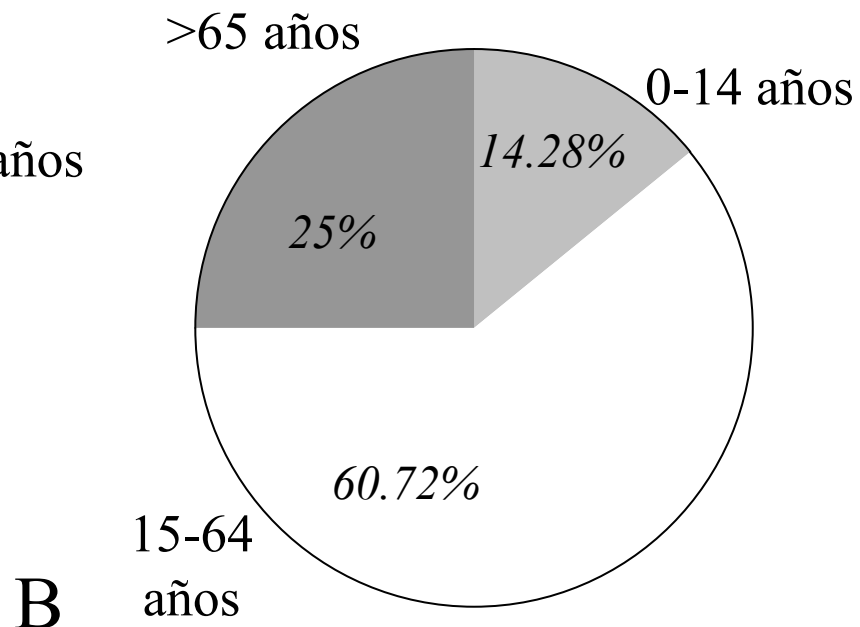


Figura 1: DEMOGRAFÍA MEXICANA

Distribución demográfica de la población mexicana. Ambas gráficas se han dividido en tres intervalos de edades: 0-14 niños, 15-64 jóvenes y adultos, > 65 adultos mayores o de la tercera edad.

- A. Resultados aportados por el censo nacional de población y vivienda del año 2000 realizado por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI).
- B. Estimación de la distribución poblacional mexicana para el año 2050, realizado por el Consejo Nacional de Población (CONAPO).

salud, la fecundidad o el medio ambiente, las condiciones del envejecimiento deberán figurar explícitamente y desde ahora en los planes de desarrollo económico y social de nuestro país (Ham-Chande, 1999). Se propone enfocar todo tipo de esfuerzos para minimizar los riesgos característicos de la vejez, aminorar sus consecuencias y acrecentar las posibilidades de bienestar, no sólo para la persona que envejece, sino para todo el entorno familiar, social y económico que lo rodea.

En esta búsqueda se intenta encontrar lo que se ha conceptualizado como el “*buen envejecimiento*” (Rodríguez-Ajenjo, 1999) en el cual se lograría minimizar las incidencias y prevalencias de enfermedades crónicas, degenerativas e incapacitantes; se conseguiría mantener la funcionalidad física y mental de las personas; se concientizaría a la sociedad y a la familia para que existieran contactos e intercambios de ayuda material y apoyo emocional; se obtendría un apoyo económico suficiente y se realizarían actividades productivas y satisfactorias, no necesariamente remuneradas, entre muchos otros beneficios.

2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso inevitable al cual todos los organismos multicelulares estamos sujetos, sin embargo, hasta ahora no se han descubierto las causas que lo inducen. Durante años han surgido diversas hipótesis que tratan de explicarlo. En la actualidad, puede decirse que estas hipótesis se dividen en dos grandes categorías.

La primera, es una línea de pensamiento que involucra factores, tanto internos como externos, que provocan daño en las moléculas celulares. El daño compromete a las células, ya que provoca una disfunción metabólica que puede acumularse a lo largo del tiempo, dando lugar a la alteración de sus funciones o incluso matar células que son imposibles de

reemplazar. Se propone que los daños ocurren a nivel de proteínas, lípidos y ADN, que pueden ser mediados por especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan principalmente en la mitocondria, además de otros sistemas enzimáticos (Harman 1956; Halliwell y Gutterdige, 1984; Ames, et al, 1990; Bohr et al., 1998; Finkel y Holbrook, 2000).

Dentro de la otra gran categoría, se encuentran las hipótesis que tratan de explicar el envejecimiento basándose en cambios programados de la expresión de ciertos genes. Estos cambios comprometen al organismo porque las células dejan de dividirse y se acumulan manteniendo un fenotipo alterado. En este caso, el factor más importante o motor del fenómeno es la capacidad que tienen las células de dividirse; la eventual pérdida de dicha capacidad las induce a entrar en lo que se conoce como senescencia replicativa (Hayflick, 1985; Sedivy, 1998; Ducracy et al., 1999; Campisi, 1997).

Ambas hipótesis han acumulado una gran cantidad de evidencia experimental que las apoya; por lo que el tratar de integrarlas se ha convertido en un reto importante. Sin embargo, aún es poco lo que se sabe sobre la relación entre el daño sobre el ADN generado por el estrés oxidativo con las señales génicas que intervienen con la capacidad proliferativa, y su relación con el envejecimiento celular.

2.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y TEORÍA DEL ENVEJECIMIENTO POR RADICALES LIBRES.

Un radical libre se puede definir como cualquier especie atómica o molecular con uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutterdige, 1984). Dentro de esta definición tan amplia se puede incluir al O_2 y a la mayoría de los metales de transición. El O_2 tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en un orbital Pi de anti-unión (π^*) diferente,

por lo que tienen el mismo número cuántico de spin, de manera que para que el O₂ oxide a otra molécula y acepte dos electrones (2e⁻), estos deben ser de “spin” o giro paralelo para que puedan ser admitidos en las vacantes de los orbitales. Ello impone una restricción muy fuerte que hace que el O₂ acepte un solo electrón a la vez y hace muy lentas sus reacciones. Sin embargo, cuando reacciona con metales de transición que pueden donar o recibir un electrón a la vez, estas restricciones quedan anuladas.

La reactividad del oxígeno aumenta cuando uno de los electrones se mueve de manera que alivia la restricción del “spin”, generando un estado que se conoce como oxígeno singulete. Si un electrón es aceptado por la molécula de O₂ en estado basal, debe entrar en uno de los orbitales π^* de anti-unión y el producto de ello es el radical superóxido (O₂^{•-}). Este radical, que es al mismo tiempo un anión, se forma en varios procesos fisiológicos normales de todas las células aeróbicas, entre los cuales destacan la destoxificación de xenobióticos por la familia de los citocromos P450 (Hasler et al., 1999; Cancino , 2001), el metabolismo de los ácidos nucleicos mediante la xantina oxidasa (Bermúdez-Fajardo, 2001), la respuesta inmune contra las infecciones (García-Triana, 2001) y de manera principal la cadena respiratoria mitocondrial. Se propone la fuga de electrones sea en el complejo III, donde la semiquinona puede ceder su electrón directamente al O₂ para formar la quinona y el radical superóxido (Turrens, 1985), o bien en el complejo I...

La adición de un segundo electrón al O₂^{•-} da lugar al anión peróxido (O₂⁻²), que no es un radical libre por no tener electrones desapareados. Cualquier O₂⁻² formado a pH fisiológico se protonará inmediatamente dando lugar al peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Esta reacción ocurre de manera natural en las células en donde es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) como un mecanismo de defensa antioxidante (Fernández-Checa, 1997).

Existen varios tipos de SOD, pero los más importantes son la SOD tipo I, que tiene como cofactores al cobre y al zinc y que se encuentra de manera constitutiva en el citosol. La SOD tipo II, posee al Mn como cofactor (Melov et al.,1999), y es una isoforma inducible que se está presente en el interior de las mitocondrias (Haliwell y Gutterdige, 1999). Una vez formado el H₂O₂, las células cuentan con enzimas capaces de degradarlo y convertirlo en agua, como son la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX) entre otras (Haliwell y Gutterdige, 1999).

No obstante, en muchas ocasiones puede darse el caso de un rompimiento homolítico del enlace O-O en el H₂O₂. Esta reacción se lleva a cabo mediante una catálisis química (no enzimática) y produce un anión (OH⁻) y un radical hidroxilo (OH•). Los catalizadores suelen ser metales de transición como el fierro y el cobre, aunque también pueden ser las radiaciones ionizantes y otros agentes. Esta reacción se conoce como reacción de Fenton:



Otra manera de producir el radical hidroxilo es vía la reacción de Haber-Weiss catalizada por metales:



La mitocondria utiliza aproximadamente del 98 al 99% del oxígeno consumido por las células, y aún cuando la cadena respiratoria es muy eficiente, parte del oxígeno consumido genera O₂^{•-} *in vivo*, vía la ubiquinona (UQ). El superóxido a su vez produce H₂O₂ por dismutación, como este fenómeno se lleva a cabo muy cerca de la membrana interna mitocondrial cuyos complejos proteicos poseen átomos de fierro y de cobre como

cofactores, es aceptado que la generación de radicales hidroxilo se lleva a cabo a este nivel (Roberfroid y Buc-Calderon, 1994).

Los radicales libres en general, y el radical hidroxilo en particular, pueden reaccionar con moléculas orgánicas reducidas, en especial con las que contienen dobles enlaces como los lípidos insaturados y los anillos aromáticos de aminoácidos y bases nitrogenadas. Por otro lado, se sabe que el H_2O_2 no es un radical libre, sin embargo una parte significativa de su importancia radica en su potencial como precursor del O_2^{\bullet} debido a su capacidad para difundir a través de las membranas y llegar a sitios distantes en la célula (Zhang et al., 1990). Además el O_2^{\bullet} y el H_2O_2 pueden liberar al hierro de la ferritina y de las proteínas hemo respectivamente (Wiseman y Halliwell, 1996), lo que es relevante puesto que la célula generalmente mantiene secuestrados a los metales de transición para que no se encuentren disponibles para la reacción de Fenton y Haber-Weiss.

Todo lo anterior llevó a Denham Harman en los años cincuentas a proponer la teoría del envejecimiento por radicales libres (Harman, 1956), y desde entonces se ha acumulado una gran cantidad de evidencia experimental que la apoya. La teoría propone que dicho fenómeno es el resultado de la acumulación del daño oxidativo no reparado sobre distintos componentes celulares debido al ataque de los radicales libres generados a lo largo de la vida del organismo.

Una manera más moderna de concebir la teoría de los radicales libres en el envejecimiento es la de interpretarla en función del estrés oxidativo. La teoría reformulada propone que el envejecimiento es causado por un desbalance entre los niveles de los sistemas antioxidantes y de los agentes oxidantes, que se inclina más hacia los últimos (Rikans y Hornbrook, 1997).

2.2 DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS

2.2.1 *Lípidos*

La alteración más importante inducida por las ROS sobre los lípidos está dada por los daños generados sobre las membranas en un proceso llamado lipoperoxidación. Existen diversas maneras para terminar este evento, como son la dismutación, la β -escisión y la ciclización. Así como la inactivación de los radicales libres realizada por el sistema de defensa antioxidante constituido por la vitamina E, la vitamina C y el glutatión (GSH). En la mayoría de los casos, los productos que se generan modifican a la membrana y causan alteraciones importantes como cambios en su fluidez y permeabilidad. En el primer caso, se altera la estructura de las proteínas transmembranales, perdiéndose la afinidad ligando-receptor y los mecanismos de segundos mensajeros por lo que se altera la función de hormonas y neurotransmisores. En el segundo caso, se pierde la facultad de ser barrera iónica y osmótica (Rikans y Hornbrook, 1997; Grune y Davies, 2001).

2.2.2 *Proteínas*

Uno de los fenómenos más importantes durante la oxidación de proteínas es la formación de carbonilos, la cual puede estar ligada a la transformación de un residuo aminoacídico en otro y a la amidación. Por ejemplo, una histidina puede transformarse en una prolina o un ácido glutámico y, al mismo tiempo, generar un carbonilo en la cadena lateral de un residuo vecino. Los grupos carbonilos son distintivos de proteínas oxidadas y las hacen susceptibles a proteólisis. Otra alteración relacionada con las ROS es el entrecruzamiento intra e intermolecular dado por la oxidación de los grupos SH en los residuos de cisteínas, induciendo la formación de puentes disulfuro en sitios donde no deberían de existir.

Estos cambios en la estructura primaria (que por supuesto se reflejan en cambios en la estructura secundaria y terciaria) dan como resultado cambios en la inmunogenicidad de las proteínas del sistema inmune, cambios en la hidrofobicidad de las proteínas de membrana, y alteraciones generales en la estructura de todas las proteínas y enzimas oxidadas. Todo ello con la consecuente pérdida de la función y mayor susceptibilidad a la proteólisis (Roberfroid y Buc-Calderon, 1994). A la fecha existe una gran cantidad de literatura que relaciona la oxidación de proteínas y el envejecimiento, ya que se ha encontrado un aumento persistente en los diferentes sistemas y tejidos estudiados (Beal , 2002).

2.2.3 ADN NUCLEAR

Se ha aceptado que en condiciones fisiológicas las especies como el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 o el óxido nítrico (NO) tienen muy poca o nula capacidad para reaccionar con el ADN, por lo se considera que es el OH^{\bullet} el que lo hace de manera preferente. Los daños directos sobre el ADN pueden ocurrir sobre las bases púricas y pirimídicas y/o sobre los azúcares (desoxirribosa). Cuando el OH^{\bullet} ataca a las bases nitrogenadas no hay abstracción del H como en el caso de los lípidos o las proteínas, en cambio el OH^{\bullet} se une de manera directa a la base nitrogenada formando un aducto. Hasta la fecha se han reportado más de 20 diferentes aductos formados durante la oxidación del ADN. Uno de los más estudiados es el caso de la guanosina, donde se sabe que el OH^{\bullet} se puede unir a las posiciones 4, 5 u 8 del anillo purínico. La adición al carbono 8 produce un aducto radical C-8-OH, llamado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina o bien 8-OHdG, que es el más estable y por lo tanto el que generalmente se cuantifica (figura 2). La generación de los aductos induce alteraciones en los puentes de hidrógeno que estabilizan la complementarización en la doble cadena del

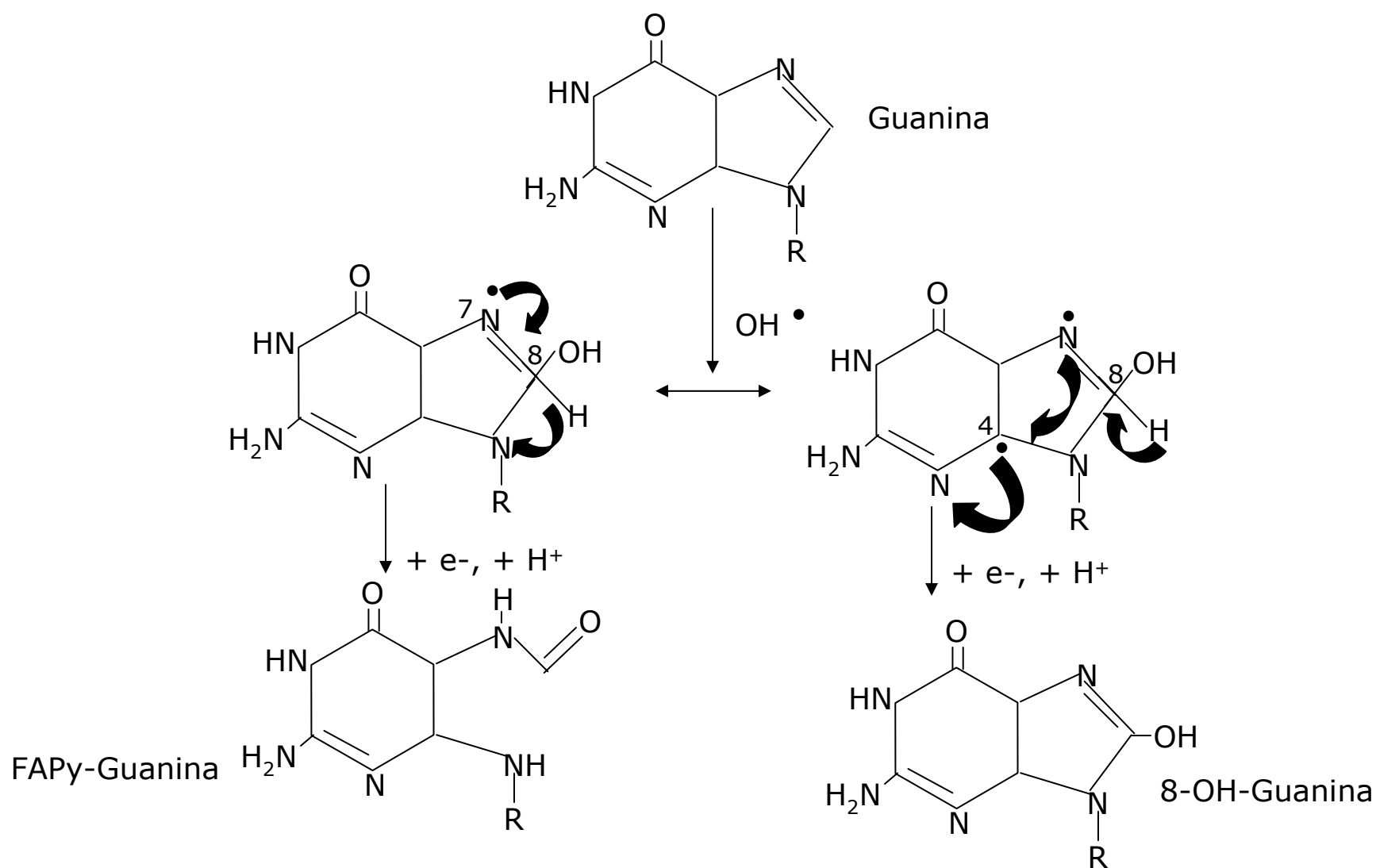


Figura 2: MODIFICACIONES DE LA GUANINA POR RADICALES HIDROXILO

La adición del radical $\text{OH}\cdot$ al C-8 de la guanina genera un radical 8-hidroxiguanina que puede tener difernetes rearrreglos moleculares, y después reducirse con un electrón más para formar ya sea la 8-hidroxiguanina o el producto de anillo abierto: 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FAPyG). El ataque del $\text{OH}\cdot$ en otra posición (C4, C5) también es posible.

ADN, de manera tal que durante el proceso de duplicación, la enzima ADN-polimerasa puede tener errores y generar transversiones y translocaciones. Los aductos originan por lo tanto, mutaciones puntuales en el ADN (Cheng et al., 1992).

El daño en los azúcares sigue un mecanismo similar al de la lipoperoxidación, iniciando con la abstracción de un H y el ataque de un oxígeno singulete, que finaliza con el rompimiento del enlace fosfodiéster dando como resultado escisiones de cadena doble o sencilla. Resumiendo, el daño en las bases da como resultado mutaciones puntuales, mientras que el daño sobre los azúcares genera rompimientos de las hebras del ADN (Martínez et al., 2003).

Existe una gran cantidad de evidencia experimental que involucra el daño oxidativo sobre el ADN y la disminución en la capacidad de los mecanismos de reparación con el proceso del envejecimiento y de las enfermedades relacionadas a él, como el cáncer (Bohr et al., 1998; Izzoti et al., 1999; Hamilton et al., 2001; Wolf et al., 2002). Sin embargo, el daño directo sobre el ADN no es suficiente para explicar su importante repercusión sobre la transducción de señales, la proliferación y la muerte celular, así como en la comunicación intracelular. Es por eso que se piensa que deben haber otro tipo de alteraciones, posiblemente a nivel epigenético, que se encuentren relacionadas con la expresión desregulada de diversos genes (Lezhava, 2001; Issa, 2002; Ikura y Ogryzko, 2003).

El daño al ADN puede ser evaluado por diversos métodos entre los que destacan la electroforesis unicelular alcalina (SCGE) o ensayo cometa, que es un método muy sensible para detectar rompimientos de cadena sencilla (Singh et al 1988; Tice et al., 1994). Una de las ventajas que presenta esta técnica es que permite cuantificar el daño al ADN *in situ*, i.e. sin necesidad de extraerlo de las células. Esto ha resultado ser muy importante, puesto que se ha reportado que la misma extracción del material genético de las células genera

oxidaciones que comúnmente se cuantifican como falsos positivos, sobreestimando el daño generado por algún tratamiento (Collins, et al 1997).

Por otro lado, en los años recientes se han desarrollado y comparado varias técnicas de extracción del ADN que minimizan las oxidaciones indeseadas asociadas debidas al manejo de la muestra y a la técnica de extracción, siendo el mejor de estos métodos el que emplea yoduro de sodio (NaI) para precipitar al ADN, en lugar de usar fenol-cloroformo (Helbock et al., 1998). Con estas técnicas ha sido posible cuantificar de manera directa y específica a los aductos que se generan en las bases del ADN. El aducto 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8OHdG u 8-oxodGuo) se ha reconocido como un marcador selectivo y específico del daño generado por estrés oxidativo sobre el ADN (Helbock et al., 1998). Su cuantificación ha ganado popularidad sobre otros tipos de aductos puesto que es una de las especies más abundantes y resistentes que se producen cuando se oxida el ADN (Pouget et al., 2000) y su aparición se ha correlacionado con mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Chen et al; 1995). Para determinarlo existen varias técnicas de las cuales las más aceptadas son la detección del aducto por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC) y por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (GC-MS) (Cadet et al., 2000). Para realizar estas técnicas, es necesario extraer el ADN e hidrolizarlo hasta el nivel de nucleósidos para poder inyectarse en el sistema cromatográfico. En el caso del HPLC se separan primero los 4 nucleósidos (dA, dG, dC y dT). Esta separación puede visualizarse y cuantificarse gracias a sus doble enlaces conjugados, usando un detector UV-VIS conectado al detector EC que, gracias al potencial eléctrico, detecta la diferencia entre una guanósina normal y una guanósina oxidada en el carbono 8 (Park, et al., 1998; Matos et al., 2001), permitiendo así la cuantificación del 8OHdG.

Existen varios artículos en la literatura donde se comparan las ventajas y desventajas de las técnicas antes mencionadas (Cadet et al., 1998), de modo que es frecuente encontrar trabajos en los que se emplean tanto los ensayos cometas como la cuantificación del aducto 8-OHdG, ya que esto claramente aumenta la confiabilidad de los resultados (Wolf et al., 2002).

2.2.4 *ADN mitocondrial*

En condiciones normales, las mitocondrias tienen en su interior mecanismos de defensas antioxidantes como son el GSH y la SOD dependiente de manganeso (MnSOD) entre otros (Fernández-Checa, 1997). Aún cuando estas proteínas protectoras y de reparación están codificadas por el ADN nuclear, su función está bien delimitada en el interior de la mitocondria. Sin embargo, los niveles de las defensas antioxidantes disminuyen con la edad, llevando a la mitocondria a tener altos niveles de ROS, lo cual inevitablemente llevará a la producción de más radicales libres que generan estrés oxidativo. Se ha asumido que los radicales libres producidos en la mitocondria se encuentran en proporción al metabolismo celular, y que la reacción de esos radicales con las macromoléculas mitocondriales durante la vida del organismo produce daños progresivos que contribuyen a los efectos fenotípicos del envejecimiento (Ames, et. al. 1990). Los cuales pueden ser tan importantes que han llevado a que algunos investigadores propongan modificaciones a la teoría de Harman denominándola: “Teoría del envejecimiento por radicales libres mitocondriales” (Wei, 1998).

En particular, se ha reportado que la acumulación de mutaciones y deleciones en el ADNmt contribuye de manera fundamental al fenómeno del envejecimiento (Richter, 1998) y

enfermedades degenerativas como el Alzheimer (Wiseman y Halliwell, 1996) y Parkinson (Shoffner et al., 1993), así como a miopatías mitocondriales (Tritschler y Medori, 1993).

2.2.5 Cambios en los sistemas de defensas antioxidantes asociados al envejecimiento

Como se mencionó antes, el organismo cuenta con sistemas antioxidantes que contrarrestan el efecto de las ROS. Esta primera línea de defensa se ha dividido en antioxidantes de tipo enzimático como las SOD, la CAT y la GPx, que son producidos directamente por el organismo, y otros no enzimáticos como las vitaminas A, C y E, que se adquieren mediante la dieta, y el GSH que requiere de precursores. Aunque existe una cantidad enorme de estudios sobre el estatus de los antioxidantes durante el envejecimiento, los resultados siguen siendo confusos y no hay un consenso entre la comunidad científica al respecto.

En el caso de los antioxidantes no enzimáticos, la mayoría de los estudios coinciden en que hay una disminución significativa de sus respectivas concentraciones asociada al envejecimiento, no obstante existen controversias al respecto. Se ha reportado que la concentración de vitamina E en el plasma presentan una curva bifásica, con un máximo a la mitad de la vida, mientras que la vitamina C al parecer disminuye de manera gradual con la edad. El caso del GSH parece tener un comportamiento similar, ya que diversos autores han reportado su disminución en tejidos como cerebro, pulmón y músculo de rata y ratón (Mosini et al., 2004).

Debido a que los estudios realizados para cuantificar las concentraciones de los antioxidantes enzimáticos son muy contrastantes, se han descrito resultados variables en sistemas diversos. Como ejemplo se puede citar el estudio de Barnett y King (1995) en el que se compararon los niveles de SOD, GPx, CAT, ceruloplasmina, ácido úrico y

bilirubina, en sangre de individuos jóvenes y viejos y no se encontró diferencias significativas entre ambos grupos. Por el contrario, Kim y colaboradores (2003) reportaron mayor actividad de la SOD en el hígado y el cerebro de ratas viejas, y así como disminución en la actividad de la GPx. Mosini reportó que a pesar de que los niveles de GSH disminuyen en el músculo de la rata, las actividades de GPx y GSSG reductasa no se alteran con la edad (Mosini et al., 2004). Estos resultados contradictorios se repiten continuamente, lo único que queda claro en este caso, es que los sistemas de defensa antioxidante varían de una manera irregular con la edad y dependen del tejido y de la especie que se trate.

Se ha sugerido que la alta frecuencia en daños inducidos por ROS relacionados a edades avanzadas no solo depende del estado en que se encuentren los sistemas antioxidantes, sino también, en forma muy importante, del decremento en los sistemas de reparación y mantenimiento celulares (Barnett and King, 1995). No obstante, es imposible dejar de mencionar en este apartado, que existen estudios en donde la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, como la SOD y la CAT, han aumentado la longevidad en organismos como *Drosophila* (Orr y Sohal, 1994) y *Chaenorabditis elegans* entre otros (Mockett et al., 2001; Melov et al., 2001; Zimmerman et al., 2003), lo que inevitablemente sitúa a los antioxidantes en un punto crucial, al mismo que tiempo explica la razón de la extraordinaria popularidad y atención que han recibido estos sistemas en los últimos años.

2.3 SENESCENCIA REPLICATIVA

Se ha denominado senescencia celular o senescencia replicativa al proceso que limita la capacidad de división celular. Este fenómeno fue descrito por Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961) en cultivos primarios de fibroblastos humanos y se refiere al momento en

el que las células dejan de dividirse e inician su etapa de senescencia. Se ha sugerido que la senescencia replicativa es al mismo tiempo un mecanismo de supresión de tumores y un factor contribuyente al envejecimiento de los organismos (Campisi, 2000). No obstante, por muchos años no fue posible demostrar la presencia de células senescentes *in vivo* y permanecía la duda si los cambios morfológicos y funcionales asociados a este fenómeno eran únicamente cambios que ocurrían *in vitro*. Sin embargo, dos estudios recientes han aportado evidencias convincentes de que el fenómeno de senescencia ocurre en las células *in vivo*. En uno de ellos se usaron ratones con telómeros erosionados a los cuales se les practicó una hepatectomía parcial. Los hepatocitos de estos ratones presentaron una habilidad limitada para proliferar y regenerar el hígado, en cambio entraron en senescencia (Satyanarayana et al., 2003). En el segundo estudio, se trató a ratones con linfoma con un agente quimioterapéutico. Se observó que cuando el programa de apoptosis se bloqueaba por sobreexpresión de *bcl-2*, las células de linfoma entraban en senescencia replicativa (Schmitt et al., 2002). De esta manera se postula que en un tejido *in vivo* puedan convivir células senescentes y pre-senescentes al mismo tiempo.

2.3.1. El fenotipo senescente

Las células senescentes permanecen vivas por largos períodos de tiempo. Sintetizan ARN y proteínas, responden a señales del medio ambiente y retienen muchas características de las células pre-senescentes, ya que ambas expresan un gran número de genes en común, algunos de los cuales siguen respondiendo a estímulos externos a lo largo de todo el tiempo de vida de la célula. Hay tres características que diferencian a las células senescentes de las otras células: en primer lugar, son incapaces de proliferar en respuesta a estímulos mitogénicos. Ya que se encuentran arrestadas en la fase G0/G1 de ciclo celular en forma

irreversible (Toussaint, 2000). En segundo lugar, las células senescentes son resistentes al proceso de apoptosis, y aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta resistencia aún se desconoce, este hecho podría explicar el que las células senescentes se acumulen *in vivo* a pesar de estar alteradas (Wang, 1995). Tercero, presentan cambios específicos en sus funciones diferenciadas que dependen del tipo celular del que se trate. Muchos tipos celulares muestran cambios fenotípicos cuando senescen. Morfológicamente se observan como células grandes y aplanadas, con una gran cantidad de vacuolas. Incrementan la biogénesis de lisosomas y reducen su velocidad de síntesis y degradación de proteínas; además de que se presentan cambios en la regulación y expresión de genes específicos. Por ejemplo, en el endotelio senescente humano, se incrementa notablemente la expresión de la interleucina 1 α (IL-1 α) y de la molécula de adhesión I-CAM. En células adrenocorticales epiteliales, la senescencia causa una pérdida selectiva en la habilidad de inducir a la 17 α hidroxilasa, una enzima clave en la biosíntesis del cortisol. Al senescer, los fibroblastos humanos presentan un importante incremento en la expresión de colagenasa y estromielicina, así como una reducción en la expresión de los inhibidores de metaloproteinasas de tejidos 1 y 3 (TIMP-1 y TIMP-3), por lo que en lugar de generar matriz extracelular, están produciendo proteínas que la degradan. Todo esto sugiere que la acumulación de estos cambios puede alterar el entorno en el cual se acumulan las células senescentes y modificar a las células vecinas en buen estado. Estos cambios pueden ser más importantes que el arresto celular en si mismo (Campisi, 1999; Dimri et al., 2000).

2.3.2. *Genética de la senescencia replicativa*

Se postula que el límite en la capacidad replicativa de las células es un fenotipo dominante. Esta aseveración se basa en estudios en donde células humanas normales en proliferación, se fusionaron con células inmortales derivadas de tumores también humanos. En la mayoría de los casos las células híbridas proliferaron por un tiempo y eventualmente senescieron (Tomimaga et al., 2002). Este experimento, entre otros, sugiere fuertemente que la senescencia es una característica genéticamente dominante, mientras que la inmortalidad replicativa es genéticamente recesiva. Según esta hipótesis se esperaría que las células que se encuentran en la etapa de senescencia replicativa, generaran una regulación selectiva de ciertos genes cuya participación es importante para la progresión de la fase G1 del ciclo celular y la síntesis del ADN. La información que existe hasta el momento es aún incompleta y en algunos casos contradictoria, pero se han obtenido datos interesantes, principalmente en fibroblastos humanos. Se ha reportado que la respuesta temprana a la estimulación mitogénica se induce en las células senescentes aproximadamente en los niveles y con la cinética normales (Chen y Chang, 1987). Por lo que se cree que las células senescentes no tienen una falla en sintetizar ADN en respuesta a estímulos mitogénicos sino que posiblemente las alteraciones sea en los mecanismos de transducción de señales necesarios para que continúe la división celular. Por lo menos dos genes cuya respuesta temprana es esencial para que los fibroblastos inicien la síntesis de ADN tienen ningún efecto sobre las células senescentes cuando se inducen de manera exógena. Ellos son el proto-oncogene c-fos (Seshadri y Campisi, 1990), que codifica para un componente del factor de transcripción AP-1; y los genes Id1 e Id2 (Hara et al., 1996) que codifican para reguladores negativos de factores de transcripción de la familia hélice-asa-hélice (helix-loop-helix, bHLH). Un fenómeno semejante ocurre con los genes que normalmente se

inducen en la etapa tardía de G1 o en la interfase de G1/S, que no se expresan en las células senescentes, como sucede con los genes que codifican para la expresión de las histonas, los genes para las ciclinas A y B y la cinasa dependiente de ciclinas cdc2. Así como los genes de algunas enzimas necesarias para el metabolismo del ADN como las timidincinasas (TK), la DNA polimerasa α y la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Campisi, 1999). Además, se presenta una actividad deficiente en las proteínas E2F1, E5F5 (Dimri et al., 1994), y Rb, la cual se ha encontrado en estado hipofosforilado (Stein et al., 1999). Aunado a la deficiencia en reguladores positivos del ciclo celular, se ha reportado que los fibroblastos senescentes sobreexpresan dos reguladores negativos que inhiben a las cinasas dependientes de ciclinas, como son p21 y p16 (Dulic et al., 2000), pero aún queda por aclarar quienes son los reguladores de estos inhibidores.

2.3.3. *Senescencia replicativa y Telómeros*

No se sabe con certeza que es lo que induce a una célula a detener su proliferación y convertirse en una célula senescente. Una de las primeras propuestas fue la que sugirió que el acortamiento de los telómeros o el desarreglo de la estructura telomérica, conllevan a la activación de múltiples y diversos mecanismos de señales que eventualmente detienen la división celular. Los telómeros son la parte terminal de los cromosomas, de ahí su nombre (del griego *telos*- final). Su función específica es la de mantener la estabilidad estructural de los cromosomas y evitar las fusiones entre ellos (Muller 1938; McClintock, 1941). Estudios realizados con el protozoario ciliado *Tetrahymena thermophila* (Blackburn y Gall, 1978), demostraron que los telómeros están formados por secuencias repetidas, altamente conservadas, ricas en guaninas que en vertebrados consisten de la secuencia TTAGGG. El

número de copias de esta secuencia varía dependiendo de la especie. En humanos es alrededor de 3-15 kilopares de bases (kpb) mientras que en ratones es de 30 a 100 kpb (Ducray et al.,1999)

Aunque experimentalmente se ha logrado superar la senescencia replicativa insertando el gene de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa h-TERT (Bodnar, et al., 1998), en los últimos años el papel protagónico de los telómeros como motor de la senescencia celular ha decaído, puesto que se ha logrado inducir la senescencia sin el acortamiento de los telómeros. Se propone que el estrés oxidativo ocasiona daños a nivel del ADN y que estos promueven el arresto celular, fenómeno al cual se le ha denominado senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) y presenta un fenotipo similar al observado en la senescencia replicativa normal (Lundberg, 2000).

Se ha logrado inducir SIPS generando el daño al ADN por tratamiento con radiaciones UV y gamma, por estrés oxidativo usando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o hiperoxia oxidante (Chen, 2000), o bien mediante el uso de inhibidores de desacetilasas de histonas o la sobreexpresión de genes como *ras* y *raf* (Pantoja y Serrano, 1999). Sin embargo, existe controversia con respecto al mecanismo por el cual estas células entran en senescencia, ya que se ha encontrado que en algunas ocasiones se relaciona con el acortamiento de los telómeros (Von Zgliniki, 2000) y en otras no (Chen et al., 2001). De hecho, se ha logrado inducir SIPS en células inmortalizadas que sobreexpresaban hTERT, sugiriendo que en estos casos la presencia de la telomerasa no protegió a las células de SIPS. En esos experimentos se observó que las células que sobreexpresaban hTERT, fueron más resistentes a la apoptosis y la necrosis inducida por estrés, sugiriendo un mecanismo de reparación en el que se podría encontrar involucrada la telomerasa (Gorbunova et al., 2002).

A pesar de que se ha cuantificado la expresión génica de una gran cantidad de moléculas implicadas en la senescencia replicativa y la SIPS para comprender los mecanismos involucrados, aún quedan muchas dudas por resolver.

2.3.4. *Senescencia replicativa y envejecimiento*

La idea de que la senescencia celular está relacionada al envejecimiento de los organismos está basada en una gran cantidad de correlaciones experimentales, sin embargo, hay poca evidencia directa (Faragher y Kipling, 1998). Una primera línea de evidencia correlativa se basa en que los cultivos primarios derivados de donadores de edad avanzada, tienden a senescer después de una cantidad menor de duplicaciones celulares (PD = population doublings) que los cultivos de donadores jóvenes (Bruce et al., 1986). La siguiente evidencia deriva de algunas comparaciones entre especies, ya que en general, las especies de vida corta tienden a senescer después de menos PD que las especies más longevas. En tercer lugar, se encuentran los estudios realizados en tejidos humanos derivados de personas con síndromes de envejecimiento prematuro hereditario, en especial con donadores con síndrome de Werner. En estos casos, se observa que las células de los pacientes senescen de manera prematura con respecto a los controles (Martin et al., 1997).

Aún y cuando la evidencia experimental directa es muy poca, recientemente se describió la acumulación de células senescentes *in situ*, evidenciando la acumulación de células senescentes en tejido humano envejecido. Esto se hizo utilizando un marcador enzimático basado en la actividad de la enzima β -galactosidasa humana que aparentemente se acumula en varios tipos celulares que senescen en cultivo (Dimri et al., 1995). La actividad de la enzima se detecta en células individuales por tinción histoquímica a pH 6.0 usando el

sustrato artificial X-gal. Esta técnica es conocida como β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) y difiere en su pH óptimo de la β -galactosidasa lisosomal (pH 4.0) y de la β -galactosidasa bacteriana (pH 7.5). Se ha demostrado que la expresión de SA- β -gal está ligada a la senescencia y no a la quiescencia o a la diferenciación terminal, sin embargo la función y regulación exactas de esta β -galactosidasa en las células senescentes es aún desconocido (Dimri et al., 1995). Este marcador se ha usado en numerosos tejidos con gran éxito, y los resultados apoyan el hecho de que la senescencia está relacionada al envejecimiento.

2.3.5. Senescencia replicativa y supresión de tumores

En una primera instancia, la idea de que la senescencia replicativa pudiera contribuir tanto a un mecanismo supresor de tumores como al fenómeno del envejecimiento, parecería contradictoria. Sin embargo, algunas teorías evolucionistas del envejecimiento (Martín et al., 1996) sugieren que existen rasgos o características que se ha seleccionado para optimizar la salud o la adaptación al medio durante la etapa de capacidad reproductiva, los cuales pueden ser dañinos o deletéreos en otra etapa de la vida (antagonismo pleiotrópico). De modo que la senescencia replicativa pudo haberse seleccionado (al menos en mamíferos) para proteger al organismo contra neoplasias en etapas tempranas de la vida, antes y durante la reproducción. Empero, la acumulación de células senescentes, que tienen un fenotipo disfuncional y enrarecen el ambiente, no sólo hace que la función e integridad del tejido en el que se encuentran se pierda o se deteriore, sino que fomentan una desregulación metabólica en las células vecinas que las lleva a incrementar las posibilidades de iniciar un proceso de cáncer (Campisi, 2000).

2.4 APOPTOSIS, ENVEJECIMIENTO Y SENESCENCIA.

Desde el descubrimiento inicial de la apoptosis por Kerr y colaboradores en 1972 como un mecanismo de muerte diferente de la necrosis, el cual ha sido objeto de un sinnúmero de estudios. La desregulación de la apoptosis se ha visto implicada como parte del mecanismo fundamental de una gran cantidad de patologías relacionadas al envejecimiento humano. Por ejemplo, la eliminación ineficiente de células malignas o autoreactivas puede conllevar al desarrollo de un cáncer o una enfermedad autoinmune. Por el contrario, la muerte apoptótica excesiva puede resultar en una aberrante pérdida de células que culmina en eventos patológicos. Es evidente por tanto, que para que el organismo esté en homeostasis, debe haber una regulación muy fina y muy sutil en el proceso que induce a la muerte celular programada.

La apoptosis es necesaria durante el desarrollo cuando el exceso de células deben ser removidas, por ejemplo durante la morfogénesis. Sin embargo, con la edad, se pierde el control de esta delicada regulación dando como resultado, ya sea el retener células que deberían haberse eliminado, o bien, el eliminar otras que deberían haberse conservado (Wang et al., 1995). Algunos de los padecimientos más estudiados en los cuales se ha asociado al proceso del envejecimiento con una disminución innecesaria en el número de células por muerte apoptótica son las enfermedades neurodegenerativas, la disfunción cardiovascular, la atrofia muscular, los desórdenes intestinales y las enfermedades renales. El estado anti-apoptótico que presentan las células senescentes, es diferente de otros estados que resisten la apoptosis, ya que la mayoría de ellos escapan a la muerte celular de una manera que está relacionada con su rápida tasa de proliferación y culminan con su

transformación en células cancerosas. Esto no sucede en las células senescentes que se encuentran arrestadas.

EL hecho de que las células senescentes, que se encuentran metabólicamente alteradas, sean resistentes a la apoptosis, puede proveer a los tejidos de un número de células que dan sostén al tejido y hasta cierto punto mantienen su estabilidad y en algún grado su funcionalidad, pero una cantidad grande de ellas, puede ser perjudicial. La presencia de neuronas dañadas en el cerebro o de cardiomiocitos disfuncionales en el corazón, pueden comprometer la funcionalidad de todo el tejido o el órgano. Por lo que la acumulación de células senescentes puede contribuir al deterioro asociado al envejecimiento (Zhang y Herman, 2002). Lo anterior es consistente con la idea de que la apoptosis pueda funcionar como un mecanismo de defensa importante para deshacerse de células genéticamente inestables, y que la gran longevidad que manifiestan algunas poblaciones de ancianos centenarios sea debida a que han llevado a cabo el proceso de apoptosis de una manera muy eficiente a lo largo de su vida (Bree et al., 2002).

2.5 CROMATINA Y ENVEJECIMIENTO

Como se ha mencionado anteriormente, los procesos fisiológicos como la senescencia celular o la apoptosis, no se llevan a cabo de manera simultánea e idéntica en todas las células de un organismo, sugiriendo que, aunque exista un programa genético codificado en el ADN, la regulación en de este en cada individuo es un factor determinante.

La secuencia del genoma humano ha sido revelado recientemente, sin embargo, aunado a las respuestas que aportó esta contribución, han surgido inevitablemente una gran cantidad de preguntas. Los organismos de una misma especie comparten casi en su totalidad la secuencia de nucleótidos que los caracteriza como tales, pese a ello, son diferentes entre si.

Lo que implica que dicha secuencia no es la única información genética que posee una célula, y que por lo tanto, debe existir otro nivel de regulación que controle la expresión diferencial que tienen los genes de cada individuo durante las distintas etapas de su vida en respuesta a los diversos estímulos a los que se ve expuesto.

Actualmente se ha empezado a valorar la información que confiere la estructura de la cromatina a la expresión de los genes. La epigenética (*fuera de la genética*) es el estudio de las alteraciones estables en la expresión de los genes que surgen durante el desarrollo y la proliferación celular y, de manera muy importante, por la influencia del medio ambiente (Bandyopadhyay y Medrano, 2003). Desde hace más de dos décadas Macieira-Coelho (1980) propuso que el “envejecimiento en las células en proliferación” es el resultado de la reorganización del genoma que ocurre durante la división celular. A partir de ahí se ha sugerido que las modificaciones epigenéticas pueden tener un papel crítico dentro del fenómeno del envejecimiento celular y de los organismos (Lezhava, 2001; Issa, 2002; Ikura y Ogryzko, 2003).

2.5.1 *Mecanismos involucrados en las modificaciones epigenéticas*

Los cromosomas son estructuras heterogéneas con actividad genética, tiempo de replicación y grado de condensación variables. Dicha condensación depende de los diferentes arreglos en cuanto a la compactación y el doblamiento que puede tener el ADN genómico y es proporcionada principalmente por las proteínas de tipo histonas y no histonas que se asocian a él. La condensación estructural de los cromosomas se correlaciona con su funcionalidad: las regiones de cromatina altamente condensadas (heterocromatina) son generalmente inactivas, de replicación tardía y prácticamente carentes de transcripción; mientras que las regiones descondensadas (eucromatina) tienen

una alta capacidad funcional de traducción y replicación (Lezhava, 2001). Los distintos niveles en la organización de la cromatina dependen a su vez, de una estructuración más dinámica denominada nucleosoma, que representa la unidad básica de la cromatina. Cada nucleosoma mantiene enrolladas dos vueltas de la doble hélice del ADN sobre un octámero de histonas. El octámero se encuentra formado por un tetrámero de histonas H3-H4 y dos dímeros de histonas H2A-H2B. Los nucleosomas y el ADN se encuentran estabilizados por la histona H1. Las histonas son pequeñas proteínas básicas consistentes de dos dominios: uno globular y otro más flexible en el amino terminal con carga positiva, y que se denomina cola de la histona puesto que sobresale del nucleosoma.

Las remodelaciones principales que puede tener la cromatina consisten de cambios directos sobre la estructura del ADN sin perturbar la secuencia de nucleótidos (metilación del ADN) y modificaciones post-transcripcionales de las histonas.

2.5.2 *Metilación del ADN*

La metilación del ADN ocurre en bacterias, hongos, plantas y animales, sin embargo su papel varía dependiendo del organismo. En los genomas de invertebrados, a diferencia de los de vertebrados, la metilación no correlaciona con la localización de los genes. Por lo que se ha sugerido que este mecanismo se ha extendido y ha evolucionado en los vertebrados como un factor de control transcripcional (Hendrich y Tweedie, 2003). La metilación del ADN es uno de los mecanismos de supresión de la expresión génica o silenciamiento. En los mamíferos, este fenómeno se refiere específicamente a la metilación de la desoxicitosina (dC) en la posición 5 para formar una desoximetil-citosina (dmC) (figura 3). La mayoría de las dmC se encuentran en secuencias ricas en los dinucleótidos CG, por lo que se les conoce como “islas CpG”. Estas contienen múltiples sitios de unión a factores de

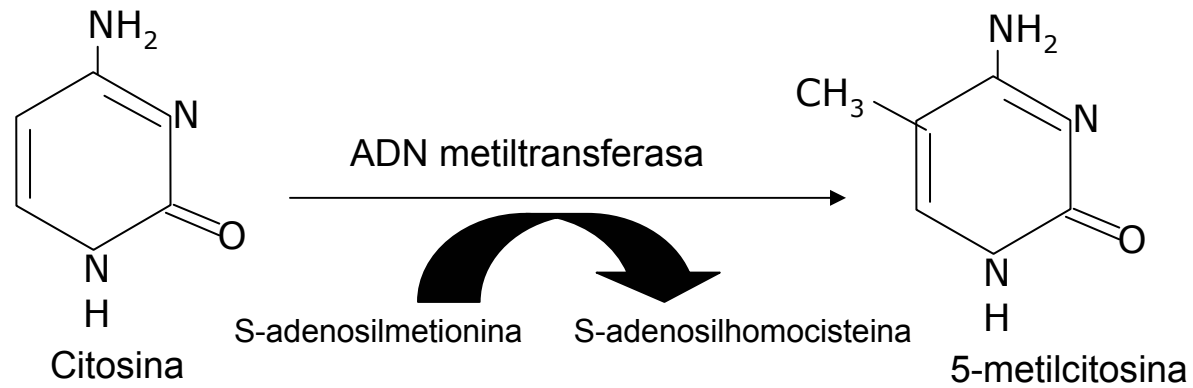


Figura 3: METILACION DE LAS CITOSINAS

Las enzimas ADN-metiltransferasas catalizan la transferencia del grupo metilo de la S-adenosinmetionina produciendo 5-metilcitosina y S-adenosilhomocisteina.

transcripción y sirven como promotores asociados a genes. La mayoría de los genes que se necesitan para regular la homeostasis celular (“Housekeeping genes”) contienen islas CpG (Richardson, 2003).

Hace algunos años se propuso que la pérdida gradual de la metilación podría funcionar como un “mecanismo de conteo” que llevara a las células a entrar en senescencia, ya que se encontró que la metilación en las islas CpG disminuía con el incremento en el número de duplicaciones de células en cultivo y durante el envejecimiento de los organismos (Wilson y Jones, 1983). Para reconciliar la idea de que la metilación del ADN reprime la transcripción con el hecho de que la metilación disminuye durante la senescencia, se ha planteado la idea de que la metilación podría reprimir una serie de genes inhibidores del ciclo celular que al desmetilarse inhibirían la proliferación. Esta hipótesis está sustentada en la demostración de que la inhibición de la DNA-metiltransferasa (DNMT) induce el arresto en el ciclo celular por la transcripción del gene *p21^{WAF1}* (Young y Smith, 2001).

Paradójicamente, existen reportes de un incremento progresivo en la metilación de las islas CpG asociado al aumento en la edad en múltiples loci de genes en el epitelio colorectal, que correlacionan con el silenciamiento de genes supresores de tumores y propensión al cáncer en ese tejido (Issa, 2002).

Es evidente que hace falta más estudios al respecto. Sin embargo, lo que queda claro es que los cambios en los patrones de metilación correlacionan con el envejecimiento y enfermedades asociadas a la desregulación del ciclo celular como el cáncer. Por lo que sería importante determinar si los cambios en la metilación del ADN se dan de una manera estocástica o programada, mientras los organismos envejecen, y si el medio ambiente y la dieta contribuyen a dichos cambios (Bandyopadhyay y Medrano, 2003).

2.5.3 *El código de las histonas*

Las modificaciones covalentes en los amino terminales de las histonas H3 y H4 contribuyen de una manera muy importante a la remodelación de la cromatina. Estas modificaciones, que incluyen acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, permiten un contacto regulado con la cadena del ADN. Lo anterior ha llevado a proponer lo que se conoce como el “Código de las Histonas” y significa que la exquisita combinación en las modificaciones de las histonas es reconocida por las diferentes proteínas que se asocian al ADN y puede llevar a la activación o al silenciamiento de la transcripción de genes (Jenuwein y Allis, 2001). Por ejemplo, la histona H3 tiene 4 sitios potenciales de modificación: Lis-4 (metilación), Lis-9 (metilación y acetilación), Ser-10 (fosforilación) Lis-14 (acetilación). La fosforilación en la Ser-10 facilita la metilación en la Lis-4 y la acetilación en las Lis 14 y 9. A su vez, la acetilación en la Lis-9 impide la metilación en ese mismo aminoácido, lo que correlaciona con activación del sitio. La metilación de la Lis-9 por su parte inhibe la acetilación de la Lis-14 y eso correlaciona con represión (figura 4).

En general, la acetilación se lleva a cabo por enzimas denominadas histona-acetil transferasas (HAT), una de las cuales es la proteína p300. La acetilación neutraliza las cargas positivas de las histonas y permite el acceso de factores de transcripción, así como de las ARN polimerasas, por lo que se dice que activa o abre la cromatina. Por el contrario, la desacetilación silencia o reprime la transcripción. Existen dos familias de enzimas con actividad de desactilasas de histonas (HDAC). La familia de las desactilasas clásicas que se subdivide en dos clases filogenéticas: HDAC clase I y HDAC clase II, y la familia de las proteínas Sir2 que son dependientes de NAD^+ , y que tienen papel muy interesante sobre el envejecimiento.

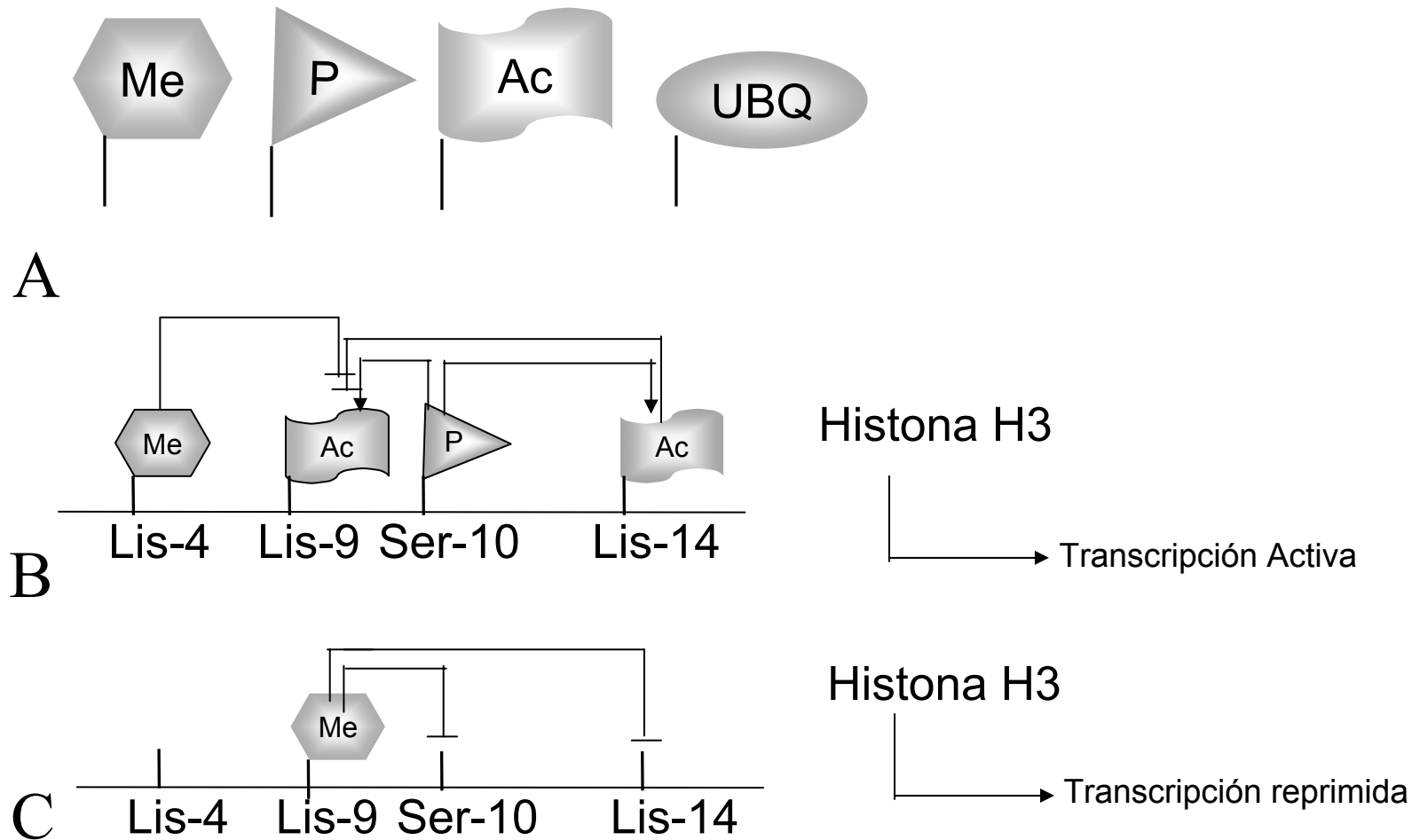


Figura 4: REMODELACIÓN DE LA CROMATINA (Código de las Histonas).

- A. Las modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las histonas son la metilación, la acetilación, la fosforilación y la ubiquitinación. Estos cambios generalmente se llevan a cabo en la cola de las histonas H3 y H4.
- B. Ejemplo de modificaciones postraduccionales en la histona H3 que activan la transcripción génica.
- C. Ejemplo de modificaciones postraduccionales en la histona H3 que reprimen la transcripción génica.

2.5.4. La familia de las desacetilasas de histonas Sir2 y la restricción calórica

El gene para la proteína Sir2p se describió originalmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y es el representante de una familia de genes identificados como componentes de represión transcripcional o silenciamiento del loci de apareamiento de *HML* y *HMR*, de ahí su nombre (SIR = Silent Information Regulator).

Además de su actividad como silenciadora de genes, la proteína Sir2 de levadura (ySir2p) se ha relacionado con la estabilidad cromosómica, la represión del ADN_r y el envejecimiento. Se ha sugerido que ySir2p y otros miembros de su familia se localizan en las regiones proximales de los telómeros y causan silenciamiento en esas zonas. Como las proteínas Sir también funcionan como reparadoras de rompimientos de cadena doble y pueden moverse al sitio de la lesión, las regiones proximales de los telómeros se consideran como “cuartos de espera” para las proteínas Sir mientras están en alerta de algún daño al ADN (Kimura et al., 2002).

Los primeros indicios de que sir2p estaba relacionada con la longevidad se dieron por estudios en los que se observó que la sobreexpresión de *sir2* aumentaba la longevidad en *Saccharomyces* (Kaeberlein et al., 1999). En esos momentos no se sabía que Sir2p era una desacetilasa de histonas. El descubrimiento de este hecho, así como de que Sir2p dependiera de NAD⁺, generó una teoría muy provocativa con respecto a la participación de la familia de proteínas Sir en la restricción calórica y el envejecimiento celular, puesto que relaciona el estado redox de la célula con la remodelación de la cromatina. Se ha sugerido que durante la restricción calórica, el flujo de carbonos en la glucólisis y el ciclo de Krebs es mucho menor que en las condiciones normales. Por lo que el cociente NADH/NAD⁺ se desplaza más hacia este último. Como resultado la cadena respiratoria es más lenta, está más acoplada y genera menos especies reactivas de oxígeno. Al mismo tiempo, hay más

NAD⁺ disponible para unirse a Sir2p que compacta y silencia la cromatina protegiendo al ADN de posibles daños. De esta manera se liga el efecto metabólico de disminuir la ingesta de calorías con la protección del material genético y la longevidad (figura 5).

Existen pocos estudios a este nivel en humanos, sin embargo, se ha demostrado que la proteína SIRT1 (homóloga de Sir2p), funciona como una desacetilasa de p53, previniendo la senescencia celular y la apoptosis inducida por daño al ADN y estrés (Vaziri et al., 2001). Estos estudios sugieren que las proteínas Sir en mamíferos pudieran tener otras funciones.

3. LA PROTEINA Bcl-2

Cada vez es más evidente que resulta imposible estudiar los fenómenos de apoptosis, ciclo celular y senescencia de manera independiente uno de los otros, ya que se encuentran sumamente interrelacionados. Esta relación se basa en que comparten una gran cantidad de moléculas (que antes se creía eran exclusivas de cada fenómeno), que utilizan vías de transducción de señales entrelazadas, además de que pueden inducirse por estímulos similares. Una molécula que ejemplifica lo anterior, es la proteína supresora de tumores p53, que se ha estudiado ampliamente y se relaciona tanto con la inducción de la muerte apoptótica como con el arresto de la proliferación celular (Hofseth et al., 2004). Así como p53, cada día se describen más conexiones entre estos fenómenos y proteínas con participación en todos ellos. Una de estas moléculas podría ser la proteína Bcl-2.

El gene *bcl-2* fue originalmente descubierto como el responsable del linfoma folicular humano de las células B, producido por la translocación cromosomal t (14;18) (Tsujimoto et al. 1984), que yuxtapone el locus de *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma-2) del cromosoma 18 con la cadena pesada de la inmunoglobulina J del cromosoma 14. Debido a que la región

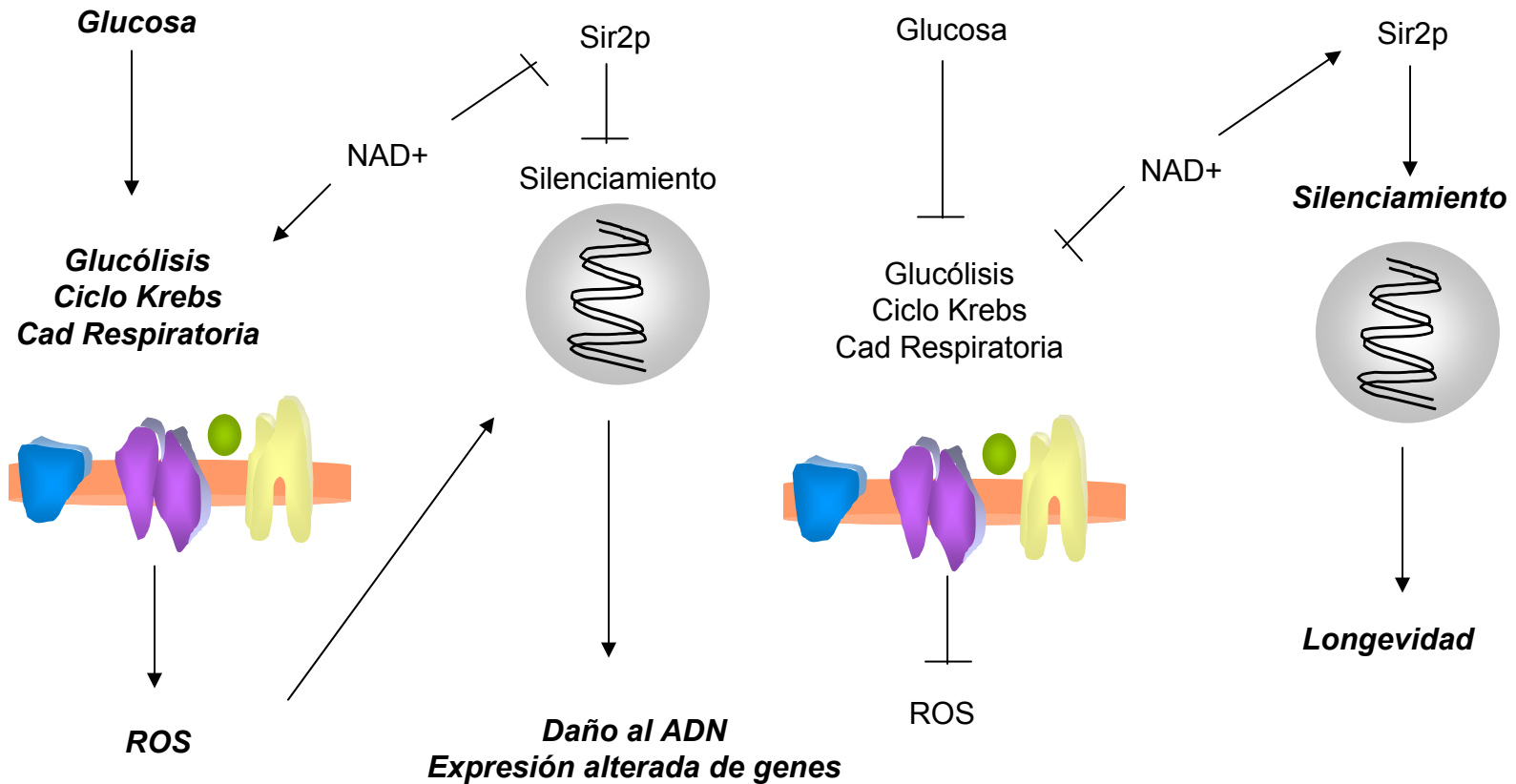


Figura 5: VINCULACIÓN DEL ESTADO REDOX CON LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA (Restricción calórica RC).

Durante el metabolismo normal, la cadena respiratoria produce especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproductos del metabolismo aeróbico de la glucosa. Las ROS dañan al ADN y modifican la estructura de la cromatina. Durante la RC disminuye la ingesta de glucosa, por lo que disminuyen las ROS. Al mismo tiempo, el balance de NADH/NAD⁺ se desplaza hacia este último. Ya que la proteína Sir2p es una desacetilasa de histonas dependiente de NAD⁺, se incrementa su actividad, silenciando a la cromatina, e impidiendo así daños y desarreglos. Lo que correlaciona con un aumento en la longevidad.

codificante queda bajo el control del promotor de la cadena J de la inmunoglobulina, el resultado es una sobreexpresión aberrante de *bcl-2* (Tsujimoto et al. 1987; Liu, 1994).

La proteína Bcl-2 tiene una masa molecular de 26 kDa y hasta la fecha se han reportado al menos 20 miembros de esta familia en células de mamífero y un mayor número en otras especies. Todos ellos relacionados con la supervivencia celular. Se ha agrupado a los miembros de esta familia básicamente en dos categorías: los miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1, Mcl-1, CED-9 en *C. elegans*, etc), y los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bcl-X_S, Bak, Bid, Bad, Hrk, etc) que a su vez se dividen en dos subfamilias.

3.1 Estructura de la proteína Bcl-2 y miembros de la familia.

En cuanto a su estructura, se sabe que todos los miembros de la familia poseen por lo menos uno de cuatro motivos conservados llamados *dominios homólogos de Bcl-2*, conocidos como BH1, BH2, BH3 y BH4. (por Bcl-2 Homology; figura 6). Los miembros pro-apoptóticos generalmente contiene a los cuatro dominios, mientras que los anti-apoptóticos presentan de 1 a 3 dominios. Las dos subfamilias pro-apoptóticas difieren en cuanto a su semejanza con Bcl-2. El grupo de Bax, Bak y Mtd son muy parecidas a Bcl-2 y contienen los dominios BH1, BH2 y BH3. Mientras que el otro subgrupo está constituido por componentes denominados “killers”, que incluye a Bid, Bad, Hrk y Bim, entre otros, sólo presentan el dominio BH3. Las proteínas de este grupo son bastante diferentes entre sí, por lo que se ha sugerido que el dominio BH3 es esencial para la función pro-apoptótica (Adams y Cory, 1998).

La estructura tridimensional de Bcl-X_L ya ha sido resuelta por espectroscopía de resonancia magnética nuclear y por cristalografía de rayos X (Muchmore et al., 1996; Aritomi et al.,

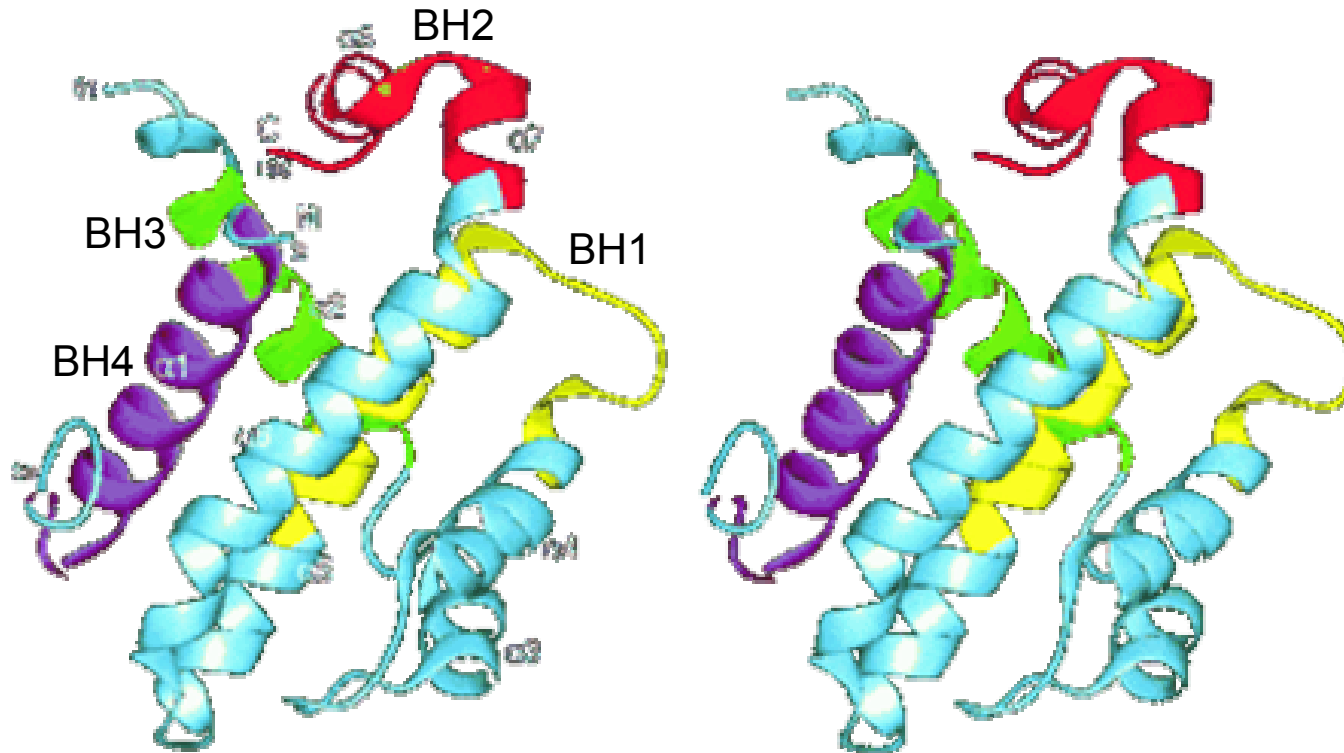


Figura 7: ESTRUCTURA PROPUESTA PARA Bcl-_{XL} DE RATA.

Esta estructura está basada en la determinación de cristalografía por rayos X.

Se observan los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 característicos de la familia de Bcl-2 con efecto pro-apoptótico. Los miembro anti-apoptóticos carecen del dominio BH4..

1997) indicando que Bcl-X_L contiene dos hélices hidrofóbicas centrales rodeadas por cinco hélices anfipáticas. Las regiones BH1, BH2 y BH3 están muy cercanas entre sí formando una hendidura hidrofóbica (figura 7). Se ha demostrado (Sattler et al., 1997) que esta hendidura es el sitio de unión para un péptido de la región BH3 de la proteína pro-apoptótica Bak. Así mismo se ha encontrado una semejanza notable entre la estructura terciaria de Bcl-X_L y la de algunas toxinas de origen bacteriano como la toxina de la difteria (Muchmore et al., 1996). Estas toxinas se insertan en las membranas externas de las células para translocar proteínas al interior, lo que ha sugerido la posibilidad de que las proteínas relacionadas con Bcl-X_L pudieran igualmente formar poros, lo cual ha sido confirmado únicamente *in vitro* (Basanez et al., 2001).

Los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 poseen un extremo carboxilo-terminal hidrofóbico (19-22 amino ácidos) que les sirve para anclarse a la membrana, sin ser una proteína integral. Bcl-2 y Bcl-X_L se localizan asociadas a la envoltura nuclear, a la membrana del retículo endoplásmico y en especial a la membrana externa mitocondrial (Reeds et al., 1998). La proteína pro-apoptótica Bax se localiza normalmente en el citosol, pero durante la apoptosis se transloca a la mitocondria donde se oligomeriza y se inserta dentro de la membrana. De manera similar, los miembros de la tercera familia (Bid, Bad y Bim) se localizan en el citosol y el citoesqueleto, y también se translocan a la mitocondria durante la apoptosis para interactuar con otros miembros de la familia de Bcl-2 (Baliga y Kumar, 2002).

3.2 Mecanismo de acción de los miembros de la familia de Bcl-2

Aún existen controversias con respecto a los mecanismos de acción de los miembros de la familia de Bcl-2, sin embargo se propone que Bcl-2 y Bcl-X_L previenen la apoptosis

controlando la permeabilidad mitocondrial (Adams y Cory, 1998; Reeds et al. 1998) e impidiendo la liberación del citocromo c por el canal de aniones dependiente de voltaje (VADC) (Shimizu et al. 1999). Se sugiere que tanto los miembros pro- como los anti-apoptóticos pueden dimerizarse entre sí, alterando tanto la función de unos como de otros. Al parecer, su concentración relativa puede actuar como modulador dentro del programa de muerte. Se propone que cuando dos proteínas anti-apoptóticas dimerizan entre si (formando homodímeros) la célula no inicia un programa de muerte, mientras que cuando se dimeriza una proteína anti-apoptótica con una pro-apoptótica (formando un heterodímero) se inicia la apoptosis (Otter et al. 1998). En estudios con mutantes de la familia anti-apoptótica que no pueden unirse a los miembros pro-apoptóticos, se ha descubierto que las células siguen manteniendo su función de supervivencia, por lo que se ha sugerido que las proteínas anti-apoptóticas son los reguladores cruciales del fenómeno de apoptosis (O'Connor y Strasser, 1999). Sin embargo, sería sobre simplificar el proceso el tratar de explicar un fenómeno de esta naturaleza únicamente en base a homodimerizaciones o heterodimerizaciones (figura 8).

Por otro lado, en estudios realizados con *C. elegans*, se ha reportado que la proteína CED-9 inhibe la apoptosis uniéndose a la proteína adaptadora CED-4 e impidiendo que esta interactúe con la caspasa CED-3. Por lo que se ha propuesto que Bcl-2 pudiera interactuar con el homólogo CED-4 en mamíferos, Apaf-1, para impedir que inicie la actividad de las caspasas en particular la procaspasa 9 homóloga de CED-3. Sin embargo, muchos de estos experimentos se han realizado *in vitro*, por lo que el mecanismo de acción de la proteína Bcl-2 y su familia aún queda por resolverse (Baliga y Kumar, 2002).

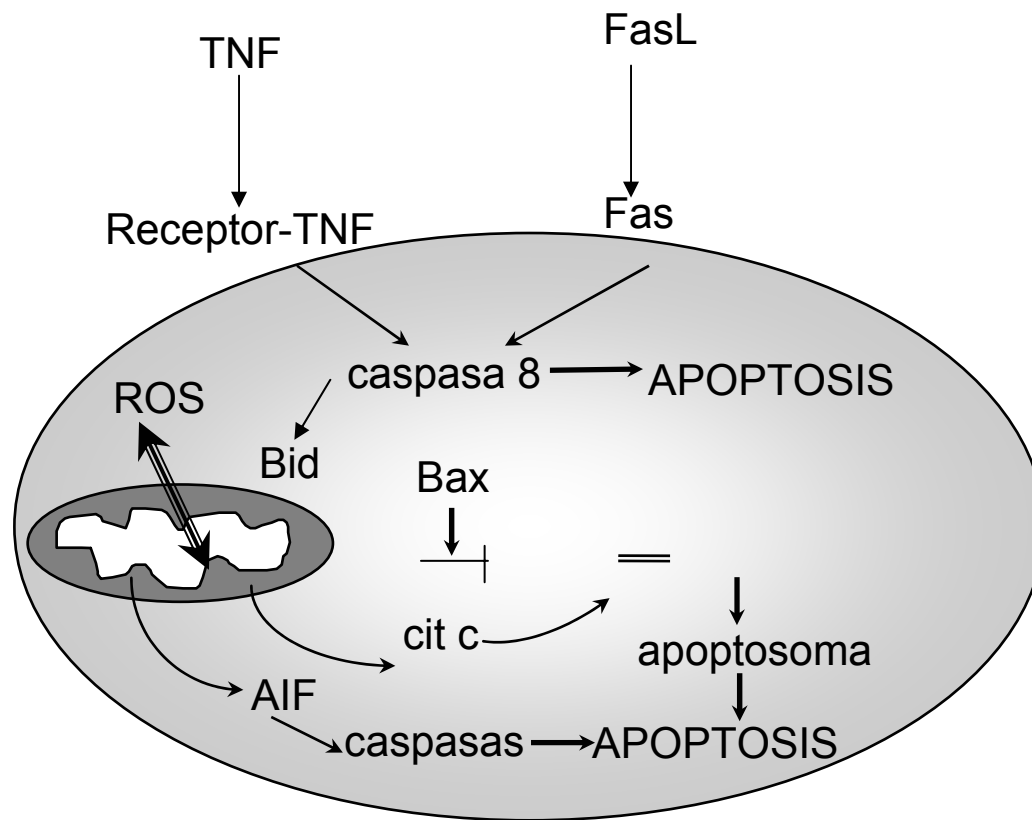


Figura 8: PARTICIPACIÓN DE Bcl-2 EN LA APOPTOSIS

La proteína Bcl-2 se encuentra anclada en la membrana externa mitocondrial. Cuando se encuentra como homodímero mantiene inhibidos a Apaf-1 y a la procaspasa 9 e impide la formación del apoptosoma. Cuando se libera el citocromo c, o cuando Bcl-2 forma un heterodímero con Bax, se liberan Apaf-1 y la procaspasa 9 y la célula inicia el proceso de apoptosis. Bcl-2 también se ha relacionado con impedir la salida del citocromo c de la mitocondria. Por todo ello se dice que Bcl-2 tiene una participación post-mitocondrial en el fenómeno de apoptosis.

3.3 Expresión de Bcl-2 a lo largo de la vida.

Otro hecho que dificulta el entendimiento de la función de Bcl-2, está relacionado con la expresión de esta proteína a lo largo de la vida. Existen reportes de que el contenido de Bcl-2 en las células T (Pahlavany y Vargas, 2001) y en el corazón de la rata (Phaneuf y Leeuwenurg, 2002) disminuye con la edad. Sin embargo, otros estudios realizados con cerebros de rata (Kaufmann et al, 2001) indican que la expresión de Bcl-2 aumentan con la edad como respuesta al incremento del estrés oxidativo.

En humanos, se ha reportado que en las células mononucleares de sangre periférica no hay modificación del contenido de Bcl-2 asociado a la edad (Monti et al., 2000). Mientras que en estudios con linfocitos humanos de individuos jóvenes (<35 años) y de individuos viejos (>60 años), se encontró una correlación entre el aumento en la expresión de Bcl-2 y la edad avanzada del paciente (Schindowski et al., 2000).

Esta variedad de resultados, lleva a pensar que el contenido de Bcl-2 pudiera depender del tipo celular o tejido. Mientras que los monocitos o las células T, son reemplazados constantemente, las células del corazón o de los pulmones tiene una menor velocidad de recambio, permitiendo que se incremente el contenido de Bcl-2 con la edad.

3.4 Bcl-2 como molécula antioxidante.

Además de su efecto anti-apoptótico, en los últimos años se ha reportado que la expresión de la proteína Bcl-2 protege contra el daño oxidativo (Hockenbery, 1993; Steinman, 1995), evita la lipoperoxidación (Hockenbery, 1993) y aumenta la longevidad celular (Liu, 1994). El mecanismo de acción de Bcl-2 en este sentido es aún incierto, pero su sitio de incidencia parece ser la mitocondria (Mignotte y Vayssiere, 1998). Se ha sugerido que Bcl-2 pudiera funcionar como protección antioxidante (Hockenbery et al, 1993; Wiseman 1996; Degli-

Esposti et al, 1999), sin embargo, se ha encontrado que Bcl-2 sigue evitando la apoptosis en eventos donde la generación de especies reactivas de oxígeno debería ser muy baja, *v.gr.* durante la anoxia (Jacobson y Raff, 1995). Además de que la evidencia experimental indica que no posee la capacidad de atrapar electrones de manera directa (Sato et al., 1999; Degli-Esposi et al., 1999). El grupo de trabajo de Halliwell (Lee et al.2001a) confirmó los datos previos, indicando que Bcl-2 no tiene una habilidad significativa en reducir los niveles de O_2^- ni de H_2O_2 , sin embargo, reportó que si disminuye los niveles de peroxinitrito ($ONOO^-$) y otras especies reactivas de nitrógeno. Esto resulta interesante puesto que se ha encontrado que cuando se disminuyen los niveles de Bcl-2, las células son más sensibles a la muerte inducida por ROS y disminuyen su vida media (Kumazaki et al., 2002).

Por otro lado, algunos investigadores han sugerido que Bcl-2 pudiera ser una molécula prooxidante (Steinman, 1995), ya que induce un aumento en los niveles de ROS, que a su vez alerta o prepara a la célula para que promueva la generación de sistemas antioxidantes. Se sabe que la sobreexpresión de Bcl-2 aumenta la actividad proteolítica del proteosoma, y de la enzima superóxido dismutasa de CuZn (SOD1) (Lee et al., 2001a; Lee et al., 2001b), además de incrementar los niveles de GSH (Meredith et al., 1998; Lee et al., 2001b) .

Por otro lado, también se ha explorado la posibilidad de que la proteína Bcl-2 esté involucrada en aumentar los sistemas de reparación del ADN, contrarrestando de esta manera los daños generados por las ROS (Deng et al., 1999).

3.5 Bcl-2 reguladora del ciclo celular

De manera contraria a lo que se pensaba cuando Bcl-2 fue descubierta, y a la idea que aún prevalece en algunas publicaciones, Bcl-2 no es el producto de un oncogen, ya que ni Bcl-

2, ni otras proteínas anti-apoptóticas de esta familia inducen la proliferación. Sin embargo, si pueden influir en el ciclo celular. Se ha venido confirmando en los últimos años que muchas proteínas que regulan de manera crítica el ciclo celular, pueden también inducir la muerte celular programada, y viceversa. Algunos componentes de la maquinaria apoptótica influyen en la regulación del ciclo. Este es el caso de Bcl-2 (y algunas otras proteínas anti-apoptóticas de la misma familia), que les permite influir en la transición entre el estado quiescente y el estado ciclante, y se encuentra separado de su papel en la supervivencia celular. Algunas mutaciones que eliminan la actividad de Bcl-2 sobre el ciclo celular, no eliminan sus funciones anti-apoptóticas. Sin embargo, no es posible separar totalmente estas funciones (Vairo et al., 1996).

Las células ciclantes son más vulnerables a la apoptosis, posiblemente porque en condiciones desfavorables para la proliferación, ciertos efectores del ciclo celular promuevan este fenómeno. El hecho de que Bcl-2 pudiera promover la quiescencia bajo condiciones de estrés podría, de manera indirecta, aumentar la supervivencia celular. Existen varios reportes que confirman que Bcl-2 arresta a las células en las fase G1 del ciclo celular, pero el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta nueva función es aún incierto (Kumazaki et al., 2002).

Se ha propuesto que el efecto de Bcl-2 no depende de p53 ni de p16 ya que Bcl-2 promueve la quiescencia en células que carecen de estos genes (Vairo et al., 2000), por lo que se ha sugerido que Bcl-2 pudiera actuar a nivel de reguladores negativos del ciclo celular como pudieran ser algunos inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDK) o bien proteínas de la familia de represores constitutivos tipo retinoblastoma que actúan formando complejos represivos con factores de transcripción (E2F), los cuales controlan la expresión de genes esenciales para la progresión del ciclo celular. Se ha sugerido un

modelo en el cual como respuesta a estímulos externos debidos a cambios en el medio ambiente o por inducción del estrés oxidativo, se incrementen la expresión de Bcl-2, y esta a su vez induce la expresión de p27 y p130. Se ha postulado un modelo en el cual Bcl-2 pudiera actuar uniendo su dominio N-terminal, cerca de la tirosina 28 a una proteína inductora aún no caracterizada. Los altos niveles de p27 disminuirían la actividad de la cinasa CDK-2 , mientras que la proteína p130 formaría complejos p130-E2F4 que reprimirían la transcripción de genes que permiten la entrada al ciclo celular como E2F1 (figura 9)(Vairo et al., 2000).

La capacidad antiproliferativa de Bcl-2 pudiera haber evolucionado como un mecanismo de modulación del potencial oncogénico de supervivencia celular excesiva (Adams y Cory, 1988). Para respaldar esta propuesta existen varios estudios que demuestran que la expresión inducible de Bcl-2 en líneas celulares de carcinoma endometrial y carcinoma pulmonar, promueven un arresto del ciclo celular con las características fenóticas clásicas de la senescencia replicativa. Aunado al hecho de que concentraciones elevadas de Bcl-2 se han asociado a una tasa de proliferación reducida y a una prognosis favorable en varios carcinomas humanos, mientras que una disminución selectiva en la expresión de Bcl-2 se ha observado durante la progresión de diversos tipos de neoplasias (Crescenzi et al., 2003).

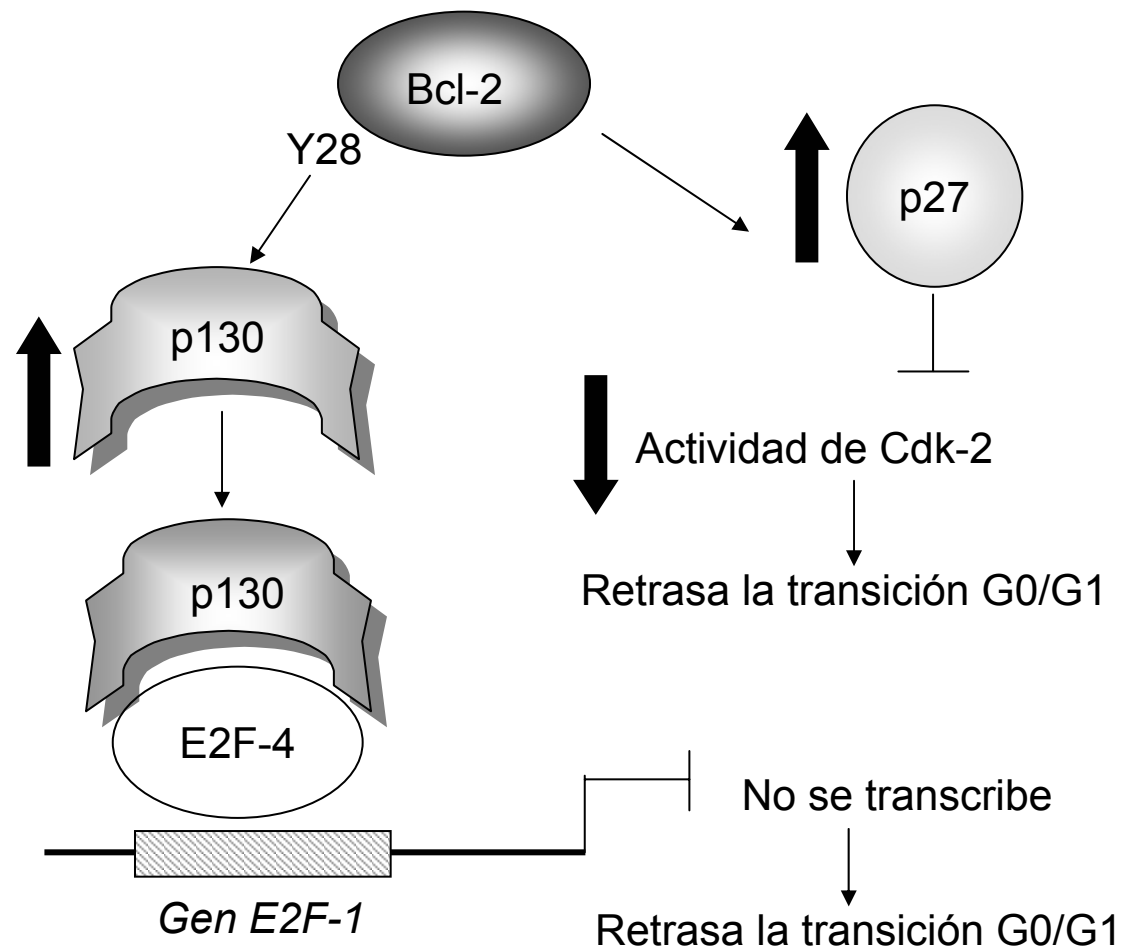


Figura 9: PARTICIPACIÓN DE Bcl-2 EN EL CICLO CELULAR

Se ha propuesto que la proteína Bcl-2 pudiera incrementar los niveles del inhibidor de Cdk's, p27, así como la de algunos represores constitutivos de la familia de la proteína del retinoblastoma Rb, específicamente de p130. El aumento en la concentración de estas proteínas retrasaría la transición de G0 a G1 retrasando el ciclo celular.

JUSTIFICACION

El objetivo de este trabajo fue el de tratar de entender el papel que juega la proteína Bcl-2 dentro de la regulación e inducción de la senescencia y explorar si ese papel se encuentra relacionado con la protección contra el estrés oxidativo. El comprender como funciona Bcl-2 resulta importante en cuanto a que, esta proteína pudiera jugar un papel clave dentro de las cascadas de señalizaciones que inducen a una célula a tomar la vía de la apoptosis, la senescencia o continuar con una proliferación aberrante que la podría llevar a generar cáncer. Así mismo, el estudiar el fenómeno de senescencia y situarlo como otra respuesta celular al estrés (distinta de la apoptosis o la necrosis), abre el panorama dentro del campo de estudio de la biología celular, e incluso del estudio de varias enfermedades.

Uno de los problemas que a los cuales se ha enfrentado el campo de la gerontología es la dificultado en elegir un modelo de estudio. Puesto que es muy difícil estudiar el envejecimiento en mamíferos, por la larga vida que tienen los animales. Una opción que ha surgido, es la de emplear células en cultivo, sin embargo, las líneas celulares que se utilizan son líneas de origen embrionario que senescen en cultivo después de un cierto número de duplicaciones, pero no se sabe hasta que punto representan al fenómeno de envejecimiento *in vivo* que ocurre de manera paulatina a lo largo de muchos años de vida. De ahí la importancia de analizar si las células de animales jóvenes al envejecer en cultivo presentan las mismas características fenotípicas y fisiológicas que los cultivos de células obtenidas de animales que van envejeciendo de manera paulatina a lo largo de los años.

Los dos objetivos planteados en este trabajo ayudarán a comprender los mecanismos que conllevan al envejecimiento y el deterioro asociado a este proceso. Este trabajo se encuadra dentro de lo que es la ciencia básica, pero sus implicaciones a largo plazo pueden llevar a ser relevantes en la ingerencia sobre una disminución del deterioro asociado a la edad.

En México, carecemos de grupos de trabajo tanto clínicos como básicos, que estudien el envejecimiento desde este punto de vista. Es por ello, que es de interés crear y consolidar un grupo de investigación que se dedique al estudio del envejecimiento celular a nivel básico, pero cuyas investigaciones se puedan aplicar a la clínica. El desarrollar líneas de investigación que se avoquen al estudio del envejecimiento nos dará más herramientas en la prevención del deterioro asociado al mismo, así como en el tratamiento de las enfermedades propias de la tercera edad.

HIPOTESIS

El envejecimiento está relacionado a la acumulación de daños generados por estrés oxidativo, por lo que si se sobreexpresara una proteína que contrarresta el estrés oxidativo, como la proteína Bcl-2, se esperaría observar que se prolongue la viabilidad celular y se retrase la aparición de la senescencia.

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 confiere un efecto protector al estrés oxidativo y si retrasa la entrada a la senescencia de cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón.
2. Evaluar si el fenotipo senescente adquirido por los fibroblastos provenientes de animales jóvenes *in vitro*, es similar al que presentan los fibroblastos de animales viejos durante el proceso de envejecimiento *in vivo*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar en los cultivos primarios derivados de los ratones jóvenes y de los ratones viejos cuatro parámetros asociados al envejecimiento como son: la proliferación celular, la incorporación de timidina, el ensayo MTT y la tinción SA- β -gal .
2. Cuantificar los niveles de ROS en las células provenientes de los animales jóvenes y los viejos.
3. Evaluar si existe una diferente susceptibilidad al estrés oxidativo del ADN de animales jóvenes en comparación con el de animales viejos.
4. Cuantificar los niveles de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios provenientes de los animales jóvenes y de los viejos en diversas etapas del cultivo.
5. Cuantificar los parámetros de senescencia en los cultivos primarios obtenidos de los ratones jóvenes y de los ratones viejos, que sobreexpresen Bcl-2.
6. Evaluar la capacidad protectora de la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en cuanto a la prolongación de la viabilidad celular y un posible retraso en la aparición de la senescencia.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y la mayoría de ellos fueron comprados a Sigma. Los reactivos obtenidos de otras compañías se mencionan en el texto.

Modelo de estudio

Se utilizaron ratones hembra de la cepa CD1 mantenidos en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa (UAM-I), cuidados conforme a los principios de la norma oficial mexicana 062-ZOO-1999.

La apertura vaginal para las hembras de esta cepa ocurre entre los 50 y 60 días de nacidas, por lo que a esta edad se les puede considerar como adultos jóvenes, completamente desarrollados y capaces de reproducirse (Altamirano, 1994). Se ha determinado que la edad reproductiva útil de las hembras de pie de cría de la mayoría de las cepas de murinos es de 8 a 9 meses, con aproximadamente de 6 a 8 camadas en total (Zurcher et al., 1982). Después de ese lapso de tiempo, las hembras se deterioran física y fisiológicamente presentando un fenotipo francamente envejecido, caracterizado por un aumento en la aparición de tumores, pérdida de pelo y debilidad.

Existe el reporte de hace bastantes años, de un estudio realizado con 15 cepas de ratones “*inbreed*” descendientes de las familias de crianza de la fundación Jackson-lab para desarrollo y cría de animales, en el cual las hembras vírgenes de 14 de las 15 cepas estudiadas, sobrevivieron significativamente más (de 20 a 25%) de lo que lo hicieron sus hermanas dedicadas al pie de cría (Russel, 1964).

Por lo cual, en este trabajo se consideró a las hembras vírgenes de 2 meses edad con apertura vaginal como adultos jóvenes totalmente desarrollados y a las hembras de pie de cría, de 12 a 14 meses de edad como animales deteriorados y viejos.

De estos animales se extrajeron los pulmones de los cuales se aislaron los fibroblastos para obtener los cultivos primarios para la mayor parte de los experimentos que se realizaron en el trabajo. Existen básicamente dos razones para ello:

1. Debido a que los pulmones son órganos que se encuentran expuestos de manera constante a altas presiones parciales de oxígeno, se ha visto que se pueden inducir respuestas particulares al estrés oxidativo que no son comunes en otros tejidos (López-Torres et al., 1993).
2. Los fibroblastos en general, y los derivados de pulmón o de piel en particular, se han usado frecuentemente con gran éxito como modelo de estudio en trabajos relacionados con la senescencia celular (Dimri et al., 1995; Campis, 2000; Lueken et al., 2004).

Es importante aclarar que en algunos experimentos se realizaron tratamientos *in vivo* directamente con los ratones y posteriormente se extrajo el hígado de estos animales. En dichos casos, se emplearon los mismos criterios referentes a la edad y sexo antes mencionados.

PARTE I: MÉTODOS PARA EVALUAR LOS PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

1. OBTENCIÓN DE LOS FIBROBLASTOS DE PULMÓN

Se empleó la metodología de Doyle y colaboradores (1998). Se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Se desinfectaron con etanol al 70% y se abrió la parte superior del

tórax. Se removieron los pulmones enteros y se transfirieron a un tubo cónico (Falcon) de 50 ml que contenía 10 ml de PBS con 2% de antibiótico-antimitótico (antibac, GIBCO, BRL), para enjuagarlos. Posteriormente, se transfirieron a una caja de Petri con PBS + 2% de antibac, en la que se cortaron en fragmentos menores a 1 mm^3 . Los fragmentos se lavaron 3 veces con la misma solución utilizando una jeringa para no perder el tejido. Después del último lavado, se aspiró la solución y se agregó tripsina 0.25% diluida 1:1 con PBS + antibac. Los pedazos de tejido se incubaron a 37°C por 10 min. Pasado ese tiempo se retiró la tripsina con la jeringa y se volvió a lavar con PBS + antibac. Se agregaron 10 ml de colagenasa tipo IA al 0.3% y se incubó a 37°C por 1 hora. Después de la incubación se agregaron 15 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado (Hyclone), con 1% de antibac. Se repartió el homogenado celular en las cajas de Petri, que se guardaron en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 en el aire a 37°C . El medio se cambió cada tercer día.

2. PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

Como se mencionó anteriormente, el envejecimiento se puede definir como el deterioro progresivo de las funciones metabólicas, bioquímicas y estructurales de un organismo, así como una pérdida en la capacidad reproductiva. Es por ello que, para comparar las células obtenidas de los animales jóvenes con las obtenidas de los animales viejos, se decidió analizar específicamente algunos de los conceptos anteriores, que sirvieran como parámetros que reflejen la funcionalidad celular, así como su capacidad proliferativa.

Una vez obtenido el cultivo primario, se dejó que las células proliferaran hasta obtener la cantidad suficiente para realizar todas las determinaciones. Este tiempo fue de alrededor de

6 días. Por lo que, una vez que se alcanzó la cantidad necesaria de células, se despegaron con tripsina al 0.25%, se contaron en un hemocitómetro y se sembraron en placas de 48 pozos a una densidad de 5,000 células por pozo. En este momento se sembraron todos los pozos necesarios para realizar cada una de las determinaciones de los 4 parámetros, cada segundo día y por triplicado, a lo largo del tiempo de vida de los cultivos o hasta que el cultivo iniciara la fase de senescencia replicativa.

Los cultivos se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (Hyclone), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100mg/ml) y 1% de aminoácidos esenciales (Microlab). Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad, y se les cambió el medio cada tercer día. Los experimentos se realizaron siempre con cultivos subconfluentes. Para evitar resultados inespecíficos, cuando las células de algún pozo llegaban a confluencia, el contenido celular completo del pozo se transfería a un pozo más grande.

2.1 Proliferación celular

La proliferación se determinó contando todas las células vivas en un pozo. Cada día del experimento, las células se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina-EDTA 0.25%. Se tomó una alícuota de 20 µl de suspensión celular y se le agregaron 20 µl de azul de tripano. Después de homogenizar, se tomaron 10 µl de esta suspensión y se contaron las células utilizando un hemocitómetro y un microscopio óptico. Se contaron cinco campos para cada determinación. El resultado fue el promedio del número de células contado $\times 10^4$ por ml.

2.2 Determinación de la funcionalidad Mitocondrial (Ensayo de MTT).

Esta técnica se usó para evaluar la actividad mitocondrial de manera indirecta (Mosman, 1983), así como para medir los radicales libres del tipo del superóxido que son los que se generan de la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinana (Turrens, 1985) y que por su potencial redox también pueden reducir al MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio].

Para realizar el ensayo, se retiró el medio de los pozos con las células correspondientes al día del experimento y lavaron cuidadosamente con PBS. Se retiró el PBS y se agregó 1 ml de MTT (Sigma) (0.5 mg/ml) pH 7.5. Las células se incubaron durante 3 h a 37 °C. Se retiró el MTT y se agregaron 800 µl de solución de extracción (HCl 0.04 M en isopropanol) a cada pozo. Las placas de cultivo se colocaron sobre un plato de agitación (Thermolyne AROS 160) durante 15 min a temperatura ambiente para disolver el formazán. El contenido de cada pozo se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). El valor de fondo se midió a 630nm y ese valor se restó a cada determinación. La funcionalidad mitocondrial se determinó como densidad óptica (D.O.) por número de células y los resultados se presentan normalizados.

2.3. Síntesis de ADN: Incorporación de timidina tritiada

Para estimar la síntesis de ADN, una alícuota de 1 µCi de [³H]-timidina (NEN, USA) se agregó al medio de cultivo después de que las células habían sido lavadas con PBS. Las células se incubaron a 37°C por 24 h para permitir que la timidina se incorporara. Pasado ese tiempo, 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 cuidadosamente con PBS dos veces más. Posteriormente se agregaron 500 µl de NaOH 0.2 N por pozo para hidrolizar el ADN, y se mantuvo en incubación durante toda la noche a 37°C. Al otro día, se transfirió el contenido de cada pozo a un vial que contenía 5 ml de líquido de centelleo (120g de naftaleno, 8g de 2,5-difeniloxazol (PPO), 0.4g de 2,2'-p-fenilen-bis(5-feniloxazol) (POPOP), 200 ml de metanol, 40 ml de etilenglicol, 2000 ml de dioxano). La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman LS 6500). Los resultados se reportan como cpm por número de células.

2.4 Senescencia Celular: ensayo SA- β-gal

Para realizar la tinción según la técnica de Dimri y colaboradores (1995), se retiró el medio a las células, se agregaron 500 µl de solución fijadora (PIPES 0.1 M, pH 6.9 ; 2% de paraformaldehído; MgCl₂ 2 mM y EGTA 1.25 mM, pH 8.0) y se dejó incubar durante una hora a 37 °C. Posteriormente se retiró la solución fijadora y se realizaron tres lavados con PBS. Inmediatamente después se añadieron 300 µl de la solución de X-gal [K₃Fe(CN)₆ 5 mM; K₄Fe(CN)₆·3H₂O 5 mM, pH 6.0; X-gal 1 mg/ml (Promega)], y se incubaron las células a 37°C hasta el día siguiente.

La cuantificación se hizo contando el número de células teñidas y sin teñir por pozo, usando un microscopio óptico. Se contaron aproximadamente 100 células por pozo.

PARTE II: DAÑO BASAL EN EL ADN Y RESPUESTA FRENTE A UN RETO DE ESTRÉS OXIDATIVO.

3. INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO in vivo

El tetracloruro de carbono (CCl_4) es un compuesto que se usa de manera frecuente para generar hepatotoxicidad ya que su transformación metabólica en el sistema de oxidasas de la familia del citocromo P450 genera radicales libres como el triclorometilperoxilo (CCl_3^\bullet), (Hasler et al, 1999; Cancino, 2001; Beddowes et al., 2003).

En este proyecto se administró CCl_4 de manera aguda para inducir daño por estrés oxidativo sobre el ADN de los hígados de los ratones jóvenes y viejos. Se emplearon 4 grupos de tres animales cada uno. Los grupos a y b estaban formados por los animales jóvenes y los grupos c y d por animales viejos. A los grupos a y c se les inyectó intraperitonealmente 0.16 ml/ Kg de peso de CCl_4 1:5 en aceite mineral durante 3 días consecutivos. A los grupos b y d (controles) se les inyectó la misma cantidad de aceite mineral durante los mismos 3 días. Los ratones fueron sacrificados el cuarto día por desnucación, se extrajeron los hígados y se congelaron a -70°C para posteriormente aislar el ADN.

4. INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO *in vitro*

Para inducir estrés oxidativo en las células en cultivo, se empleó al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se usa de manera habitual en cultivos de diversos tipos celulares como los fibroblastos de piel y de pulmón (Lueken et al., 2004).

Se usó una dosis subletal de H_2O_2 de 0.3 mM ya que se determinó que al someter a las células a esta dosis por 15 -30 min se generaba daño al ADN sin causar la muerte.

Es importante aclarar que el H_2O_2 se degrada fácilmente de manera natural, por lo que en cada ocasión que se utilizó, se determinó la concentración espectrofotométricamente. Para ello se tomaron 100 μl de H_2O_2 , se mezclaron con 100 ml de agua desionizada y se

cuantificó su absorbancia a 240 nm. Se calculó la concentración molar con la siguiente fórmula:

$$M = \frac{D.O. \times 1000}{35.76}$$

5. EXTRACCIÓN DE ADN DE HÍGADO DE RATÓN

Para aislar el ADN se empleó la técnica de Weng y colaboradores (1994) modificada por el grupo de la Dra. Medeiros (matos et al., 2001). Una vez obtenido el hígado de los animales tratados con CCl₄, se lavó con PBS, se pesó 1 g de tejido y se transfirió a un tubo con 5 ml de amortiguador A, frío (sacarosa 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0.1 mM, 1% Tritón X-100, pH 7.5). Se homogenizó el tejido y se centrífugo a 1500 x g, 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron otros 5 ml del amortiguador A. Se resuspendió el botón y se volvió a lavar a 1500 g, 4°C por otros 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 6 ml de amortiguador B (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 5 mM, desferroxamina 0.15 mM, pH 8.0). Se resuspendió el botón y posteriormente se agregaron 350 µl de SDS 10% y se agitó levemente. A continuación se agregaron las RNAsas previamente disueltas en el amortiguador C (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, desferroxamina 2.5 mM, pH 7.4), 20 µl de RNAsa T1 (solución madre 1000 U/ml) y 30 µl de RNAsa A (solución madre 10 mg/ml) y se agitó ligeramente. Se incubó 1h a 37°C; pasado ese tiempo se agregaron 300 µl de proteinasa K (solución madre 20 mg/ml, preparada al momento), y se incubó otra hora a la misma temperatura. Al término de la incubación se centrífugo a 5000 x g, 4°C por 15 min. Se recuperó todo el sobrenadante y se le agregaron 4 ml de solución de NaI (NaI 7.6 M, Tris-HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, desferroxamina 0.3 mM, pH 8.0) y 8 ml de isopropanol 100% fríos. Se

agitó el tubo suavemente por inversión y se guardó en el congelador hasta el día siguiente. Pasado ese tiempo, se centrifugó todo el contenido de los tubos a 9000 x g , 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 5 ml de isopropanol al 60% frío y se centrifugó a 9000 x g , 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de etanol al 70% frío, para volver al lavar el ADN a 9000 x g , 4°C por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón el 500 µl de desferroxamina 0.1 mM.

6. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

Se tomaron 10 µl del ADN extraído del hígado de los ratones y se les agregaron 990 µl de H₂O. Se determinó su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectro UV-VIS (Beckman DU 640). Para obtener la concentración de ADN se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\mu\text{g/ml}] = 100 (50) (\text{Abs}_{260}).$$

Para determinar la pureza del ADN en cuanto a su posible contaminación con proteínas se determinó el coeficiente 260/280, tomando como aceptable un valor mayor a 1.5

7. HIDRÓLISIS DEL ADN

Para hidrolizar el ADN obtenido se usó la metodología de Matos y colaboradores (2001). A cada 100 µg de ADN se le agregaron 2 µl de acetato de sodio 1 M, pH 5.0, 2.5 µl de Nucleasa P1 (solución madre de 0.4 U/µl) y el agua necesaria para completar 100 µl (incluyendo todas las enzimas de hidrólisis). Se dejó incubar a 37°C por 30 min. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 4 µl de Tris-HCl 1.0 M, pH 7.4, y 13.5 µl de fosfatasa alcalina (solución madre de 0.22U/µl) disuelta en amortiguador de fosfatasa (glicerol 50%, MgCl₂ 50 mM, ZnCl₂ 0.1 mM, pH 7.5), y se incubó a la misma temperatura por 1 h más.

Inmediatamente después se inyectó el ADN hidrolizado al HPLC.

NOTA: Todo el procedimiento debe hacerse en tubos protegidos de la luz y al finalizar la hidrólisis se deben conservar los tubos en hielo hasta su inyección. La hidrólisis se debe realizar el mismo día en que se inyecta, ya que el 8OHdG es inestable.

8. CUANTIFICACIÓN DEL DAÑO AL ADN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN

La cuantificación del aducto 8-OHdG se hizo usando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según la técnica de Park y colaboradores (1998) modificada por el grupo de la Dra. Medeiros (Matos et al., 2001). Se utilizó una bomba marca Waters modelo 600 acoplada a un detector UV-VIS Waters 486 operado a 254nm y posteriormente a un detector electroquímico marca Antec Leyden Modelo Intra a 290 mV.

Para la separación se usó una cromatografía isocrática de fase reversa con una columna LC18 Supleco de 25 cm x 4.6 mm y 5 μ m. La fase móvil consistió en 92% de amortiguador de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 50 mM a pH 5.5, 8 % de metanol, y 6 mM de KCl. El flujo fue de 1 ml/min y se degasificó con He durante todo el proceso. Se inyectaron 100 μ g de ADN hidrolizados en un volumen de 100 μ l.

La cuantificación de la concentración se hizo integrando el área bajo la curva de los picos de las guanosinas oxidadas (8-OHdG), que se detectan únicamente con el detector electroquímico, dividiendo este valor entre las guanosinas totales (dG) que se detectan en el UV-VIS. El resultado es un cociente que se reporta de la siguiente manera: 8-OHdG residuos/ 10^6 dG.

Para la curva patrón del 8-OHdG se usó el estándar 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina marca *esa*. Se inyectaron concentraciones conocidas del estándar desde 20 nM (2pmol/ 100 µl) hasta 2 nM (0.2 pmol/ 100 µl).

Como el 8-OHdG es inestable, debe mantenerse oculto de la luz y en refrigeración. La concentración se cuantificó espectrofotométricamente usando $2600 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que es el coeficiente de extinción molar a 246 nm. (Existe otro coef. de extinción a 293 nm con un valor de $9600 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Para la curva de dG se usó 2'-desoxiguanosina de sigma a concentraciones crecientes de 25 a 300 nM.

9. ELECTROFORÉISIS UNICELULAR ALCALINA (Ensayo Cometa)

Para llevar a cabo el ensayo cometa (Tice, 1994; Betancourt et al., 1995) se utilizaron cultivos semi-confluentes de fibroblastos de pulmón de los ratones jóvenes y viejos, sembrados en cajas de 6 pozos (60 mm de diámetro). Los cultivos se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento y se sometieron a un nivel de estrés oxidativo subletal con 0.3 mM de H_2O_2 en DMEM que contenía 10% de SFB y se incubaron a 37°C por 30 min. Pasado ese tiempo se despegaron usando tripsina 0.1 %-EDTA y se centrifugaron para obtener un botón celular el cual se resuspendió posteriormente en agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%.

Por otro lado, se prepararon microgeles en portaobjetos esmerilados con tres capas de agarosa: la primera capa fue de agarosa regular al 1%, la segunda y tercera capas fueron de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%. En la capa de en medio se encontraban las células. Los geles se despositaron en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, NaOH 0.25 M, Tritón 1%, DMSO 10%, pH 10.0) a 4°C en la que permanecieron toda

la noche, para precipitar las proteínas. A continuación, los geles se sumergieron en la solución de electroforesis alcalina (NaOH 300 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH 13.0) en la cual permanecieron por 20 min antes de iniciar la electroforesis que se llevó a cabo a 300 mV y 25 mA, por 20 min. Una vez terminado el proceso, los geles se enjuagaron con solución de neutralización (Tris 0.4 M, pH 7.4) tres veces por 5 min y se tiñeron con bromuro de etidio (0.1 g/ml). Se guardaron los geles en cámaras húmedas a 4° C durante toda la noche y posteriormente se cuantificó el daño al ADN como la longitud de la cola del cometa medida en μm , en un analizador de imágenes Sinóptics. Los experimentos se realizaron por triplicado en eventos independientes de los cuales cada vez se cuantificaron cincuenta cometas de cada condición experimental.

10. NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se determinaron los niveles de radicales libres mediante citometría de flujo usando al fluoróforo diacetato de diclorodihidrofouresceina (DCFH₂) (Cathcart et al., 1983; Bass et al., 1983). Se emplearon cultivos celulares semiconfluentes que se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento (días 15 al 19). El día del experimento, las células se despegaron y se resuspendieron en PBS conteniendo 4 μM de DCFH₂ a una concentración aproximada de 500,000 células por ml. Se incubaron a temperatura ambiente y en la oscuridad por 15 min para cargar a las células con el fluoróforo. Posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min para eliminar el DCFH₂ no incorporado y se resuspendieron en 1 ml de PBS, y se les agregó el H₂O₂ a una concentración de 0.3 mM por 30 min. Inmediatamente después se cuantificó la fluorescence en un citómetro de flujo FacsCalibur (Beckton Dickinson)

excitando a 480 nm y analizando la intensidad de fluorescencia a 520 nm. Los resultados se analizaron con el programa CELLQuest y se expresan de manera normalizada como intensidad de fluorescencia (IF) que viene siendo el resultado del promedio de la intensidad de fluorescencia por el porcentaje de eventos monitoreados.

PARTE III: LA PROTEÍNA Bcl-2

A. NIVELES ENDÓGENOS DE LA PROTEÍNA Bcl-2

Para determinar el contenido de la proteína Bcl-2 a lo largo de la vida de los ratones, se realizaron inmunoensayos tipo Western de homogenados de pulmón a diferentes edades. Se emplearon ratones hembra de la cepa CD1 tomando en cuenta los criterios antes mencionados. Se obtuvieron los pulmones de ratones neonatos y de una semana de vida, así como de 1, 4, 8 y 12 meses.

Por otro lado, para establecer si la senescencia *in vitro* correlaciona con un incremento en el contenido de la proteína Bcl-2, se realizaron de manera paralela inmunoensayos tipo Western de células en fase de crecimiento logarítmico (15 días de cultivo) y se comparó el contenido de Bcl-2 con el de células senescentes (a los 30 días del cultivo). Esto se realizó tanto para las células provenientes de los ratones jóvenes como de los viejos.

11. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS PARA INMUNOENSAYO TIPO WESTERN

Para obtener las proteínas totales de los homogenados, se extrajeron los pulmones, se depositaron en PBS, se cortaron y se homogenizaron en aproximadamente 1 ml de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO₃, 10 µg/ml aprotinina, 5 mM PMSF y 10 µg/ml leupeptina). El volumen de

la solución de lisis usada dependió del tamaño de los órganos de los individuos. Los homogenados se incubaron a 4°C por 5-10 min. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se colectó y la proteína aislada se guardó a -20 °C para posteriormente cuantificar su concentración y realizar el inmunoensayo tipo Western. Todo el procedimiento se llevó a cabo en frío.

Para la extracción de las proteínas de las células, se empleó el mismo procedimiento, pero en presencia de distintas concentraciones de los inhibidores de proteasas (1 µg/ml aprotinina, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptina). Así mismo, se tuvo mucho cuidado de lavar muy bien a las células con PBS antes de agregar de 50 a 100 µl de la solución de lisis, para eliminar los restos de medio y de suero que pudiera quedar. Posteriormente se incubaron en frío por 5 min, y después se despegaron con un gendarme de goma y se siguió el mismo procedimiento mencionado para los homogenados de pulmón.

12. INMUNOENSAYO: WESTERN BLOT

La determinación de proteínas se llevó a cabo usando el reactivo comercial Bradford (Bradford, 1976) de Bio-rad. Se preparó un gel desnaturizante de acrilamida al 13% (Laemmli, 1970) en el cual se obtuvo una buena separación de la proteína Bcl-2 que pesa 26 kDa. El gel se preparó de la siguiente manera:

| En este orden se agregaron los reactivos | GEL SEPARADOR | GEL CONCENTRADOR |
|--|------------------|------------------|
| | Vol. final 15 ml | Vol. final 10 ml |
| H ₂ O | 4.6 ml | 5.7 ml |
| Tris 1.5M, pH 8.8 | 3.75 ml | - |
| Tris 0.5M, pH 6.8 | - | 2.5 ml |

| | | |
|--|---------|---------|
| Acrilamida 30%: Bisacrilamida 0.8 % | 6.5 ml | 1.67 ml |
| | Agitar | Agitar |
| SDS 10% | 0.15 ml | 0.1 ml |

Justo antes de verterlo en los vidrios se agregó:

| | | |
|----------------|------------|-------------|
| TEMED | 10 μ l | 10 μ l |
| Persulfato 10% | 50 μ l | 100 μ l |
| | Agitar | Agitar |

Se cargaron aproximadamente 40 μ g de proteína en cada carril. Posteriormente se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa (Bio-rad). La membrana se bloqueó con TBS-Tween 0.1% + 5% de leche descremada por 1 h, y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario, α -Bcl-2 (Neomarker) por 2 h. Se hicieron de 3 lavados consecutivos con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario, α -mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) por 1 h. Después de otros 3 lavados iguales a los anteriores, se reveló usando un agente quimiolumincente comercial (Supersignal[®] Pierce)

SOBREEXPRESION DE LA PROTEINA Bcl-2

Para determinar si un incremento en la concentración de la proteína Bcl-2 confería a las células alguna protección contra el daño por estrés oxidativo, se decidió sobreexpresar dicha proteína en los cultivos primarios de las células tanto de los animales jóvenes como de los viejos. Esto se realizó mediante una infección retroviral, para lo cual, primero tuvieron que producirse las partículas virales que contuvieran el transgen con la información de *bcl-2*.

Normalmente para generar partículas virales se acostumbra emplear dos tipos de plásmidos: los que poseen la información referente a la cápside del virus y los que tienen la información de la proteína de interés que se inserta dentro de dicha cápside. Ambos plásmidos se introducen o cotransfectan en una célula que genera las partículas virales denominada célula empaquetadora (células 293T). En este trabajo se empleó el plásmido pCL-ECO con la información para la cápside (*gag + env + pol*), y el plásmido pCL-GFPN-hBcl-2, con la secuencia de la proteína Bcl-2, así como la de la proteína verde reportera (GFP) ($\psi^{+bcl-2} + gfp$). Como control de infección se utilizó al plásmido pCL-GFPN que no contiene el inserto de *bcl2* sino sólo de *gfp*. Estos últimos dos plásmidos fueron construidos en el Laboratorio del Dr. Luis Covarrubias del Instituto de Biotecnología, UNAM, por la Dra. María del Carmen Cárdenas Aguayo (Cárdenas-Aguayo et al., 2003) y donados gentilmente para este proyecto.

13. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS Y AMPLIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Para tener la cantidad de plásmidos requerida, fue necesario amplificarlos por la técnica de lisis alcalina. Para ello, primero se transformaron bacterias *E.coli* competentes, de la cepa Mn522 y DH5 α . Se prepararon tubos Falcon de 15 ml estériles con 20 μ l de agua estéril. Se les agregó 1 μ l de plásmido a cada uno (esto se hizo de manera independiente para cada uno de los plásmidos). La suspensión de bacterias competentes se resuspendió con cuidado y se agregaron 100 μ l al tubo, inmediatamente después, se incubó en hielo por 10 min. A continuación, se pasaron los tubos a un baño a 42 °C por 60 seg, para inducir un choque térmico. Posteriormente, se adicionó 1 ml de medio LB sin bactoagar y se dejó crecer a las bacterias en agitación a 37 °C por 1 o 2 h. (Medio LB: para 1 litro de agua, 10 g de triptona,

5g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 1 ml de NaOH 1N). Mientras tanto se prepararon las placas con medio LB con bactoagar (Medio LB con bactoagar: para 1 litro de agua, 15 g de bactoagar, 10 g de triptona, 5g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 1 ml de NaOH 1N). Se prepararon placas con ampicilina (100-200 µg/ml). La ampicilina sirve para seleccionar a las bacterias que introdujeron el plásmido, ya que este les confiere resistencia frente al antibiótico.

Una vez crecidas las bacterias, se sembraron en las placas a una dilución de 1:100 para obtener colonias discretas. Se dejaron incubar a 37 °C por 12 h y posteriormente se refrigeraron.

Una vez obtenidas las bacterias transformadas, se inoculó una colonia bacteriana en 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µl/ml), y se dejó crecer el cultivo a 37 °C en agitación constante por toda la noche para obtener suficientes bacterias de las cuales se pudiera aislar el plásmido.

14. PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA

La técnica de Sambrook y Russell (2001) se basa en exponer a las bacterias a un detergente aniónico con un alto pH, lo cual abre la pared celular, desnaturalizando al ADN cromosomal y a las proteínas. El ADN plasmídico sale hacia el sobrenadante, pero no se rompe, ya que el hecho de que sea circular mantiene a las hebras de ADN topológicamente entrelazadas protegiéndolo.

Para realizar la técnica, se tomó 1.5 ml del cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf estéril y nuevo. Se centrifugó a 14,000 rpm en una microfuga marca Eppendorf a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 100 µl de solución GTE

(50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0). Se agregaron 200 µl de una solución recién preparada de NaOH/SDS (0.2 N NaOH, 1% SDS), y se mezcló por inversión. Se pasó a hielo durante 5 min y se agregaron 200 µl de acetato de sodio 5 M, pH 8.0. Se volvió a poner en hielo por otros 5 min hasta que se formó un precipitado denso. Se agitó con un vortex por 2 seg y se regresó al hielo por 5 min más. Posteriormente se centrifugó a 14, 000 rpm durante 10 min a TA. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo al cual se le agregaron 800 µl de etanol absoluto al 100% y se agitó por inversión. Se guardó el tubo a -20°C por toda la noche. Pasado ese tiempo se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 10 min a TA, se decantó el sobrenadante y el botón se lavó una vez más con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 14, 000 rpm durante 15 min a TA. Se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 30 µl de solución TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Se cuantificó la concentración de ADN obtenido por espectrofotometría (260-280 nm). El plásmido se guardó a -20°C .

15. IDENTIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Para asegurar que los plásmidos obtenidos eran los deseados, se realizó una digestión con enzimas de restricción específicas con las cuales habían sido manipulados y construidos los plásmidos, y se corrió una electroforesis para encontrar los fragmentos y los insertos esperados.

Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X (Para un litro de TBE: 0.5 M ácido bórico, 0.5 M Tris base, y 10 mM EDTA). Antes de que cuajara el gel se le agregaron 2 µl de bromuro de etidio (solución madre de 1 mg/ml).

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

Para digerir al plásmido pCL-GFPN-hBcl-2 se tomaron 2 μ l del mismo y se le agregó 1 μ l de enzima Eco RI, 1 μ l de amortiguador H y 6 μ l de agua, volumen final 10 μ l (tubo 1). De igual manera se preparó un tubo con el plásmido sin digerir, que contenía lo mismo excepto la enzima y se ajustó el volumen con agua para un volumen final de 10 μ l (tubo 2). Además se preparó otro tubo de plásmido sin digerir que contenía únicamente 2 μ l de plásmido y 8 μ l de agua (tubo 3).

Para el caso del plásmido pCL-GFPN se llevó a cabo el mismo procedimiento pero se usó en un caso la enzima Cla-I y en otro la enzima Xho-I. Para el plásmido pCL-ECO se usó la enzima Xba-I.

Se usó al fago δ digerido con Hind III como marcador de tamaño molecular. Para ello, se pusieron 3 μ l del marcador, 3 μ l de agua y 1 μ l de amortiguador de cargado LB-DNA (“loading buffer” o amortiguador de cargado. Para 10 ml de 6X LB-DNA: 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% xilen cianol FF, glicerol).

Una vez preparados los tubos se incubaron a 37 °C por una hora para activar la enzima y luego se calentaron a 95 °C por 5 min, seguido de una incubación a 4 °C para inactivarla. Se tomaron 5 μ l de cada tubo, se les agregó 1 μ l de LB-DNA y se depositaron en el gel, que se corrió a 100 V durante 45 min.

Una vez corroborado que las bandas en los geles coincidían con los tamaños de los plásmidos y los insertos, se esterilizaron los plásmidos filtrándolos a través de filtros Millipore de 0.22 μ m.

16. COTRANSFECCIÓN DE CÉLULAS 293T POR EL MÉTODO DE FOSFATO DE CALCIO

En este trabajo se utilizó la técnica de fosfato de calcio para introducir los plásmidos dentro de las células. Se emplearon células empaquetadoras 293T que son células embrionarias de riñón humano. Estas células se caracterizan porque están transfectadas para que sobreexpresen el antígeno T del SV40 y la proteína A1 de adenovirus, lo que facilita la multiplicación del genoma plasmídico. Se usaron los plásmidos puros y estériles antes mencionados. La transfección se llevó a cabo en placas de 6 pozos. Se cotransfectaron los siguientes plásmidos: pCL-GFPN-hBcl-2 y pCL-ECO para el caso de las células que sobreexpresaron Bcl-2, y los plásmidos pCL-GFPN y pCL-ECO como controles de la infección.

Para mayor facilidad, a las primeras se les denominó como células Bcl-2 y a las segundas como células GFP. El término de células control se empleó para las células que no fueron infectadas, pero el control real de las células Bcl-2 fueron las células GFP.

Un día antes de la cotransfección se sembraron las células 293T a una densidad de 200×10^3 células por pozo en placas de 6 pozos, en 3 ml de medio DMEM + 10% SFB. Al día siguiente, 3 o 4 h antes de transfectar, se les cambió el medio por 2 ml de medio nuevo sin antibiótico (DMEM + 10% SFB). Una hora antes de que hubieran transcurrido las 4 h, se preparó la solución de cotransfección usando el sistema comercial “Calcium Phosphate Transfection System” (GIBCO BRL®) . Se preparó por separado el contenido de los tubos número 1 que contenían los fosfatos y por otro lado los tubos número 2 con el ADN 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 100µl de esta solución para cada pozo (siempre se preparó para 1 pozo de más)

| | Para 1 pozo | Para 4 pozos |
|------------------------------------|-------------|--------------|
| H ₂ O para transfección | 88.5µl | 354µl |
| HSB 10x, vortex | 10µl | 40µl |
| NaOH, vortex | 1.5µl | 6µl |
| Solución de fosfatos, vortex | 2µl | 8µl |

A los tubos 1 se les añadió 100µl / pozo de HSB x1.

Para preparar los tubos 2 se agregó lo siguiente por pozo

- 85.8 µl de agua de transfección (sistema comercial)
- 0.1 µl de ADN acarreador (sistema comercial)
- 5 µg de ADN plasmídico pCL-GFPN-hBcl-2 o pCL-GFPN
- 5 µg de ADN plasmídico pCL-ECO

Posteriormente se les añadió 1 µl (por pozo) de solución de calcio (sistema comercial), y se resuspendió suavemente. Se le agregaron otros 5 µl de solución de calcio (sistema comercial) y se volvió a resuspender. A continuación se burbujeó el tubo 1 con una pipeta Pasteur conectada al pipetor y simultáneamente se agregó el contenido del tubo 2 al tubo 1. Esto se realizó muy lentamente permitiendo que se formara el precipitado de la sal de fosfato de calcio. Se incubó 20 min a temperatura ambiente, y se agregó a los pozos con células 293T.

A las 24 h, se cambió el medio a las células, empleando medio completo con suero y antibiótico. Se ha determinado que el máximo de producción de partículas virales es a las 48h, por lo que a ese tiempo se recolectaron las partículas. Para ello, se colectó el sobrenadante y se centrifugó a una velocidad baja, únicamente para bajar las células que

estén despegadas, 3000 rpm por 5 min a TA. Se recuperó el sobrenadante y se congeló a –70 °C hasta su uso.

17. INFECCIÓN RETROVIRAL.

Los cultivos primarios se infectaron con una concentración 1:1 de partículas y medio nuevo con el mínimo volumen necesario para cubrir todo el pozo. Se usaron pozos en placas de 6, por lo que el volumen fue de 1 ml.

Antes de agregar el medio con partículas se le agregó 500 µl de medio + Polibrent a cada pozo (DMEM + SFB 10%). El Polibrent se usó a una concentración de 2µl/ml de medio. Posteriormente se agregó el mismo volumen de medio con partículas. A las 24 h se cambió al medio por medio nuevo.

Para verificar que la infección se realizó de manera exitosa, en primera instancia se observó a las células en un microscopio confocal o en uno de fluorescencia, en los cuales se observó el color verde de la proteína reportera GFP. Sin embargo, esto sólo confirmó que la información genética se encontraba dentro de los cultivos primarios. Para asegurar la sobreexpresión la proteína Bcl-2 también se realizaron inmunoensayos tipo Western.

18. EFECTO DE LA PROTEÍNA BCL-2 FRENTE A UN RETO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Regresando al objetivo inicial de este apartado, el de determinar si un incremento en la concentración de la proteína Bcl-2 confería a las células alguna protección contra el daño por estrés oxidativo, se sometió a las células Bcl-2, GFP y control a una concentración que se ha reportado óptima para inducir senescencia: 75 μM de H_2O_2 por 2 h (Chen et al., 1995).

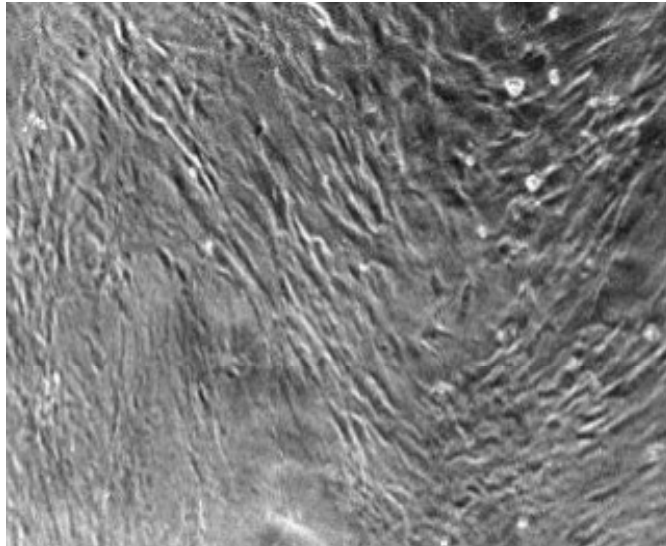
Se cuantificó la proliferación y el número de células senescentes una semana después de este tratamiento de la siguiente manera:

Cuatro días después de obtenido el cultivo primario, se despegaron las células y se sembraron en placas de 6 pozos a una densidad de 5,000 células por pozo. Se sembraron la cantidad de pozos necesarios para realizar los experimentos de proliferación y SA- β -gal, por triplicado para cada uno de los tipos celulares (Bcl-2, GFP y control). A día siguiente se infectaron con sus correspondientes partículas virales y después de dos días, se les sometió a un tratamiento de 75 μM de H_2O_2 por 30 min a 37 °C. Pasado ese tiempo, se les retiró el agente tóxico y se les agregó medio nuevo suplementado con suero. Al cabo de una semana se cuantificó el número de células totales presentes en los pozos de proliferación y se determinó el número de células senescentes en los pozos de SA- β -gal, según las metodologías antes descritas.

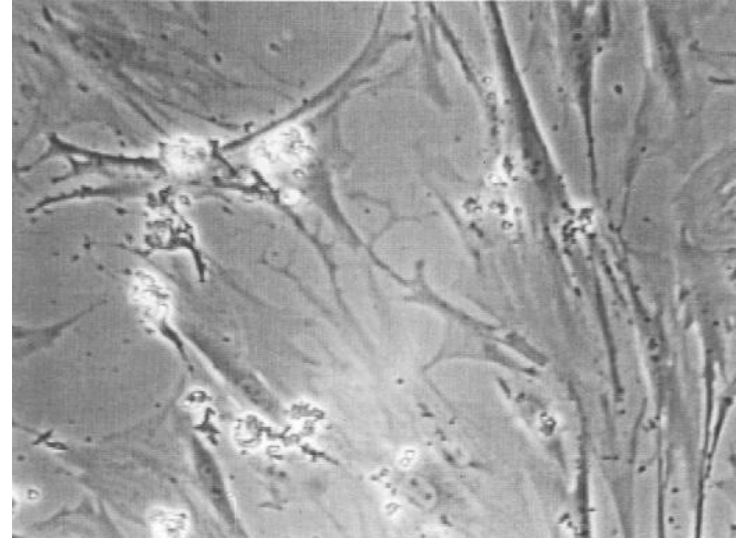
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres experimentos independientes. Para la comparación de los datos obtenidos de los ensayos cometas , se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida del método de varianza

Tamhane. Para todas las demás comparaciones se usó la prueba de *t de Student* de una cola.
Se manejó un nivel de probabilidad de $p < 0.05$ como mínimo criterio de significancia.



A



B

Figura 10: CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN

- A. Fotografía de fibroblastos durante la fase logaritmica de crecimiento. (Aumento de la fotografía 40X).
- B. Fotografía de fibroblastos durante la fase de senescencia replicativa. (Aumento de la fotografía 100X). Las células senescentes aumentan su tamaño y presentan una morfología extendida y aplanada. Así mismo, la densidad celular en los cultivos senescentes es menor que en los cultivos jóvenes.

RESULTADOS

PARTE I: : PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

1. CULTIVOS PRIMARIOS Y PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO CELULAR

Para documentar si existen diferencias en el proceso de senescencia que se desarrolla *in vitro* entre las células obtenidas de los pulmones de los ratones jóvenes en comparación con las obtenidas de los ratones viejos, se cuantificaron los 4 parámetros celulares descritos en la parte de material y métodos.

Los fibroblastos fueron el tipo celular mayoritario en los cultivos primarios, en concordancia con lo que se sabe de este tipo de cultivos, donde después de una semana, si no se secciona un tipo celular en particular (ej. neumocitos), los fibroblastos tienden a colonizar todo el cultivo (Freshney, 1984). Lo anterior fue confirmado por la morfología que presentaron las células (figura 10). Aún así, no puede excluirse la posibilidad de que durante los primeros días del cultivo se encuentren presentes otros tipos celulares. Sin embargo, esta posible heterogeneidad celular pareció no haber afectado los resultados, ya que para la fase de crecimiento logarítmico, así como para la entrada a la senescencia es muy posible que únicamente se tuvieran fibroblastos.

2. PROLIFERACIÓN CELULAR

Para valorar la tasa de proliferación celular, se contó el número de las células por pozo cada segundo día del cultivo. Se comenzó con el día siete del cultivo y se terminó el día veintisiete. Los cambios en la tasa de proliferación se evaluaron analizando los cambios en las pendientes de las curvas de crecimiento obtenidas para cada uno.

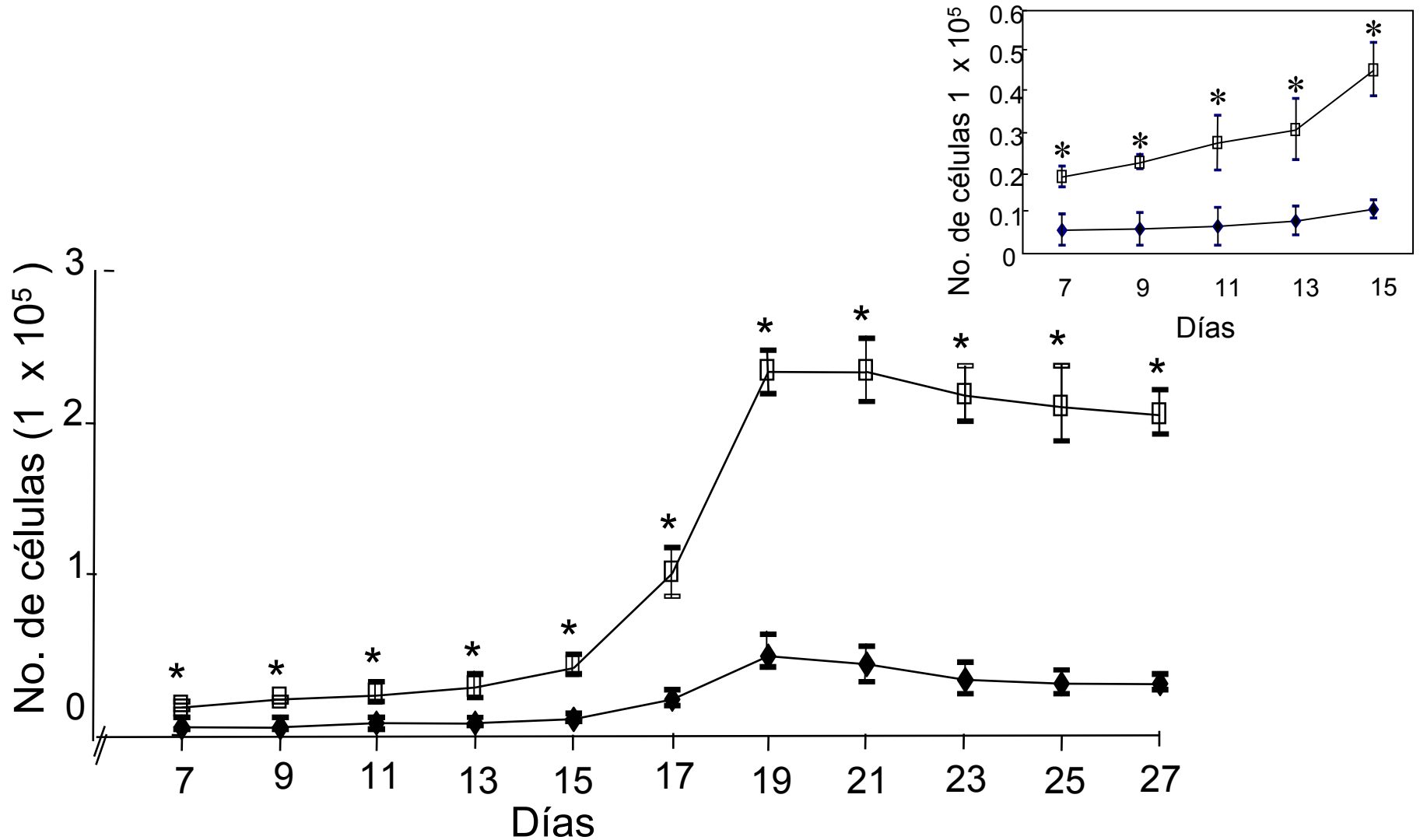


Figura 11: TASA DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Los □ representan células provenientes de ratones jóvenes y los ■ células provenientes de ratones viejos. Los resultados son el promedio de cuatro cultivos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una $n = 12$. Los * indican diferencias estadísticamente significativas de las células de animales viejos en comparación con las de jóvenes con un valor de $p \leq 0.05$. El recuadro es una ampliación de los días 7 al 15.

En la figura 11 se puede observar que ambos tipos celulares mostraron una curva de crecimiento característica de los cultivos primarios, con una fase de establecimiento del cultivo, una fase de crecimiento logarítmico y un estancamiento del crecimiento conocido como senescencia replicativa o límite Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961). Al comparar ambos cultivos se hizo evidente que, aunque los dos tuvieron fases de proliferación lentas entre los días 7 y 15, las células derivadas de los animales jóvenes proliferaron casi cinco veces más rápido que las procedentes de los viejos (4.9 veces más rápido). Entre los días 15 y 19, se observa un incremento en el número de células en ambos casos. Durante ese lapso de tiempo, la diferencia en la tasa de proliferación se mantuvo muy similar a la encontrada anteriormente (4.6 veces más rápida para las células de ratones jóvenes). Para el día 21, y hasta el final del experimento en el día 27 del cultivo, la tasa de proliferación se estabilizó. Esto sugiere que posiblemente exista una interrupción en la proliferación celular, presumiblemente dada por el arresto característico de la fase de senescencia, pero también indica que los cultivos presentaron un cierto índice de muerte celular.

Al comparar el número total de células correspondientes a cada uno de los días de los experimentos, se encontró que todos los puntos mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$). El mayor contraste se encontró en el día 19, donde la cantidad de células cuantificadas en el cultivo proveniente de los ratones jóvenes fue 10 veces mayor al determinado para el cultivo de células de los ratones viejos. Esta diferencia se mantuvo prácticamente constante hasta el final del cultivo.

En resumen, tanto los fibroblastos primarios derivados de los ratones jóvenes como los derivados de los viejos presentaron las características descritas para los cultivos primarios, y ambos alcanzaron el límite de Hayflick en el día 19 del cultivo. En cuanto al número de

duplicaciones (PD), estos cultivos presentaron de 14-17 duplicaciones con un promedio de aproximadamente 36 h por duplicación.

El número de duplicaciones, así como el tiempo de duración del cultivo (27- 30 días) coincide con lo que se ha reportado para cultivos de fibroblastos murinos (Rohme, 1981), y aunque la magnitud en cuanto al número de células fue distinto entre los cultivos de células de ratones jóvenes y viejos, el comportamiento del cultivo fue similar.

3. SÍNTESIS DE ADN: INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA

La figura 12 muestra la incorporación de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{-T}$) por célula a lo largo del tiempo del cultivo. Como se observa en la figura, la incorporación aumenta desde el principio del experimento hasta el día 19 en ambos tipos celulares. Es importante notar que el comportamiento que siguen los dos cultivos es similar, puesto que tanto la pendiente del día 11 al día 15, así como la del día 15 al 19 son muy parecidas ambas curvas de crecimiento. Las células derivadas de los animales viejos incorporaron de 2 a 3.5 veces menos $[^3\text{H}]\text{-T}$ por célula, que las células provenientes de animales jóvenes durante todo el cultivo.

Después del día 19, la incorporación de $[^3\text{H}]\text{-T}$ decreció de manera notable en ambos casos. Sin embargo, la pérdida de incorporación por parte de las células obtenidas de los ratones jóvenes a partir del día 21 es mucho más evidente debido a que llega a bajar hasta los niveles determinados para las células obtenidas de los ratones viejos. De modo tal, que para los días 25 y 27 del cultivo la diferencia en la incorporación de $[^3\text{H}]\text{-T}$ en los dos cultivos ya no es estadísticamente significativa.

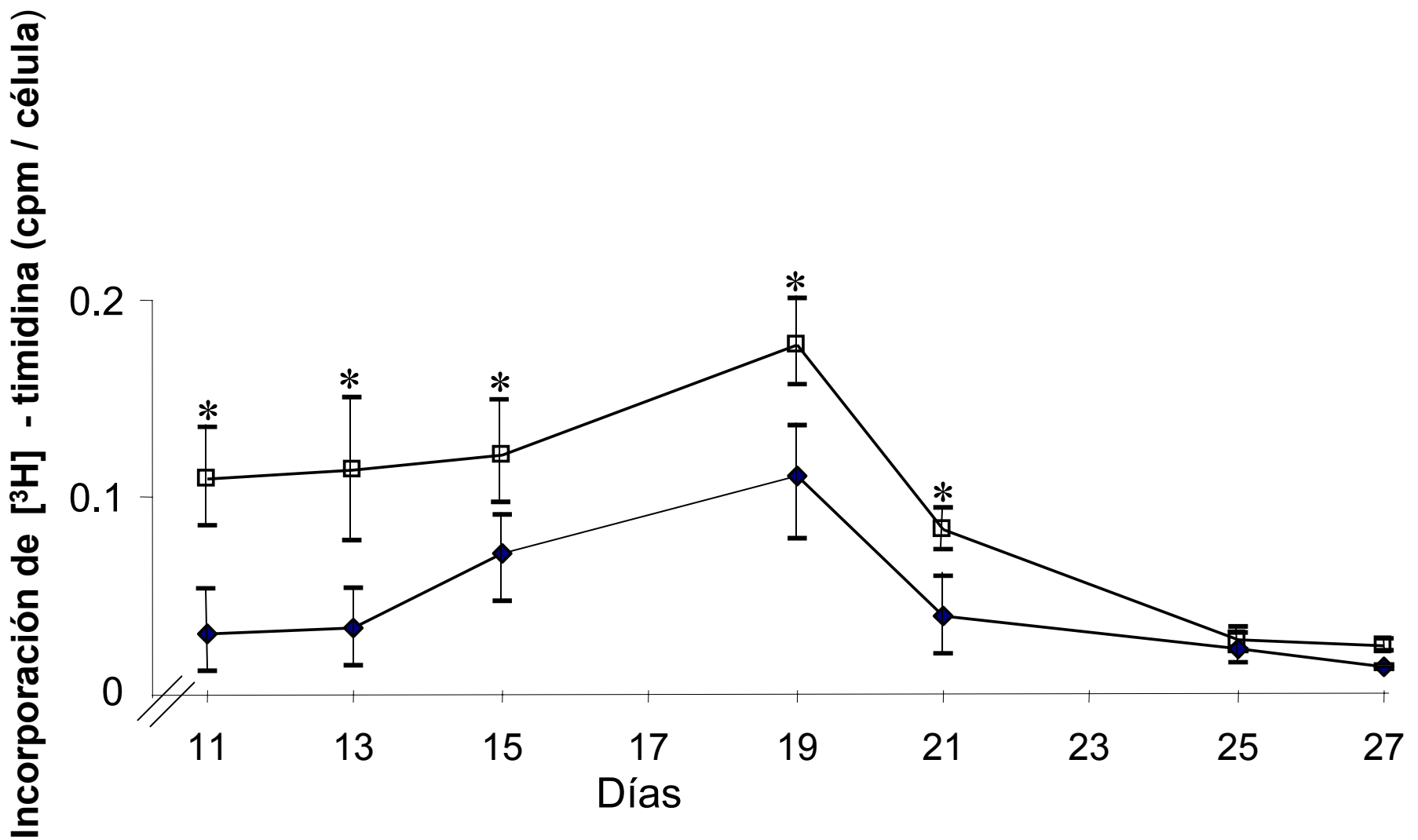


Figura 12: INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA

Los \square representan células provenientes de ratones jóvenes y los \blacksquare células provenientes de ratones viejos. Los resultados son el promedio de cuatro cultivos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una $n = 12$. Los * indican diferencias estadísticamente significativas de las células de animales viejos en comparación con las de jóvenes con un valor de $p \leq 0.05$.

La incorporación de [³H]-T refleja la síntesis de ADN y esto en gran medida, está motivado por la continua duplicación celular. Por lo que es interesante resaltar que el decremento en la síntesis de ADN a partir del día 19, coincide con la interrupción de la proliferación celular observada en ambos cultivos (figura 11).

4. FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL: ENSAYO DE MTT

La funcionalidad celular se determinó, de manera indirecta, midiendo la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial como reducción del colorante MTT. Los resultados obtenidos se presentan de manera normalizada en la figura 13, en función de la absorbancia a 250 nm entre el número de células totales en cada pozo, según el día del cultivo. La gráfica muestra que ambos cultivos presentaron un incremento en su actividad mitocondrial del día 11 al día 15. A partir de ese momento, la actividad se estabiliza hasta el día 19, en que la actividad comenzó a decrecer. El aumento inicial en la actividad metabólica correlaciona con el aumento en la proliferación celular y con la incorporación de [³H]-T en ambos cultivos. Aunque, como es evidente en la figura, la tasa metabólica en las células derivadas de los animales viejos, fue siempre menor (tres veces menor que la de las células de los animales jóvenes).

Después del día 19, ambos cultivos disminuyeron su actividad. De nuevo, las células derivadas de los animales jóvenes redujeron su tasa metabólica proporcionalmente más rápido que las células de los animales viejos, tanto, que para el día 25 ya no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos cultivos. Esto sugiere que las células de los animales jóvenes en cultivo tienden a volverse metabólicamente indistinguibles de las células provenientes de los animales viejos.

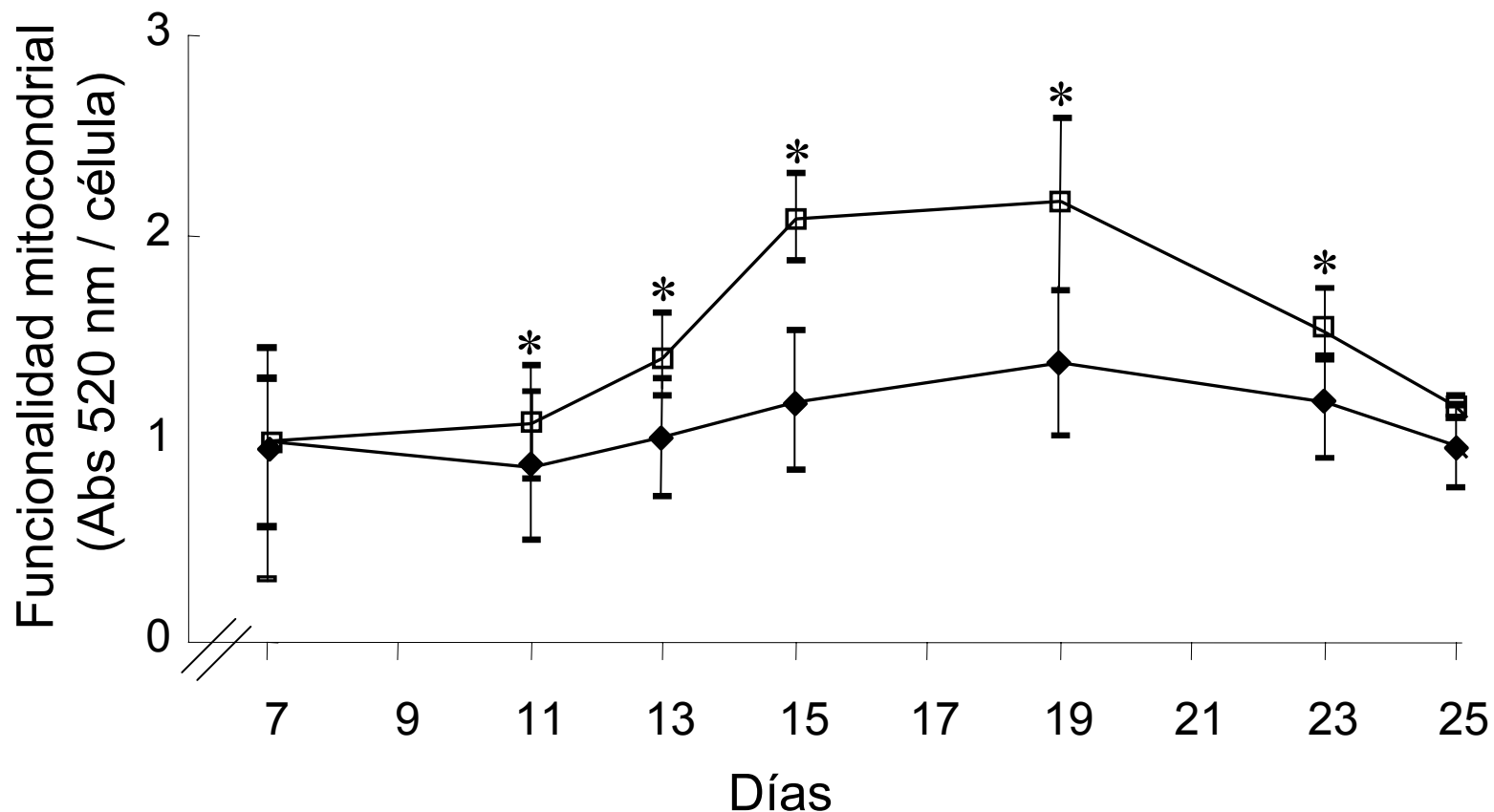


Figura 13: FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL (ENSAYO MTT)

Los □ representan células provenientes de ratones jóvenes y los ■ células provenientes de ratones viejos. Los resultados son el promedio de cuatro cultivos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una $n = 12$. Los * indican diferencias estadísticamente significativas de las células de animales viejos en comparación con las de jóvenes con un valor de $p \leq 0.05$.

5. SENESCENCIA CELULAR: ENSAYO SA- β -GAL

Para explorar la idea de que la acumulación de células senescentes se correlaciona con el fenotipo de deterioro asociado al envejecimiento, se utilizó la tinción positiva de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal). Las fotografías que se presentan en la figura 14 muestran un ejemplo de lo que se observa al utilizar esta técnica: las células senescentes son positivas al SA- β -gal (color azul verdoso), mientras que las células que siguen dividiéndose de manera normal no se tiñen. Los resultados que se muestran en la figura 15 indican que los cultivos presentan una población mixta en cuanto al número de células senescentes conforme avanza el tiempo de vida de los mismos. Es decir, existe una población proliferante (pre-senescente) y otra senescente. Esta última va creciendo al paso del tiempo del cultivo. Esto es muy importante al momento de interpretar los resultados, ya que prácticamente nunca se tiene una población homogénea.

En los primeros días de los experimentos (días 7-9) no se observaron células positivas a la tinción SA- β -Gal para el cultivo proveniente de los ratones jóvenes, mientras que se determinó un promedio de 14 % de células teñidas para los cultivos provenientes de los ratones viejos.

La tasa o frecuencia en la aparición de las células positivas a SA- β -Gal en los cultivos de los animales viejos tuvo un valor constante a lo largo de todo el cultivo, lo que se refleja en la pendiente de la figura 15. Sin embargo, para el caso de los cultivos obtenidos de los animales jóvenes, se observó un cambio de pendiente a partir del día 19, es muy similar a la que se encontró para el cultivo de células de los animales viejos, y además coincide con la

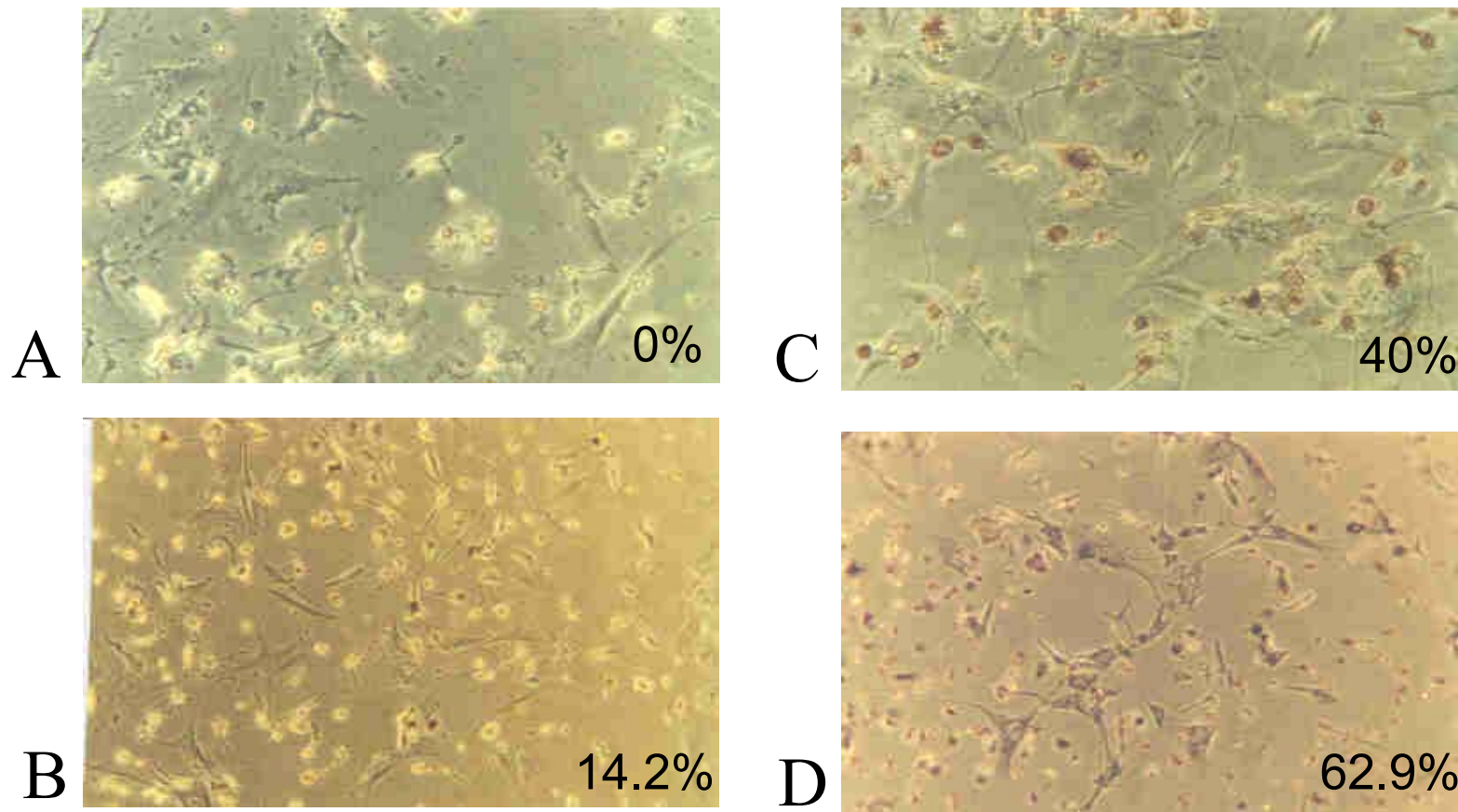


Figura 14: FRACCIÓN POBLACIONAL DE CÉLULAS SENESCENTES DETERMINADO POR EL ENSAYO SA- β -GAL.

- A. Células provenientes de ratones jóvenes al inicio del cultivo (día 7)
- B. Células provenientes de ratones viejos al inicio del cultivo (día 7)
- C. Células provenientes de ratones jóvenes al final del cultivo (día 25)
- D. Células provenientes de ratones viejos al final del cultivo (día 25)

Estas son fotografías representativas del ensayo SA- β -gal, en el cual se tomaron como positivas a las células teñidas de color azul-verdoso. Se contaron 100 células totales por pozo. El aumento en todos los casos es de 40X.

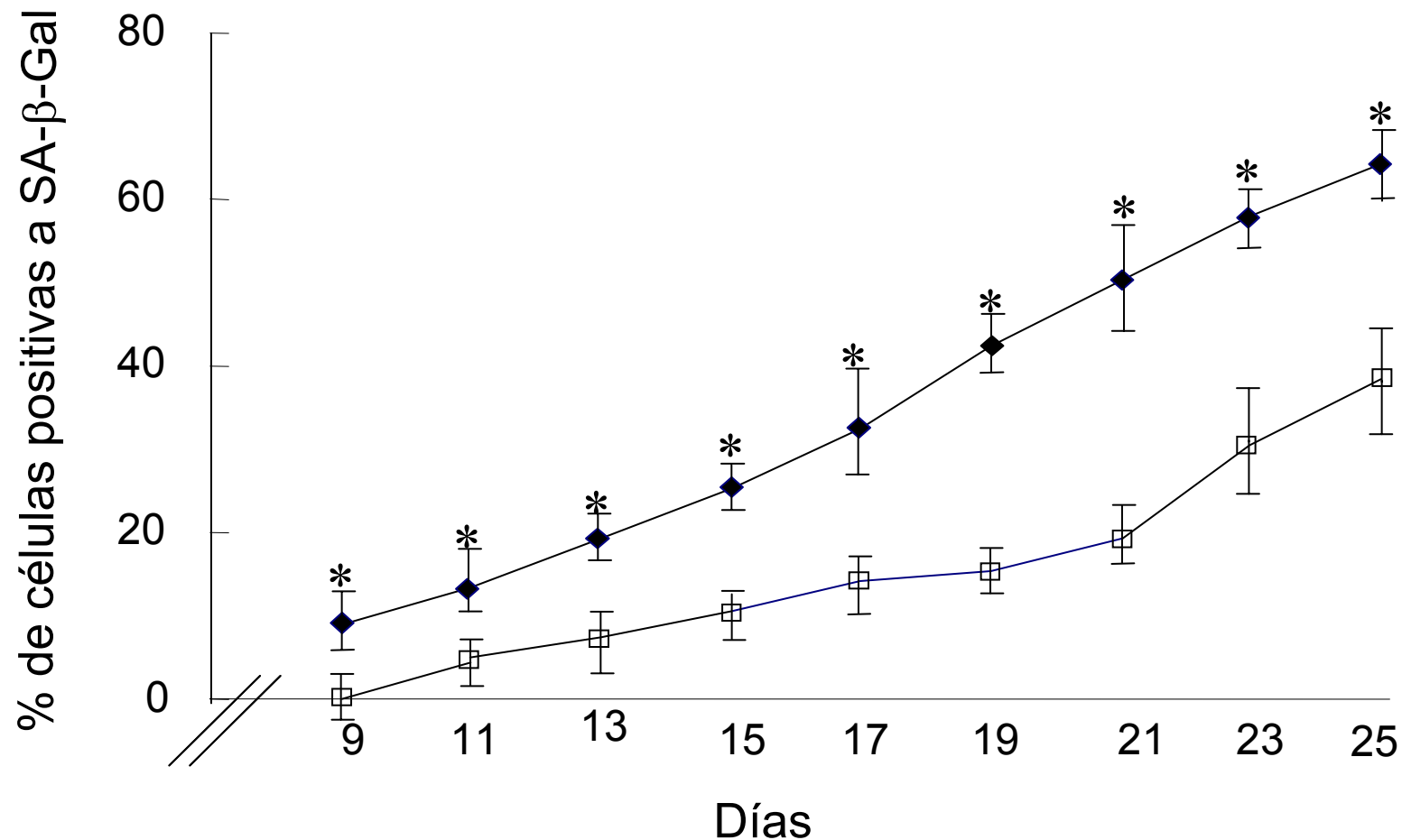


Figura 15: FRACCIÓN POBLACIONAL DE CÉLULAS SENESCENTES (ENSAYO SA-β.GAL)
 Los □ representan células provenientes de ratones jóvenes y los ■ células provenientes de ratones viejos. Los resultados son el promedio de cuatro cultivos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una n = 12. Los * indican diferencias estadísticamente significativas de las células de animales viejos en comparación con las de jóvenes con un valor de $p \leq 0.05$.

etapa en la que el cultivo inició la entrada en la senescencia celular. Lo anterior apoya las observaciones encontradas para los otros parámetros de senescencia, especialmente sustenta los datos del ensayo de MTT, puesto que el aumento en el número de células senescentes podría correlacionarse con la disminución en la actividad metabólica.

Para el día 25 del experimento, 40% de las células derivadas de los ratones jóvenes fueron positivas a la tinción SA- β -gal comparadas con un 63 % para los cultivos provenientes de los ratones viejos. La diferencia en la fracción poblacional teñida con SA- β -Gal entre ambos cultivos fue estadísticamente a lo largo de todo el experimento.

Resumiendo, los resultados obtenidos hasta este punto reflejan diferencias significativas entre las células provenientes de los animales jóvenes con respecto a las derivadas de los animales viejos al inicio del cultivo. Sin embargo con el transcurso del tiempo, y a mediada que las células envejecían en cultivo, las diferencias entre ambos fueron disminuyendo, hasta llegar a un punto (al final del cultivo, días 25 y 27), en que no se encontró una diferencia significativa en la tasa metabólica ni en la síntesis de ADN de los dos cultivos. Y si bien, se mantuvieron las diferencias en cuanto al número de células teñidas con SA- β -gal, así como en cuanto al número de células totales, el comportamiento de los dos cultivos a partir del día 19 (tomando como indicador las pendientes), fue muy similar.

PARTE II: DAÑO BASAL EN EL ADN Y RESPUESTA FRENTE A UN RETO DE ESTRÉS OXIDATIVO.

6. DAÑO AL ADN

Se ha documentado que la respuesta de las células o tejidos de animales viejos a tratamientos de estrés oxidativo, es exageradamente mayor que la que se observa en los

animales jóvenes (Zhang et al., 2003). De modo que otro de los objetivos del proyecto fue el de analizar si existía una respuesta diferencial de las células de los animales jóvenes y viejos frente a un reto de estrés oxidativo en cuanto al daño generado sobre el ADN. Para ello, se emplearon dos modelos de estudio. Uno induciendo el estrés oxidativo *in vivo* y evaluando sus efectos en los hígados de los animales, y el otro generando dicho estrés sobre los cultivos primarios obtenidos de los pulmones.

7. CUANTIFICACIÓN DEL ADUCTO 8-OHDG POR HPLC-EC.

Para cuantificar el daño específico por estrés oxidativo en el ADN proveniente de los hígados de los ratones jóvenes y viejos, se cuantificó al aducto 8-OHdG por HPLC-EC. Esto se hizo integrando el área bajo la curva de los picos correspondientes a las desoxi-guanosinas oxidadas (8-OHdG), que se encontraron mediante el detector electroquímico, normalizada con la integración de la curva de las desoxi-guanosinas totales (dG) que se detectaron en el UV-VIS. El resultado por lo tanto, se expresa como el cociente de las guanosinas oxidadas entre el total de guanosinas presente en la muestra (8-OHdG residuos/ 10^6 dG).

En la figura 16 se observa un cromatograma representativo obtenido con el detector UV-VIS, el que se aprecian los 4 nucleósidos obtenidos de la hidrólisis del ADN, sin embargo, el único que se usa para la cuantificación es el pico de dG. Para poder cuantificar la concentración equivalente del área bajo la curva, se realizó una curva patrón para dG (figura 17). Con respecto a los cromatogramas obtenidos con el detector EC, se presenta un ejemplo de cada uno de los diferentes grupos de animales analizados en la figura 18, mientras que en la figura 19 aparece la curva patrón determinada para 8-OHdG.

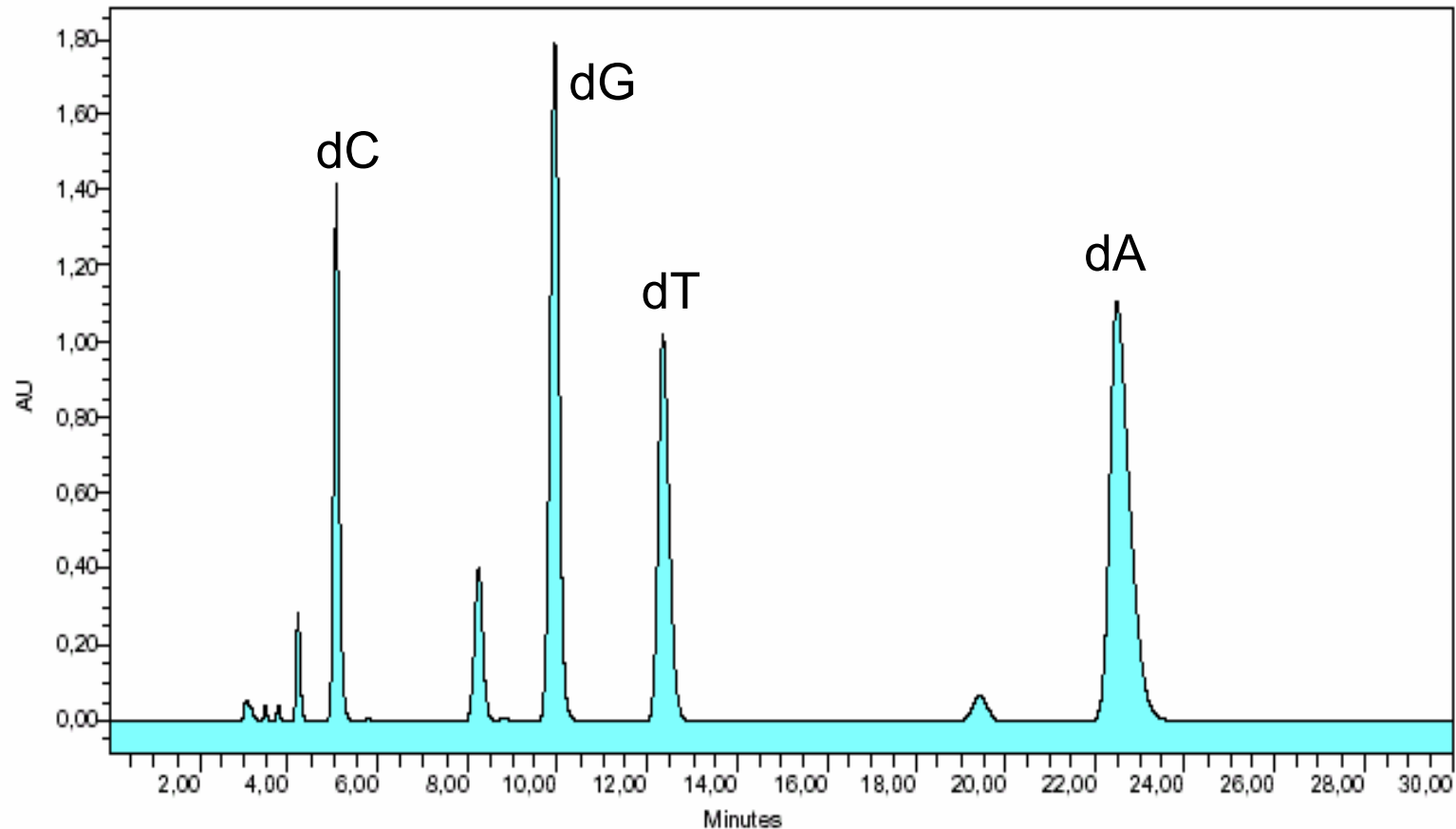


Figura 16: CROMATOGRAMA UV-VIS (254 nm)

Este es un cromatograma representativo obtenido con el ADN aislado de los hígados de ratones jóvenes control. Se observan los picos correspondientes a los cuatro nucleósidos derivados de la hidrólisis enzimática del ADN.

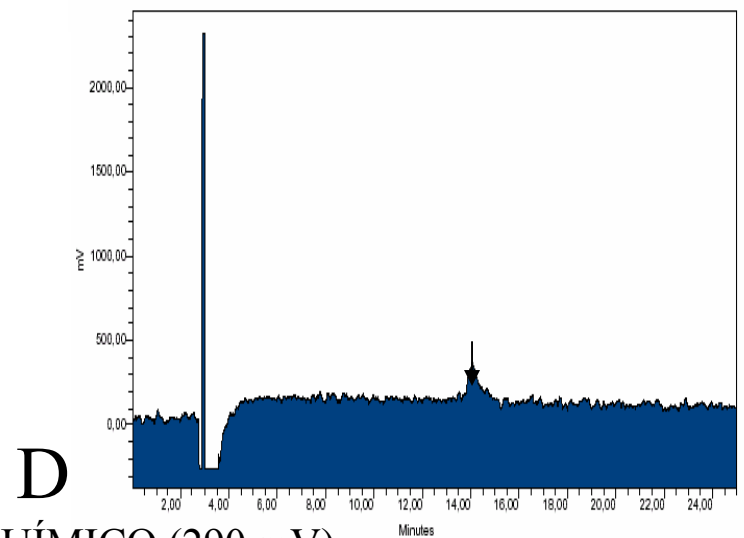
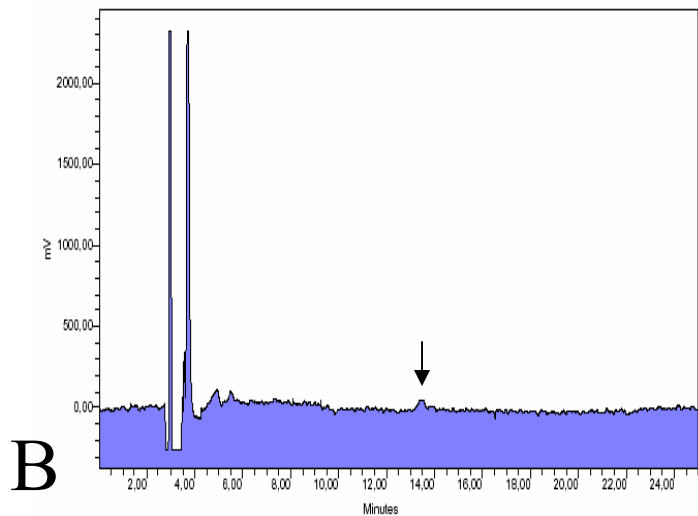
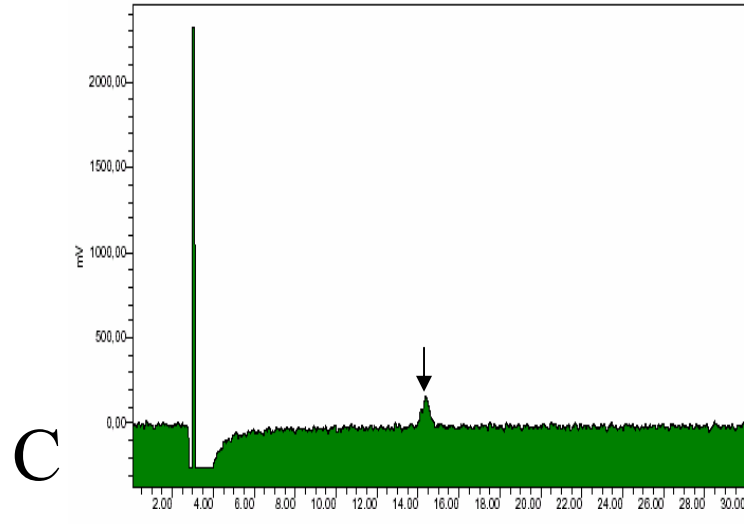
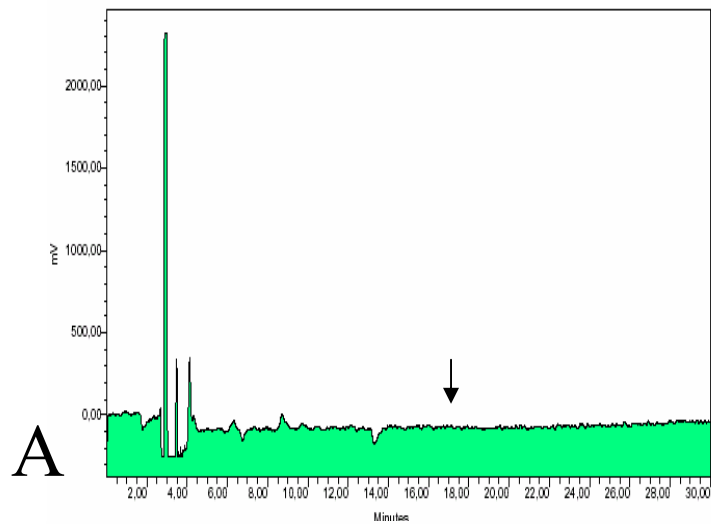


Figura 18: CROMATOGRAMA ELECTROQUÍMICO (290 mV)

Cromatogramas representativo derivado de la hidrólisis enzimática del ADN del hígado de:

- A. Ratones jóvenes control
- B. Ratones viejos control
- C. Ratones jóvenes tratados con CCl_4
- D. Ratones jóvenes tratados con CCl_4

Los picos corresponden a las desoxiguanosinas oxidadas en el C-8 (8OHdG)

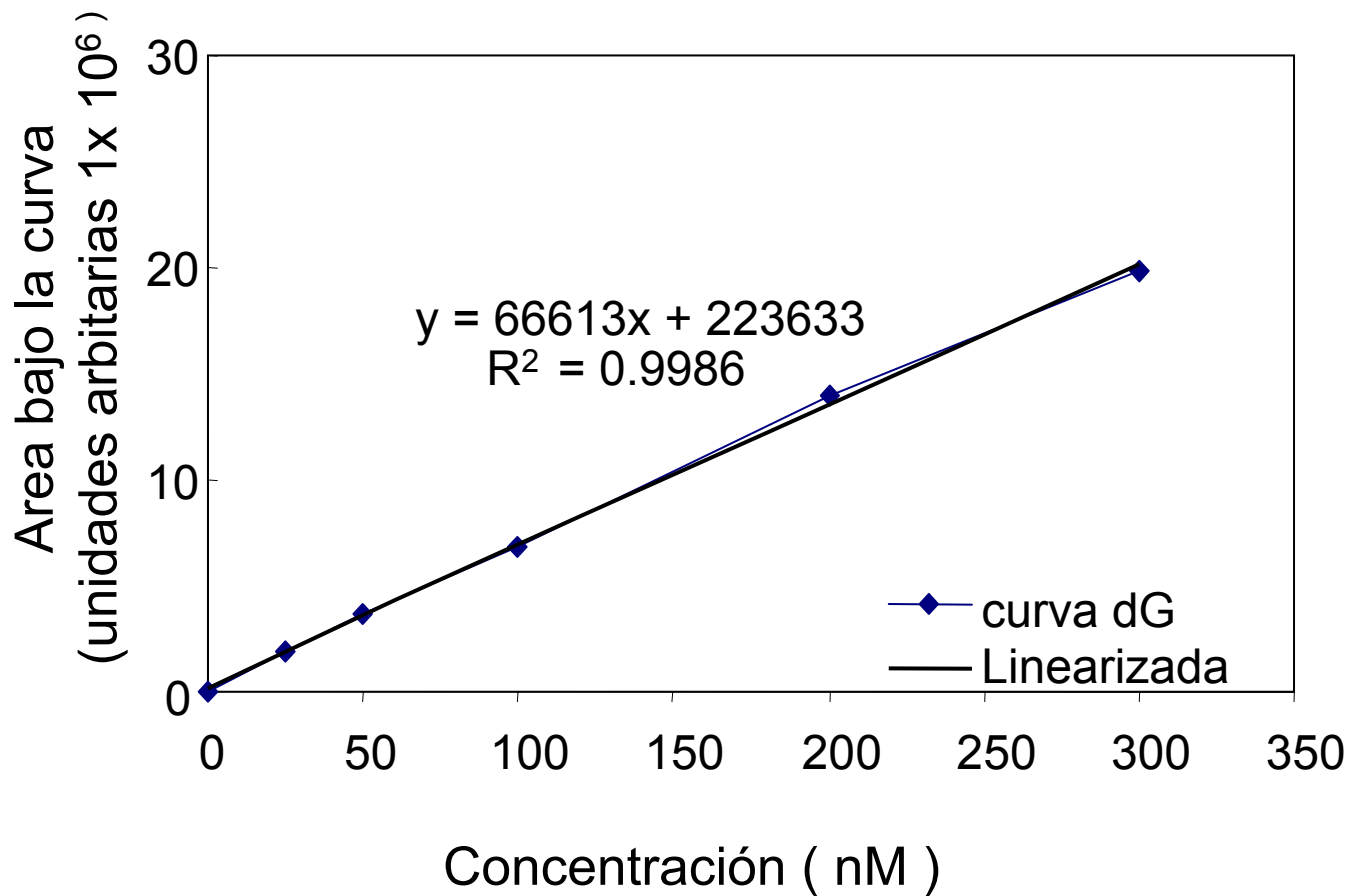


Figura 17: CURVA PARTÓN PARA LA DESOXIGUANOSINA (dG)

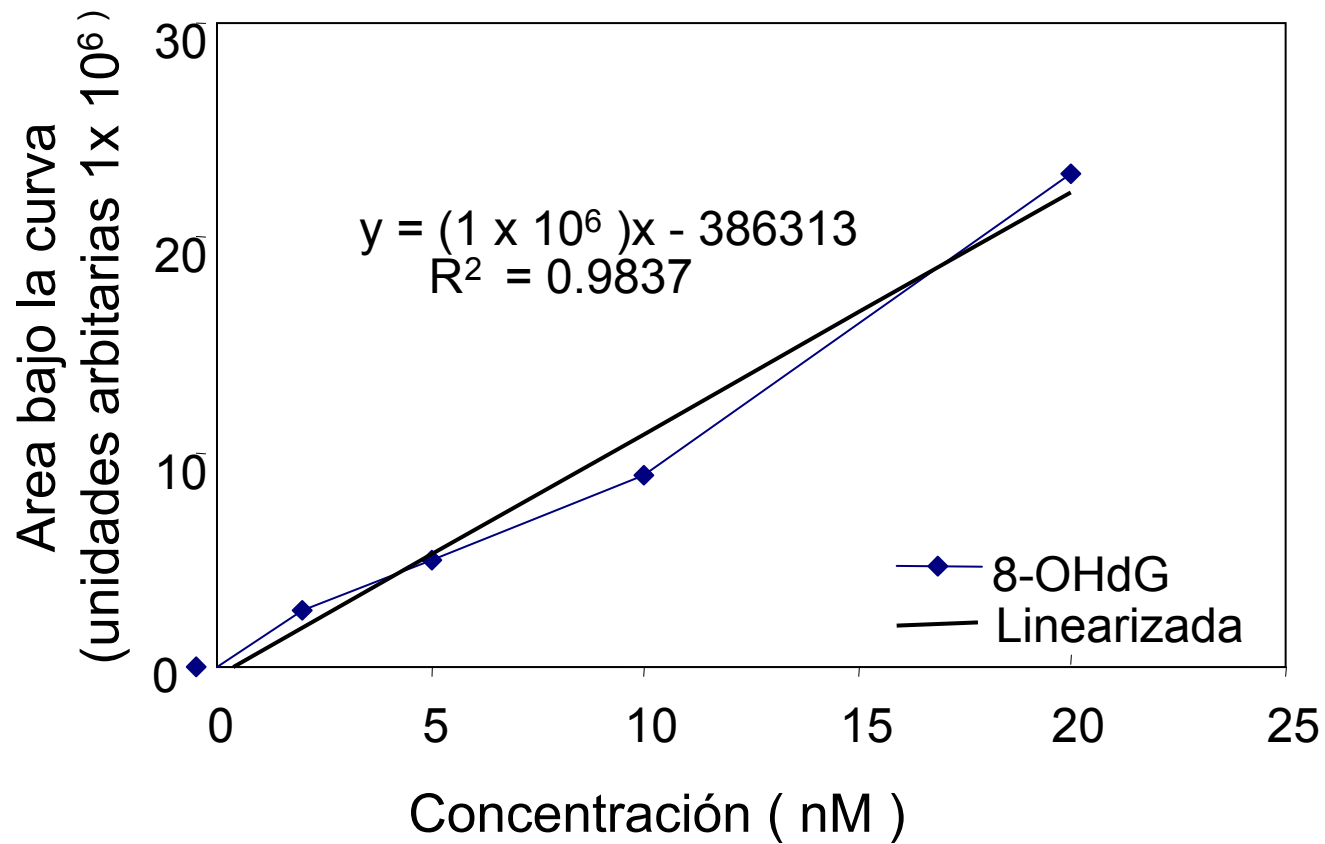


Figura 19: CURVA PARTÓN PARA LA 8-HIDROXI-DESOXIGUANOSINA (8OHdG)

Las concentraciones basales de 8-OHdG determinados en el ADN proveniente de los ratones jóvenes control fueron muy bajos (0.49 ± 0.10 residuos / 10^6 dG) y en algunos casos no se pudieron detectar. Esto contrasta con lo que se cuantificó para el ADN de los ratones viejos control (2.61 ± 0.52 residues / 10^6 dG), en donde se encontró que los niveles de 8-OHdG eran 2.3 veces mayores a lo determinado para el ADN de los animales jóvenes. Indicando que los animales viejos presentan una acumulación de daño oxidativo al ADN que correlaciona con lo que se ha reportado en la literatura (Wolf et al., 2002).

Después del tratamiento con CCl_4 , el ADN tanto de los individuos jóvenes como el de los viejos, mostró un incremento en el contenido del aducto. La cantidad de 8-OHdG cuantificada para el ADN de los animales jóvenes fue de 7.39 ± 2.96 residuos / 10^6 dG, mientras que para el ADN de los animales viejos sometidos a tratamiento fue de 10.14 ± 4.16 residuos / 10^6 dG (figura 20). Estos datos son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) e indican que existe un 27% más de daño oxidativo al ADN en el hígado de los ratones viejos que en el de los jóvenes después del tratamiento con CCl_4 .

Parte del propósito de este experimento fue el de comparar la respuesta diferencial de las células de los individuos jóvenes y viejos al agente tóxico generador de estrés oxidativo. Sin embargo, ya que desde un inicio se encontró que el ADN de los animales control presentaba un cierto daño basal previo al tratamiento (en especial el ADN de los ratones viejos), este daño (en términos de contenido de 8-OHdG), fue restado respectivamente de los datos obtenidos para cada grupo de animales tratados con CCl_4 . Después de realizar esta operación, el incremento en el contenido del aducto fue solamente 16% mayor en el caso del ADN de los animales viejos en comparación con los niveles observados en los animales jóvenes.

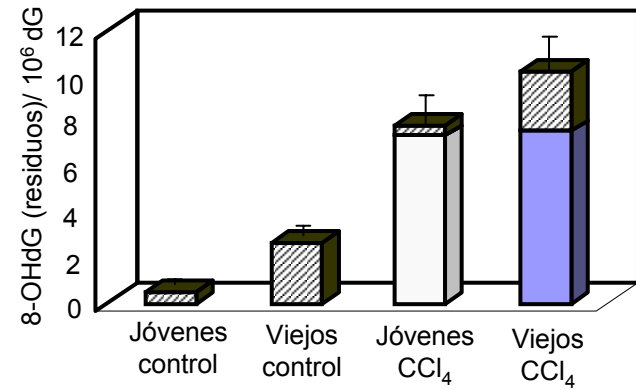
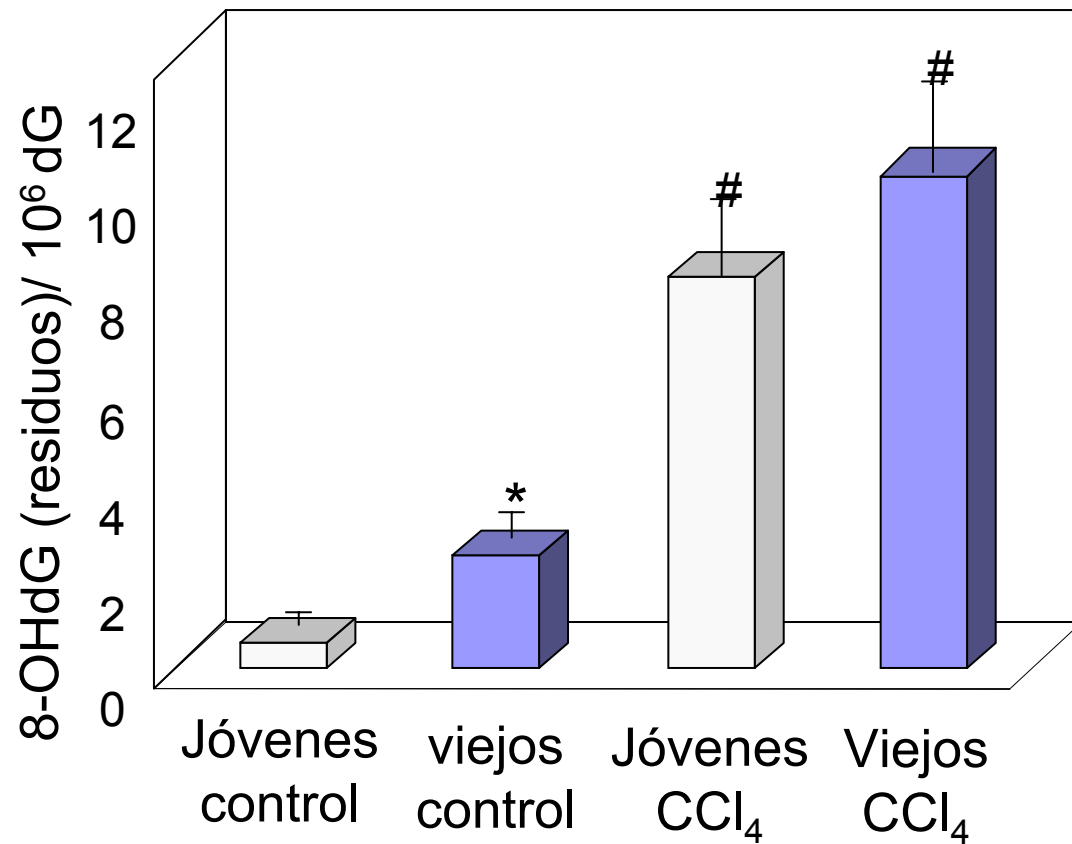


Figura 20: EFECTO DEL CCL₄ SOBRE EL ADN DE RATONES JÓVENES Y VIEJOS

Concentraciones de 8OHdG en el ADN aislado del hígado de los ratones. Los resultados representan un promedio de 3 experimentos independientes en los que se hicieron 3 inyecciones cada vez (n = 9). El recuadro representa la sustracción del daño basal determinado en los hígados de los animales control (primeras dos barras en la figura principal).

* p<0.05 para las comparaciones entre el ADN de animales jóvenes y viejos control;

p<0.05 para las comparaciones del ADN de los ratones control contra los tratados con CCl₄

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el daño neto atribuible al CCl_4 en los animales jóvenes y viejos, lo que sugiere que posiblemente el alto contenido de 8-OHdG encontrado en el hígado de los ratones viejos después del tratamiento es la suma del daño previo asociado con la edad y el daño reciente inducido por el agente tóxico, como se observa de manera gráfica en el recuadro de la figura 20.

8. CUANTIFICACIÓN DE LOS ROMPIMIENTOS DE CADENA SENCILLA MEDIANTE EL ENSAYO COMETA.

El ADN es uno de los blancos biológicos más importantes del daño por estrés oxidativo (Wiseman y Halliwell, 1996). En especial el tipo de daño relacionado con los rompimientos de cadena doble o cadena sencilla que se han relacionado con patologías como el cáncer y otras enfermedades degenerativas (Ames et al., 1990).

Para determinar si en el caso de los cultivos primarios también existe una respuesta diferencial al tratamiento de un agente tóxico generador de ROS, se sometió a los cultivos primarios provenientes de animales jóvenes y viejos a una concentración subletal de H_2O_2 (0.3 mM) y se determinó el rompimiento de cadenas sencillas mediante el ensayo cometa.

El análisis de las muestras reveló la existencia de colas de cometas o estelas pequeñas, tanto en las células tratadas como en las controles, debido a que el criterio que se tomó para el análisis fue muy estricto y se consideraron células no dañadas únicamente aquellas en las que el núcleo de ADN se observaba como una esfera perfecta. Estos fueron los casos en los que el valor de la longitud de la cola fue de 0 μm .

Para analizar más a fondo la magnitud del daño en cada uno de los casos, se agrupó a las células en dañadas y no dañadas. De nuevo se consideraron células no dañadas únicamente

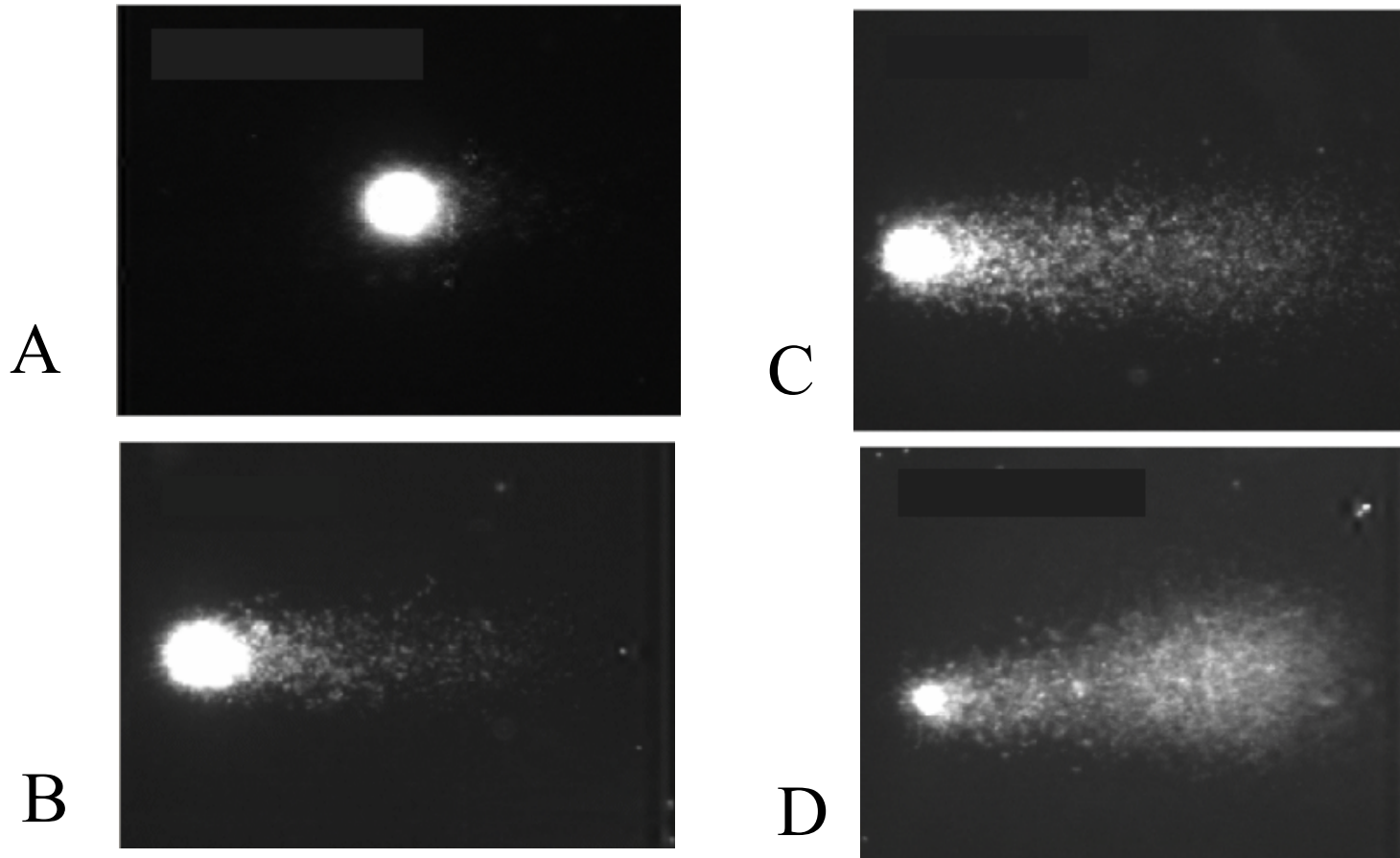


Figura 21: FOTOGRAFÍAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS CON DAÑO AL ADN

La presencia de rompimientos permite que el enrollamiento del ADN se relaje y se mueva rápidamente al ánodo formando una cola o estela. El tamaño de ésta en μm es un reflejo del daño. La esfera que se observa es el ADN condensado sin daño.

- A. Células sin daño
- B. Daño ligero o leve
- C. Daño severo
- D. Daño sumamente severo

las que se observaron como esferas perfectas. Todas las células que mostraron una longitud de cola $\geq 1 \mu\text{m}$ se consideraron como dañadas. En la figura 21 en la cual se muestran algunas fotografías representativas del ensayo cometa, en las que se ve una células sin daño en comparación con otras que presentan diferente grado de desenrollamiento del ADN o daño. En la figura 22 se presenta el porcentaje de células dañadas que se observaron en las células que fueron analizadas. Es importante notar que más del 50% de los núcleos presentaron algún tipo de daño previo a cualquier tratamiento en ambos tipos celulares. Esto concuerda con los reportes recientes del grupo de Campisi (Parrinello et al., 2003), en los que se indica que las células murinas presentan un cierto daño basal en el ADN, que no se observa de manera común en las células de humanos.

Sin embargo, resultó evidente que dentro de ese 50% de células afectadas, la extensión del daño es diferente dependiendo de si el ADN provenía de células de animales jóvenes o viejos. Considerando que la longitud de la cola o estela del cometa o la migración del ADN (en μm) es un parámetro aceptado como una medida directa del daño sobre el material genético (Tice et al., 2000), se comparó la longitud de la cola de los núcleos que presentaron daño, para evaluar si existía una diferencia en la magnitud de los mismos. Se agruparon los datos para contrastar más los resultados basándose en lo que se ha considerado daño en este tipo de ensayo (Collins et al., 1997; Kopjar y Garaj-Vrhovac, 2001). Estos resultados pueden verse en la figura 23 en donde se muestra que 96% de las células control derivadas de individuos jóvenes presentaron una longitud de cola de cometa (LCC) de 1-20 μm , que se definió como daño ligero, mientras que únicamente 4% presentaron un LCC de 21-41 μm considerado como daño leve. Lo cual contrasta con lo que se encontró en las células derivadas de animales viejos en donde 65% mostraron un

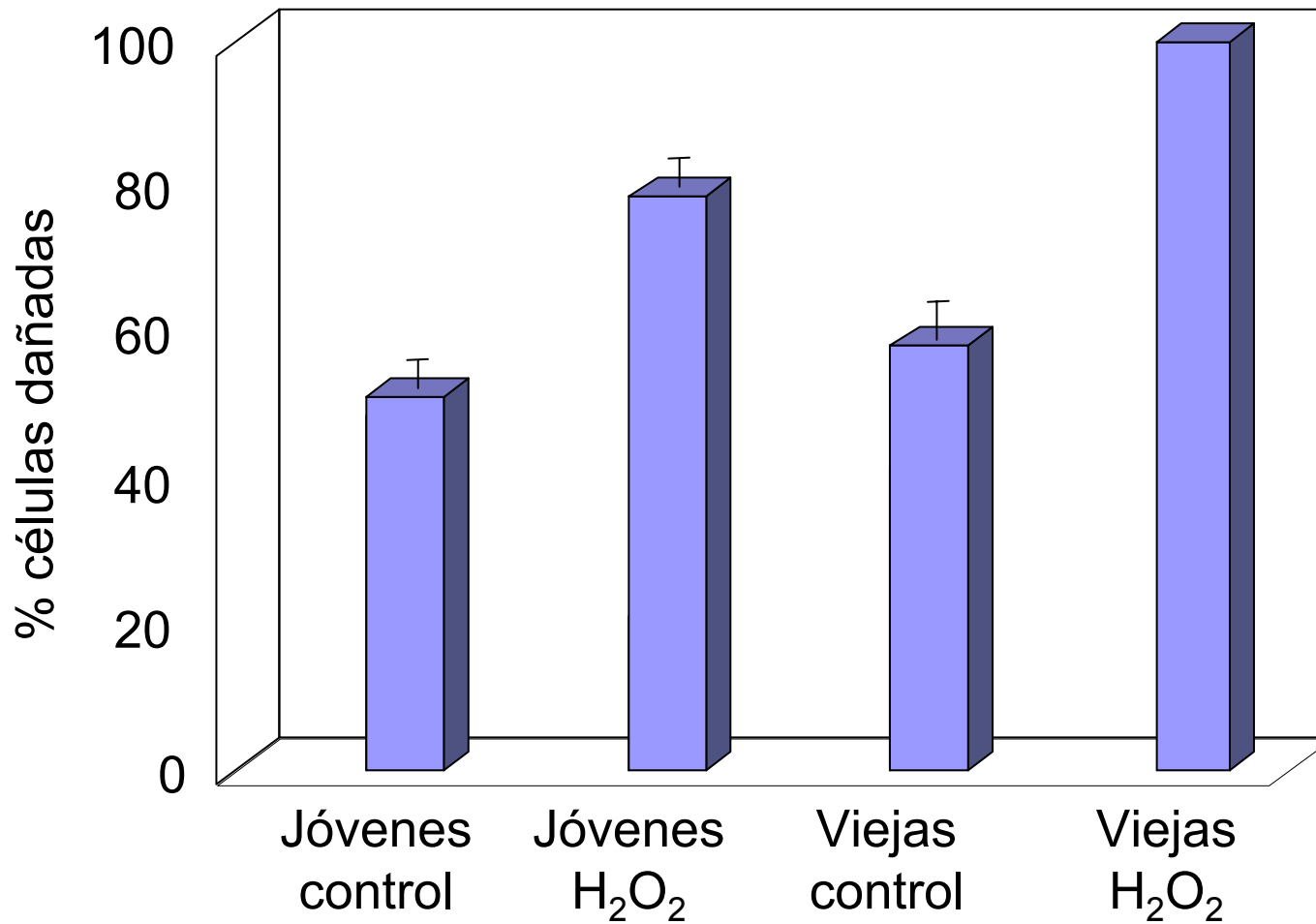


Figura 22: PORCENTAJE DE CÉLULAS DAÑADAS EN FIBROBLASTOS CONTROL Y TRATADOS CON H₂O₂

Se realizaron 3 experimentos independientes, en los cuales se analizaron 50 células para cada tratamiento (n = 150). En la primera aproximación se analizó únicamente la presencia o ausencia de daño, considerando como no daño 0 μm y como daño cualquier valor mayor de 1 μm . La figura muestra el porcentaje de células que presentaron daño bajo ese criterio.

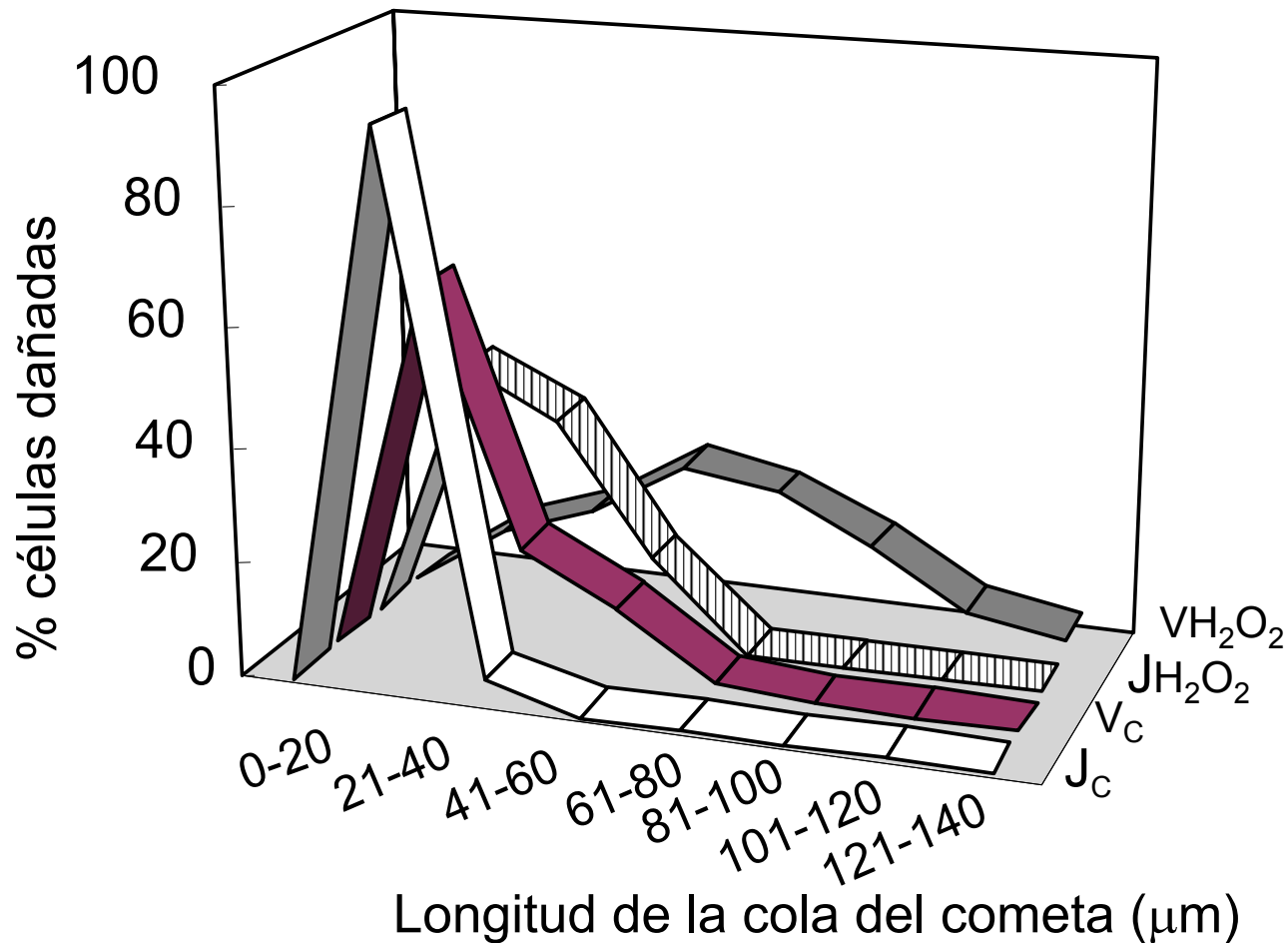


Figura 23: MAGNITUD DE LA LONGITUD DE LA COLA DEL COMETA (LCC)

Se analizó la magnitud de la LCC únicamente en las células que presentaron daño. Las definiciones del daño dependiendo de la LCC son: daño ligero de 1-20 μm, daño leve de 21-40 μm, daño moderado de 41-60 μm, daño severo de 61-80 μm y daño sumamente severo mayores de 81 μm.

J_c: células control derivadas de ratones jóvenes; V_c: células control derivadas de ratones viejos; J_{H₂O₂}: Células derivadas de ratones jóvenes tratadas con H₂O₂; V_{H₂O₂}: células derivadas de ratones viejos tratadas con H₂O₂.

| | | % de células | | | |
|----------------------|---------|--------------|----------------------------|--------|--|
| LCC μm | control | | con H_2O_2 | | |
| | Jóvenes | Viejas | Jóvenes | Viejas | |
| 1-60 | 100.0 | 98.79 | 100.0 | 51.78 | |
| 60-120 | 0.0 | 1.21 | 0.0 | 48.22 | |

Tabla 1: CÉLULAS AGRUPADAS DE ACUERDO A LA SEVERIDAD DEL DAÑO
 Las células representadas en las figuras 21 y 22 se distribuyeron en dos grupos para evidenciar el efecto diferencial del H_2O_2 sobre el ADN. Se emplearon 2 categorías tomando en cuenta la LCC: de 1- 60 μm (daño moderado) y > de 60 μm (daño severo).

daño ligero (LCC de 1-21 μm), 21 % un daño leve (LCC de 21-41 μm), 14% un daño moderado (LCC de 41-61 μm) y 1.5 % un daño severo (LCC de 61-81 μm). Los datos corresponden a los resultados de 3 experimentos independientes, con 50 observaciones para cada condición experimental.

Después del tratamiento con H_2O_2 , todas las células provenientes de los animales viejos que se observaron estaban dañadas (el 100%), en comparación con el 79% determinado para las células de animales jóvenes. Al comparar la magnitud del daño, se encontró que el 46 % de los núcleos de las células provenientes de ratones jóvenes presentaron daño ligero (LCC de 1- 21 μm), 38.1% daño leve (LCC de 21-41 μm) y 15.1 % daño moderado. Mientras que los núcleos obtenidos de las células de los ratones viejos mostraron 10.6 % de daño ligero (LCC de 1-21 μm), 26.2 % de daño leve (LCC de 21-41 μm), 26.2% de daño moderado (LCC de 41-61 μm), 23 % de daño severo (LCC de 61-81 μm) y 24 % de daño sumamente severo (LCC \geq 81 μm).

El promedio de la LCC que se determinó para todos los núcleos alterados obtenidos de las células de individuos jóvenes tratados con H_2O_2 resultó ser 2.3 veces mayor que el promedio del daño determinado para los núcleos control. Este resultado es similar al que se obtuvo para los núcleos derivados de células de individuos viejos, en los que el promedio de la LCC en las células tratadas fue 2.17 veces mayor que en sus controles. Sin embargo, es importante no perder de vista que aunque el porcentaje de núcleos dañados provenientes las células control de animales jóvenes y viejos es casi igual, los núcleos de las células de animales viejos mostraron un promedio de LCC 2.20 veces mayor que los provenientes de células de animales jóvenes. Si se compara el promedio de la LCC de los núcleos de células de ratones viejos tratados con H_2O_2 contra el promedio de la LCC de los núcleos de ratones

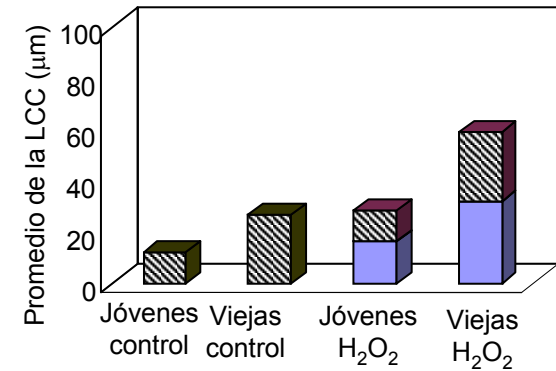
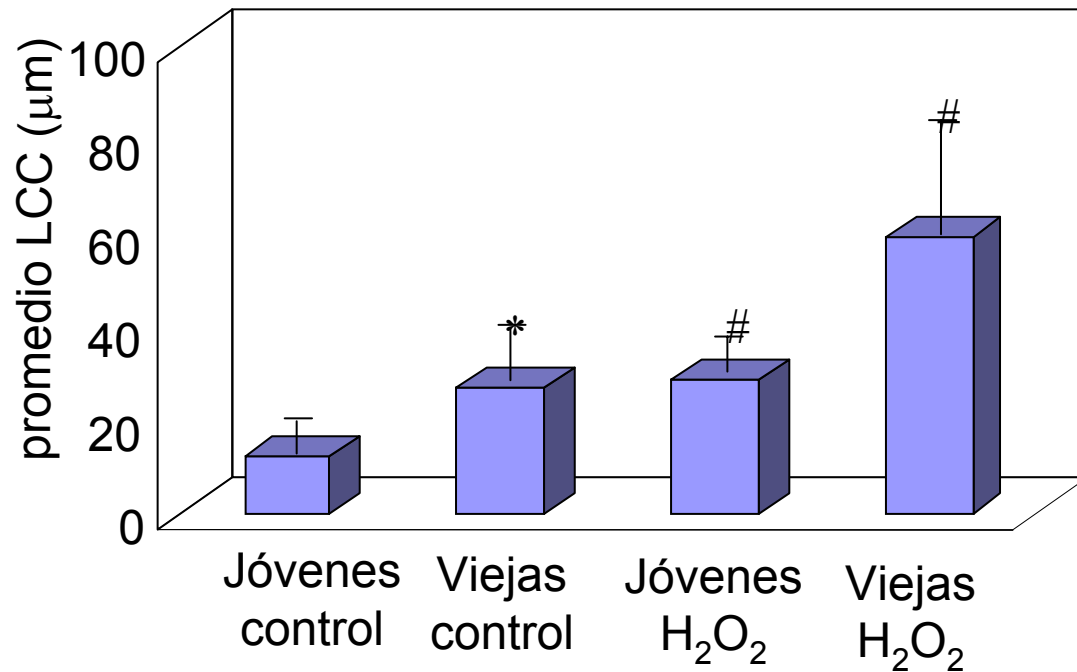


Figura 24: PROMEDIO DE LA LCC EN LAS CÉLULAS DAÑADAS TANTO CONTROLES COMO TRATADAS CON H₂O₂

Se realizó un promedio de la LCC de las células dañadas mostradas en las figuras 21 y 22. La n es diferente en cada caso, puesto que de la n = 150 original, sólo se consideraron las células con un daño > 1 μm. El recuadro representa la sustracción del daño basal determinado para las células controles (primeras dos barras en la figura principal).

* p<0.05 para las comparaciones entre el ADN de animales jóvenes y viejos control;

p<0.05 para las comparaciones del ADN de los ratones control contra los tratados con H₂O₂

jóvenes control, el incremento es de 4.84 veces (figura 24). El análisis estadísticos reveló una diferencia estadísticamente significativa en el promedio de la LCC entre las células control provenientes de animales jóvenes en comparación con las que derivan de animales viejos, así como entre las células tratadas con H_2O_2 y sus respectivos controles sin tratamiento (Kruskal-Wallis/ Tamhane $p < 0.05$). El inserto en la figura 24 representa la sustracción del promedio de la LCC basal obtenida en las células control, del promedio determinado para las células tratadas con H_2O_2 . El incremento neto en el daño al ADN de las células de los ratones viejos en comparación con las células de los ratones jóvenes debido al efecto del tóxico, fue del 52 % ($p < 0.05$).

Para evidenciar mejor los resultados antes descritos y ser consistentes con los resultados anteriores, se decidió agrupar al ADN dañado según la severidad del deterioro en dos categorías: daño leve (1 -60 μm) y daño severo (60 -120 μm) (tabla 1). Los resultados fueron los siguientes: Todas las células provenientes de los ratones jóvenes (las tratadas con H_2O_2 y las control), así como el 98 % de las células control y el 51.78% de las células tratadas obtenidas de los ratones viejos se agruparon en la categoría de daño leve. Mientras que el 48.22 % de las células de animales viejos tratadas con H_2O_2 se concentraron en el rango de daño severo.

En resumen, las células control obtenidas de los animales viejos no presentaron un porcentaje mayor de núcleos dañados en comparación con las células de animales jóvenes, aunque si en cuanto a la magnitud del daño. Sin embargo, al ser tratadas con el H_2O_2 se incrementó drásticamente la cantidad de núcleos dañados y la magnitud de daño de manera significativa con respecto a las células de los animales jóvenes. Lo que sugiere que las

células de animales jóvenes tengan una mejor respuesta al estrés, mientras que las células de los animales viejos son más susceptibles al mismo.

9. GENERACIÓN DE ROS EN CÉLULAS PROVENIENTES DE RATONES JÓVENES Y VIEJOS.

Para evaluar si la respuesta diferencial ante el tratamiento con un agente tóxico estresante observada en los animales jóvenes y viejos, se podía correlacionar con la generación de diferentes cantidades de ROS, se determinaron los niveles de estas especies en células control y células tratadas con H_2O_2 . Esto se llevó a cabo por citometría de flujo usando el marcador fluorescente DCFH₂.

En la figura 25 se observa que las células control provenientes de los ratones jóvenes mostraron un nivel basal de ROS estadísticamente mayor al que se determinó para las células obtenidas de los ratones viejos ($p < 0.02$). El tratamiento con 0.3 mM de H_2O_2 por 15 min tuvo solamente un ligero efecto sobre la inducción de las ROS en las células obtenidas de los individuos viejos y no pudo ser detectada en las células de los jóvenes (diferencia no estadísticamente significativa). Los valores de la intensidad de fluorescencia (IF) se encuentran en la tabla 2.

El hecho de que el incremento en la producción de ROS no se haya podido detectar a esta dosis, puede deberse a la rápida captura y neutralización de los radicales libres por parte de los sistemas antioxidantes, o a la alta velocidad que tienen estas especies para reaccionar con otras moléculas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Por otro lado, se ha reportado (Baraja et al., 1994), que una alta tasa metabólica correlaciona con un incremento en la generación de ROS, y que la fuente principal de dichas especies es la cadena respiratoria mitocondrial (Wei, 1998).

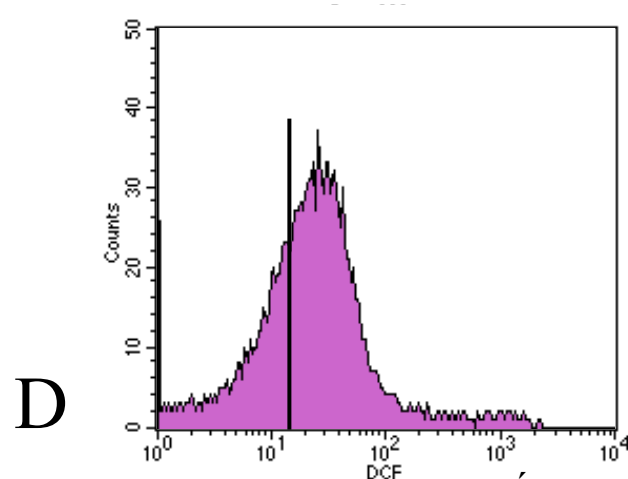
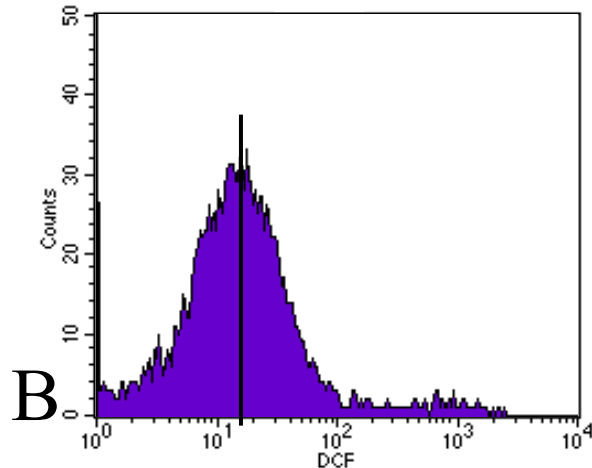
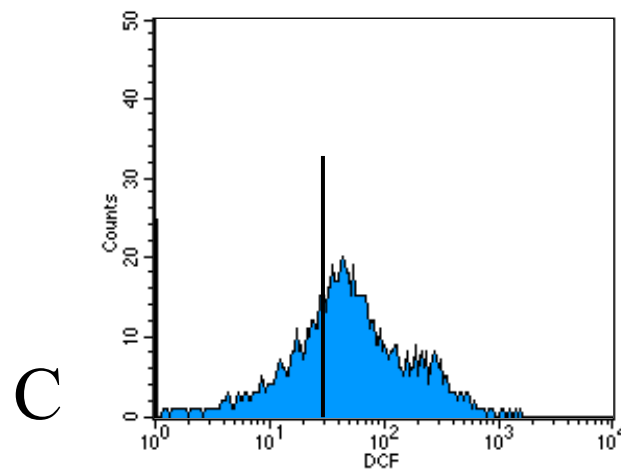
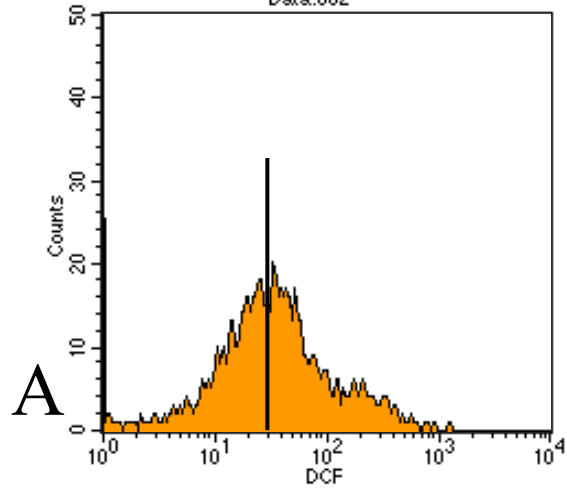


Figura 25: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ROS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Histogramas representativos. :

- A. Células de ratones jóvenes control únicamente con DFCH₂ (Diacetato de diclorodihidrofluoresceína)
- B. Células de ratones viejos control con DCFH₂
- C. Células de ratones jóvenes con DFCH₂, tratados con H₂O₂ por 15 min.
- D. Células de ratones viejos con DFCH₂, tratados con H₂O₂ por 15 min.

Las líneas representan el sitio donde se encuentra el promedio de la intensidad de fluorescencia en los controles y se emplearon las mismas líneas en los tratados para evidenciar el corrimiento de la fluorescencia.

| IF = \bar{x} de IF)(% eventos monitoreados) | | |
|---|----------------------------|--|
| | Control | Tratadas con H ₂ O ₂ |
| Jóvenes | 1598.3 ± 431.0 | 1627.4 ± 346.3 |
| Viejas | 881.8 ± 347.9* (p<0.02) | 1118.4 ± 663.9 |

Tabla 2: GENERACIÓN DE ROS CUANTIFICADAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Los resultados que se presentan son el promedio de 5 experimentos realizados por duplicado (n = 10). Los datos se encuentran normalizados ya que la Intensidad de Fluorescencia (IF) = (promedio de la IF)(% de eventos moitoreados).

| Día del cultivo | Jóvenes DO/cél (normalizado) | Viejas DO/cél (normalizado) |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 13 inicio | 1.40 ± 0.20 | 0.96 ± 0.11* |
| 15 logaritmica | 2.10 ± 0.21 | 1.19 ± 0.43* |
| 19 senescencia | 2.17 ± 0.42 | 1.38 ± 0.49* |

| Día del cultivo | Jóvenes DO/cél (normalizado) | Viejas DO/cél (normalizado) |
|------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Del día 13 al 19 | 1.89 ± 0.45 | 1.18 ± 0.42* |

Tabla 3: GENERACIÓN DE ROS EN FUNCIÓN DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA (ENSAYO MTT)

Los resultados que se presentan son el promedio de 3 experimentos realizados por triplicado (n = 9). Los datos se obtuvieron en tres etapas del cultivo: al inicio (día 13), durante la fase logarítmica de crecimiento (día 15) y al inicio de la senescencia (día 19).

Con el propósito de determinar si los altos niveles basales de ROS encontrados en las células control de los ratones jóvenes correlacionaban con una mayor actividad metabólica se analizaron los resultados del ensayo MTT, que mide de manera indirecta la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial y los radicales superóxido que se pudieran genera por esta vía (Mossman, 1983).

En la tabla 3 se presenta la reducción del MTT determinada en tres etapas del cultivo: al terminar la fase de establecimiento (día 13), durante la fase de crecimiento logarítmico (día 15) y al inicio del límite de Hayflick o senescencia replicativa (día 19). Se encontró que hay un reducción del MTT significativamente superior ($p < 0.05$) en las células derivadas de animales jóvenes, sugiriendo diferencias metabólicas entre las células provenientes de individuos jóvenes y de individuos viejos.

Estas diferencias fueron constantes e independientes de la fase de proliferación en la cual se encontraba el cultivo. Por lo tanto, estos resultados apoyan la idea de que la tasa metabólica podría tener un papel fundamental en la alta producción endógena basal de las ROS encontrada en las células de los ratones jóvenes.

PARTE III: LA PROTEINA Bcl-2

10. EXPRESIÓN ENDÓGENA DE LA PROTEÍNA BCL-2

Los inmunoensayos tipo Western realizados en los homogenados obtenidos de los pulmones de los ratones a diferentes edades, mostraron que existe un claro incremento en la cantidad de la proteína Bcl-2 a lo largo de la vida en dicho órgano (figura 26A). Así mismo, se encontró un incremento en los niveles de la proteína Bcl-2 en las células senescentes derivadas de los animales viejos, no así en el caso de las células senescentes provenientes de los animales jóvenes, en donde los niveles de Bcl-2

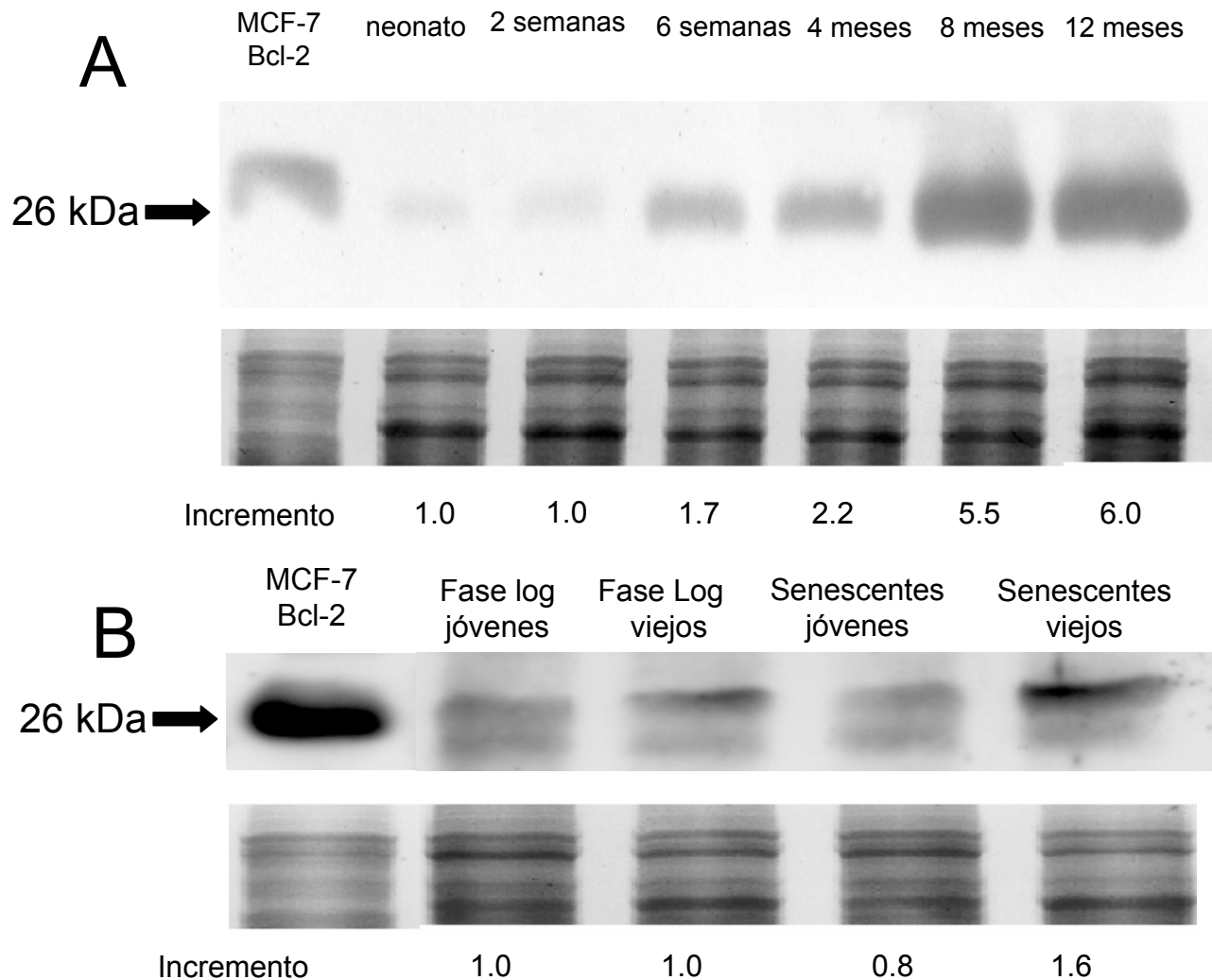


Figura 26: EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-2 , INMUNOENSAYO TIPO WESTREN

A. Niveles de Bcl-2 en homogenado de pulmón de ratones neonatos hasta 12 meses de edad.

B. Niveles de Bcl-2 en cultivos primarios de 15 y 30 días, derivados de pulmones de ratones jóvenes y viejos.

Los pánels inferiores de cada figura son los controles de cargado teñidos con azul de Coumassie. El primer carril es el control positivo y valor del incremento es tomando como referencia al segundo o tercer carril dependiendo el caso.

no aumentaron (Figura 26B). Este incremento, observado de manera exclusiva en las células de los animales viejos, sugiere la existencia de un fenómeno molecular persistente relacionado al deterioro fisiológico, que únicamente ocurre *in vivo*, y que por lo tanto, se encuentra ausente en las células de los animales jóvenes.

11. SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-2

Se realizaron geles de agarosa para identificar los plásmidos que se amplificaron antes de realizar la cotransfección en las células empaquetadoras 293T. Así mismo, fue importante monitorear que la cotransfección y posteriormente la infección hubieran sido exitosas en cada una de las ocasiones en las que se efectuaron, antes de continuar con el resto de los experimentos. La verificación indirecta puede lograrse gracias a la propiedad de la proteína reportera GFP codificada en el mismo plásmido en el que se encuentra el cDNA de Bcl-2. Las células infectadas con las partículas virales presentan fluorescencia verde si se usa la longitud de onda adecuada en el microscopio de fluorescencia, permitiendo verificar la eficiencia de la transfección y de la infección.

En la figura 27, se muestran las células observadas en el microscopio confocal de fluorescencia. En el panel A se presentan las células GFP y en panel C se distinguen las células Bcl-2, los paneles B y D son las mismas células vistas sin fluorescencia. Es importante mencionar, que las secuencias para la proteína GFP y para la proteína Bcl-2 no se encuentran bajo el control del mismo promotor. La secuencia *bcl-2* se encuentra bajo la regulación del promotor del citomegalovirus murino (CMV), mientras que el gene *gfp* está regulado por el promotor de la polimerasa 2. De modo que la fluorescencia dada por la GFP formalmente sólo refleja la eficiencia en la infección, más no en la sobreexpresión de Bcl-2. La manera directa de asegurar la presencia de la proteína Bcl-2 fueron los inmunoensayos

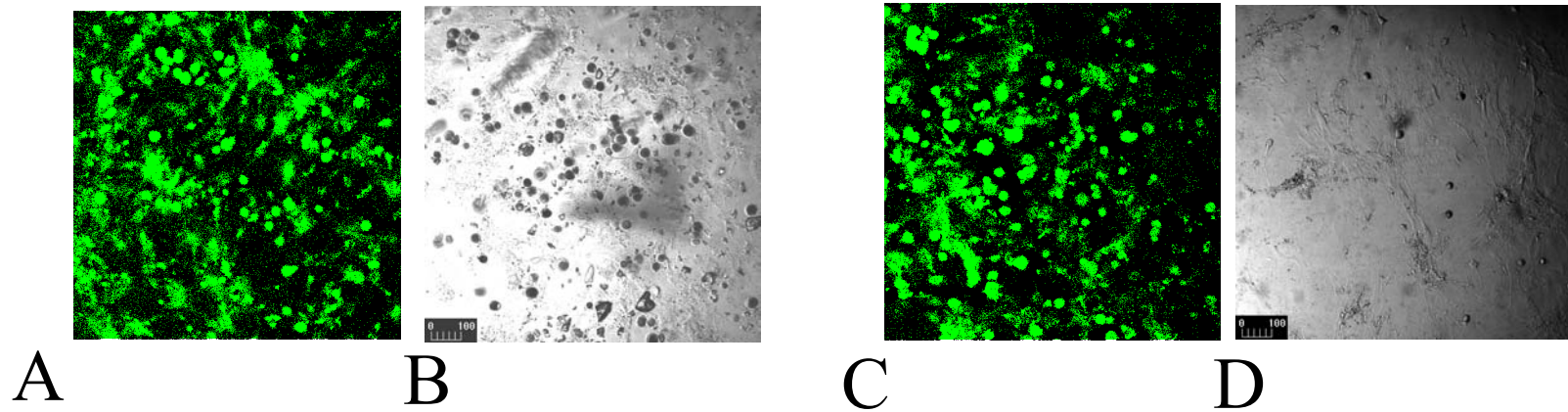


Figura 27: MICROSCOPIA CONFOCAL DE LAS CÉLULAS INFECTADAS CON LAS PARTÍCULAS VIRALES.

- A. Células provenientes de animales jóvenes infectadas para que sobreexpresen la proteína GFP. Microscopía confocal de fluorescencia.
- C. Células provenientes de animales jóvenes infectadas para que sobreexpresen la proteína GFP y a la proteína Bcl-2. Microscopía confocal de fluorescencia.
- B y D. Son los mismos campos que A y B, pero sin fluorescencia.



Figura 28: SOBREENPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-2, INMUNOENSAYO TIPO WESTERN

En el primer carril se observa el control positivo. En los carriles donde se indica GFP_H y Bcl-2_H, significa que esas células fueron tratadas con H₂O₂.

tipo Western que se realizaron con este fin. Como puede advertirse en figura 28, no se observó un aumento evidente en este ensayo, esto pudiera estar relacionado con el hecho de que no todas las células del cultivo se infectaron. Se ha estimado que aproximadamente un 50% de la población incorporó la información genética, de modo que al analizar los resultados habrá que tomar en consideración que los cultivos representan una población mixta en cuanto a la sobreexpresión de la proteína Bcl-2.

12. EFECTO DE LA PROTEÍNA BCL-2 FRENTE A UN RETO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS PROVENIENTES DE RATONES JÓVENES

Otro resultado que vale la pena discutir está relacionado con el hecho de que las células Bcl-2 antes de haber sido sometidas a ningún tipo de tratamiento, presentaron un decremento estadísticamente significativo en cuanto a su proliferación en comparación con las células GFP y las controles. Esto indica que la proteína Bcl-2 tiene un efecto negativo sobre la proliferación celular, hecho que podría estar relacionado con su protección en contra del estrés oxidativo.

En la figura 29 se exhiben los resultados obtenidos después de una semana de haber sometido a las células provenientes de los animales jóvenes al estrés oxidativo. En el panel A se encuentran los resultados relacionados con la tasa de proliferación celular. Lo primero que vale la pena resaltar es que las células GFP se comportaron de la misma manera que las células control que no fueron sometidas a la infección retroviral. Esto permite validar el modelo y asegurar que el efecto que se observa no fue debido a la infección retroviral sino a la sobreexpresión de la proteína Bcl-2.

Tanto las células control, como las GFP, disminuyeron sus niveles de proliferación en un 88% después de haberse sometido al tratamiento con H₂O₂. Mientras que las células Bcl-2

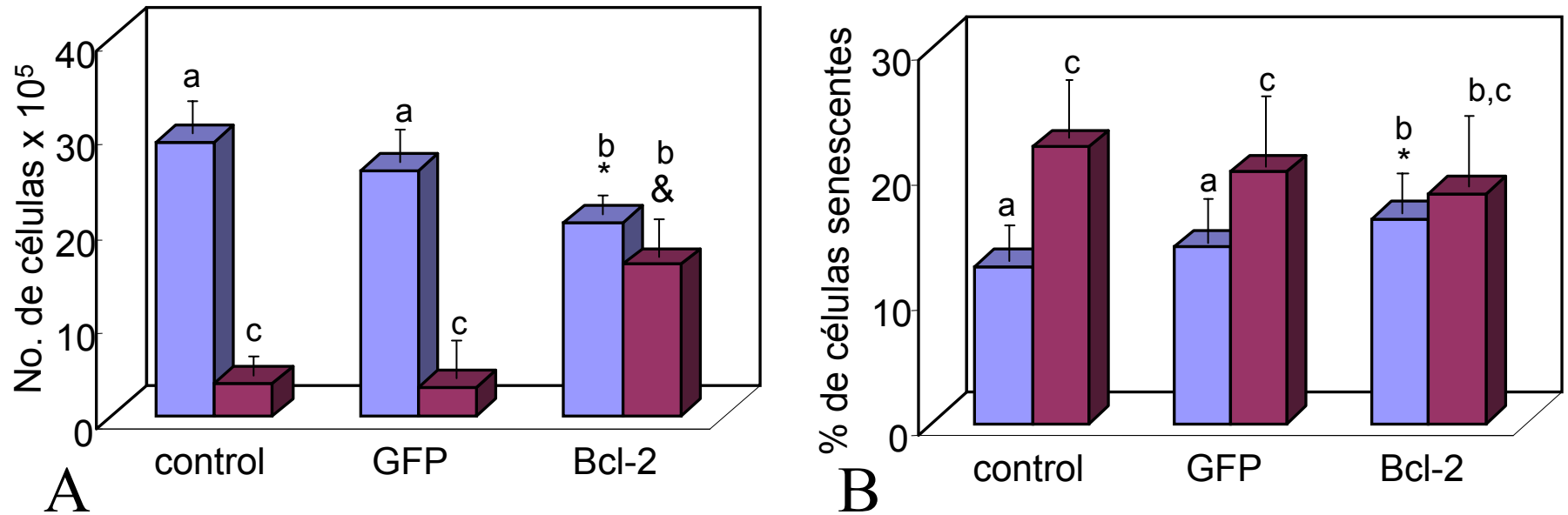


Figura 29: PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO EN CÉLULAS PROVENIENTES DE ANIMALES JÓVENES QUE SOBREENPRESAN Bcl-2

En ambas figuras el las barras claras indican las células sin tratamiento y las oscuras las células tratadas con 75 μ M de H₂O₂. Las células control no fueron infectadas, las células GFP se infectaron únicamente con la información para sobreexpresar a la proteína GFP, mientras que las células Bcl-2, sobreexpresan tanto a GFP como a Bcl-2. Los resultados se realizaron el día 15 del cultivo y son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado (n = 9).

A. Tasa de proliferación.

B. Porcentaje de células positivas al ensayo SA- β -gal.

En donde las barras que tienen las mismas letras significa que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

* Diferencia estadística en comparación con las otras células sin tratamiento

& Diferencia estadística en comparación con las otras células tratadas con H₂O₂ (p < 0.05)

únicamente disminuyeron su proliferación en un 22 % ($p < 0.05$) . Lo que sugiere que la proteína Bcl-2 pudiera aportar algún tipo de protección frente al estrés oxidativo, lo cual les permitió a estas células seguir proliferando.

Los resultados en cuanto al número de células senescentes cuantificadas para los fibroblastos obtenidos de los animales jóvenes aparecen en la misma figura 29, panel B. Se distingue, al igual que en los experimentos de proliferación, que existe un efecto adjudicado a la sobreexpresión de Bcl-2, antes de que se someta a las células a algún tratamiento. Las células Bcl-2 muestran un incremento del 30% en la cantidad de células senescentes con respecto a las células control ($p < 0.05$). Sin embargo, después del tratamiento con H_2O_2 , no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tres cultivos. Esto sugiere que la proteína Bcl-2 podría estar induciendo la aparición de una senescencia prematura.

13. EFECTO DE LA PROTEÍNA BCL-2 FRENTE A UN RETO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS DERIVADAS DE RATONES VIEJOS.

Los cultivos primarios derivados de ratones viejos resultaron ser muy sensibles a la infección retroviral, por lo que para obtener el número necesario de células para realizar los experimentos, hubo que esperar más días. Es por ello que se decidió determinar el número de células que proliferaron después de la infección sin tratamiento con H_2O_2 . Los resultados denotaron una proliferación disminuida tanto para las células GFP como para las Bcl-2 (figura 30, panel A). Esta diferencia, estadísticamente significativa, indicó que la sola infección retroviral pudo haber dañado a las células de los animales viejos de manera tal, que no pudieron proliferar en forma semejante al grupo control sin infectar. De modo que en este caso el modelo no permitió sacar conclusiones en cuanto al efecto de Bcl-2, y es por esa razón que no se realizaron los experimentos de estrés oxidativo.

El hecho de que las células obtenidas de animales viejos presentaran una susceptibilidad tan marcada a la infección viral, resulta interesante en si mismo, puesto que esto difiere con lo que se observó en las células derivadas de individuos jóvenes.

Los datos de la figura 30, panel B, referentes a la cantidad de células senescentes son también sugerentes y pueden complementar los experimentos anteriores. En este caso, las células GFP y Bcl-2 presentaron un incremento en el número de células senescentes que fue estadísticamente significativo en los dos primeros días del experimento (17 y 19) y no así en el día 21). En el día 17 se contaron 132 % más células positivas a la tinción SA- β -gal en los cultivos infectados que en el control. Mientras que para el día 19 esta diferencia fue del 60% y para el día 21 no hubo una diferencia significativa. Al parecer la infección viral genera la cantidad de estrés suficiente como para inducir una senescencia prematura en las células de los ratones viejos.

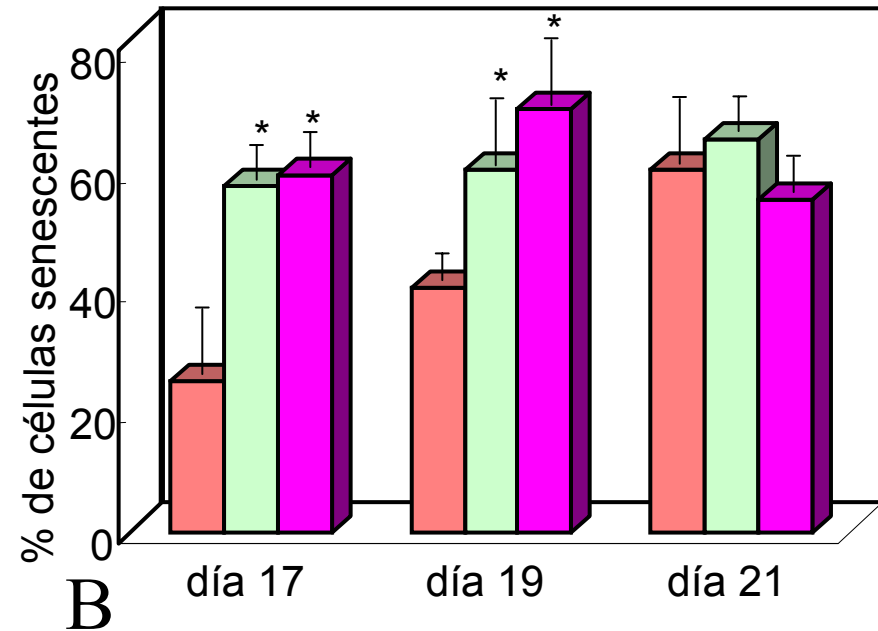
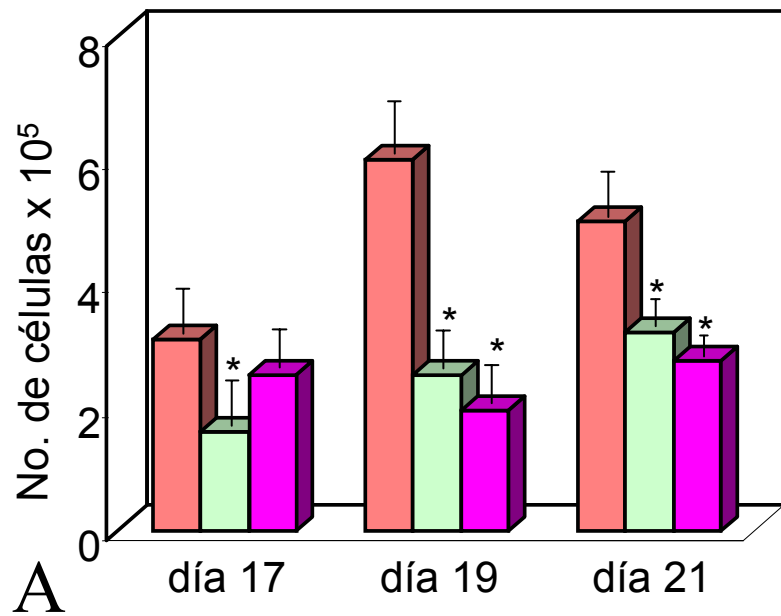


Figura 30: PARÁMETROS DE ENVEJECIMIENTO EN CÉLULAS PROVENIENTES DE ANIMALES VIEJOS QUE SOBREENPRESAN Bcl-2

En ambas figuras el las barras claras indican las células control que no fueron infectadas, las barras blancas pertenecen a las células GFP que se infectaron únicamente con la información para sobreexpresar a la proteína GFP, mientras que las oscuras son las células Bcl-2 que sobreexpresan tanto a GFP como a Bcl-2. Estas células no tuvieron ningún tratamiento posterior. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado (n = 9).

A. Tasa de proliferación.

B. Porcentaje de células positivas al ensayo SA-β-gal.

* Diferencia estadística en comparación con las control que no se infectaron (p < 0.05)

DISCUSIÓN

Es muy común que las investigaciones que pretenden estudiar fenómenos a nivel celular y/o molecular se realicen *in vitro* empleando líneas celulares que permitan mantener controladas una gran cantidad de variables y así poder analizar un fenómeno de manera particular. Sin embargo, para examinar el proceso del envejecimiento, este tipo de aproximación resulta inadecuada, ya que por definición las líneas celulares no envejecen. Es por eso que se han usado diferentes modelos de estudio tratando de definir los cambios que se generan a lo largo de la vida de los seres vivos. Para ello, se han empleado organismos cuya duración de vida (“life span”) sea corta. Entre los modelos más explorados se encuentran las levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae* (Culotta et al., 1997; Imai y Guarente 2000), los nemátodos, en particular la especie *Ceanorhabditis elegans* (Cypser y Johnson, 1999; Hekimi, 2000) y las moscas de la fruta, *Drosophila melanogaster* (King y Tower 1999; Orr y Sohal, 2003). No obstante, cuando se trata de estudiar el envejecimiento en los mamíferos, los aspectos prácticos se complican, ya que los tiempos de vida de la mayoría de las especies son largos, incluso de las especies cuya vida se considera de corta duración (por ejemplo los roedores que viven 2 años). Por esta razón, muchos grupos dedicados a la investigación geriátrica utilizan a los cultivos primarios (principalmente de fibroblastos) como modelo de estudio para entender el proceso del envejecimiento.

En nuestro caso particular, este hecho se complicaba doblemente. Lo ideal para contestar a la hipótesis planteada referente al efecto de la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 sobre la prolongación de la viabilidad y el retraso en la senescencia, hubiera sido un modelo de estudio de ratones transgénicos de Bcl-2. Sin embargo, la obtención de animales transgénicos es un proceso largo, costoso y complejo, además de que después de haberlos

obtenido habría que esperar dos años para ver los efectos de Bcl-2. Una alternativa más viable y que proporciona información parecida a lo que sucede *in vivo*, son los cultivos primarios. Por lo que en este trabajo se emplearon cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón, a los cuales se les indujo la sobreexpresión de Bcl-2 mediante infección retroviral.

Una fortaleza de este modelo, es que se emplearon células provenientes tanto de animales jóvenes como de animales viejos, lo que permitió hacer un análisis más profundo de este fenómeno. Cabe resaltar que se emplearon hembras de pie de cría que, aunque por tener 12 meses, cronológicamente aún no se consideran viejas, estas hembras presentaron un fenotipo envejecido muy parecido al que presentan las hembras de 24 meses, posiblemente asociado al deterioro fisiológico que implica los múltiples embarazos. Este modelo resultó ser muy interesante, y por lo tanto valdría la pena estudiarlo más a fondo.

En cuanto al modelo *in vitro*, se sabe que las células en cultivo 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 de la que se trate (Hayflick y Moorhead, 1961). Actualmente es posible conseguir ciertas líneas celulares, derivadas de células embrionarias que senescen en cultivo después de un cierto número de duplicaciones, como son los fibroblastos normales humanos IMR90 (Chen et al., 2000), los WI-38 (Wolf et al., 2002) o los MRC-5 (Lee et al., 2002), todos obtenidos de pulmón embrionario.

En los últimos años, se ha reportado que es posible promover la senescencia de manera prematura en cultivos primarios, mediante la expresión inducida de ciertos genes como *ras* o *raf* (Palmero y Serrano, 2001); así como por su exposición a concentraciones subletales de agentes que generan estrés oxidativo (Chen et al., 1995; Toussaint et al., 2000). Incluso se ha reportado la inducción de la senescencia en cultivos tumorales (Chang et al., 1999;

Hwang 2002, Crescenzi et al., 2003). Todos estos tipos celulares presentan en gran parte las características fenotípicas y bioquímicas de las células senescentes, pero no necesariamente todas sus particularidades. Por lo que en ocasiones se les denomina células tipo-senescentes (“senescent-like”). Para complicar más el panorama, se ha sugerido que el arresto en la proliferación celular y el fenotipo tipo-senescente pudieran estar relacionados con las diferentes condiciones del cultivo (Kodama et al., 2001; Wrigth y Shay, 2002). Todos estos resultados han llevado a redefinir el concepto y los criterios de cuantificación de la senescencia en el campo de la biogerontología (Chen et al., 2000).

Uno de los objetivos de este trabajo fue el de analizar si las células de animales jóvenes al envejecer en cultivo presentan las mismas características fenotípicas y fisiológicas que los cultivos de células obtenidas de animales que van envejeciendo de manera paulatina a lo largo de los años. Los resultados demostraron que, aunque el comportamiento general de ambos cultivos fue similar, se observó una diferencia estadísticamente significativa en los datos de cada uno de los experimentos durante la primera fase del cultivo (días 7 al 19). Es decir, los fibroblastos de los ratones jóvenes proliferaban más rápidamente, incorporaban más timidina y tenían un metabolismo mitocondrial más activo que los de los animales viejos, y presentaron una menor cantidad (prácticamente nula) de células positivas a la tinción SA- β -gal. Esta última observación coincide con los datos reportados por otros investigadores, quienes han determinado la existencia de un mayor número de células senescentes (SA- β -gal positivas), en los cultivos provenientes de animales viejos o de personas ancianas, que en los cultivos de individuos jóvenes (Bruce et al., 1986).

Se observó que conforme las células de los ratones jóvenes envejecían *in vitro*, se iban pareciendo cada vez más a las células de los ratones viejos, tanto desde el punto

morfológico (células grandes, aplanadas y con vacuolas), como en los parámetros de envejecimiento cuantificados. A partir del día 19, (día en el que el cultivo inicia la etapa de senescencia), se observó una disminución en la tasa de proliferación celular, así como de la síntesis de ADN y de la actividad respiratoria, que coincidió con un incremento en el número de células senescentes. De hecho, el decremento en la reducción del MTT y en la incorporación de timidina tritiada determinado en los cultivos provenientes de los animales jóvenes, fue mucho más drástico que en el cultivo proveniente de los animales viejos, sugiriendo que al acercarse al límite de Hayflick, las células en cultivo pudieran sufrir alteraciones que las induzcan a convertirse en células senescentes.

La transformación de las células provenientes de los ratones jóvenes continuó hasta el punto en el que no se encontraron diferencias estadísticas en la actividad respiratoria, en la síntesis de ADN, ni en la tasa de proliferación en comparación con las células de los ratones viejos, en contraste con el número de células positivas a SA- β -gal, que fue incrementando su tasa de aparición. Para el día 27 del experimento, ambos cultivos presentaron fenotipos senescentes prácticamente indistinguibles, corroborando la hipótesis de que la acumulación de las células senescentes en tejidos vivos pudiera contribuir al deterioro que presentan los organismos y que se asocia al envejecimiento (Campisi, 2000). Esto se debe a que, cuando se acumulan grandes cantidades de células senescentes (con un metabolismo alterado), dentro de un tejido, este empieza a perder en gran medida su funcionalidad.

Si hubiésemos terminado esta primera parte del trabajo aquí, la conclusión lógica a la que habríamos llegado hubiera sido que las células jóvenes al senescer en cultivo adquieren exactamente las mismas características que las células de los animales viejos y por lo tanto

son equivalentes. Sin embargo, para complementar estos resultados, hacía falta cuantificar algún marcador molecular que aumentara durante la senescencia *in vivo* y que se incrementara también mientras las células jóvenes envejecen en cultivo. En realidad un marcador así todavía no se ha descrito, por eso se sigue usando la tinción SA- β -gal como marcador de senescencia; pero se sabe que muchas proteínas críticas para la regulación del ciclo celular pueden inducir la muerte programada, mientras que algunos componentes de la maquinaria apoptótica pueden influir en el ciclo celular (Dobashi et al., 2004; Liu et al., 2004). Por lo anterior, se puede proponer que alguna proteína que participara en estas vías, pudiera funcionar como marcador molecular, e incluso tener alguna ingerencia dentro de la inducción de la senescencia. Una molécula que resulta atrayente por varios motivos para cumplir este papel es la proteína Bcl-2.

En los últimos diez años se han descrito funciones de Bcl-2, que aparentemente son independientes de su actividad anti-apoptótica (Vairo et al., 1996). Ahora se sabe que la sobreexpresión de Bcl-2 tiene la capacidad de retrasar e incluso frenar la proliferación celular (Kumazaki et al., 2002), así como la capacidad de proteger a las células frente al estrés oxidativo, puesto que incrementa los niveles de algunos antioxidantes como la SOD-Cu/Zn y el GSH (Lee et al.2001; Meredith et al, 1998). Si estas facultades están relacionadas entre sí o son independientes, aún queda por aclararse.

Una de las características distintivas de las células senescentes es su falta de respuesta a estímulos apoptóticos. E Wang (1995) propuso que los fibroblastos senescentes humanos resisten la muerte celular programada debido a su incapacidad para suprimir la expresión de Bcl-2. Este primer reporte que vincula a Bcl-2 con la senescencia, visto a la luz de los nuevos hallazgos donde se relaciona a la proteína anti-apoptótica con la regulación del ciclo

celular, podrían interpretarse como una propiedad más de Bcl-2, haciéndola una proteína muy atractiva para estudiarse en el contexto de la senescencia y el envejecimiento.

En cuanto a la expresión endógena de Bcl-2 a lo largo de la vida, la literatura reporta datos contrastantes. Mientras algunos autores han encontrado que los niveles de Bcl-2 aumentan en cerebro (Kaufmann et al, 2001), otros indican que disminuye en células T y corazón (Pahlavany y Vargas, 2001; Phaneuf y Leeuwenurg, 2002), ambos de rata. Esta diversidad en resultados podría explicarse con base en la especificidad y particularidad funcional y metabólica de los diversos tejidos. En este trabajo se encontró que el contenido de la proteína Bcl-2 se incrementa clara y constantemente en las células de pulmón conforme aumenta la edad de los ratones. El incremento observado *in vivo*, correlaciona con un aumento en los niveles de la proteína en las células senescentes derivadas de los animales viejos, más no así en el caso de las células senescentes provenientes de los animales jóvenes, en donde la expresión de Bcl-2 no aumentó significativamente. Es innegable que la magnitud del incremento *in vitro* fue menos evidente que *in vivo*, lo cual puede explicarse debido a que el lisado de proteínas obtenido de los homogenados de pulmón es cualitativamente diferente al lisado procedente de los cultivos de fibroblastos, ya que el primero contiene varios tipos celulares. Aún así, el incremento observado de manera exclusiva en las células de los animales viejos, sugiere la existencia de un fenómeno molecular persistente relacionado al deterioro fisiológico, que únicamente ocurre *in vivo*. Este podría estar relacionado con la continua exposición a factores del medio ambiente; y por lo tanto, se encontraría ausente en las células de los animales jóvenes que no estuvieron expuestas a ese tipo de estímulos.

El aumento en la expresión endógena asociada a la edad que se encontró en las células provenientes de los animales viejos sólo presenta un efecto pobre en cuanto a la protección

contra la muerte en las células senescentes. La tasa de muerte celular entre los días 19 y 27 es sólo 1.5 veces mayor en los cultivos derivados de los animales jóvenes en los que el contenido de Bcl-2 es menor (0.8) que el que presentan los cultivos provenientes de los animales viejos (1.6) (Figura 26B). Sin embargo, esto debería analizarse con más cuidado, ya que es posible que sin la participación de Bcl-2, el daño que presentan dichas células pudiera haber activado al programa de muerte apoptótica. Nuestros resultado no demuestran una protección en ese sentido, aún así, la idea de correlacionar los niveles elevados de Bcl-2 con el hecho de que las células senescentes no respondan a estímulos apoptóticos, sigue siendo muy interesante. En otras palabras, una célula de un individuo de edad avanzada con un alto contenido de Bcl-2, y que al mismo tiempo, por estar expuesta al estrés oxidativo o algún otro agente tóxico o del medio ambiente, presentara una desregulación en el ciclo celular o alguna alteración a nivel del ADN, no estaría en condiciones de iniciar un proceso de muerte celular programada por sus altos niveles de Bcl-2. Esto pondría en peligro al organismo, ya que la división celular perpetuaría el daño pasándolo a la siguiente generación. Sin embargo, como ya se ha mencionado, se sabe que Bcl-2 tiene la capacidad de disminuir la velocidad del ciclo celular alargando el tiempo en el que las células pasan de G0 a G1 e incluso puede llegar a inducir un arresto irreversible en este punto, promoviendo así la senescencia prematura (Tombor et al., 2003). El hecho de que las células dañadas arresten su proliferación estaría protegiendo al organismo, por lo que se ha propuesto a la senescencia como un mecanismo supresor de tumores (Campisi, 1997), y Bcl-2 podría tener una participación en este fenómeno (figura 31).

La hipótesis anterior es muy sugestiva, sin embargo, existen otras ideas alternativas que explican el incremento de Bcl-2 observado en las células senescentes. La teoría de Harman (1956) del envejecimiento por radicales libres postula que el organismo está expuesto a

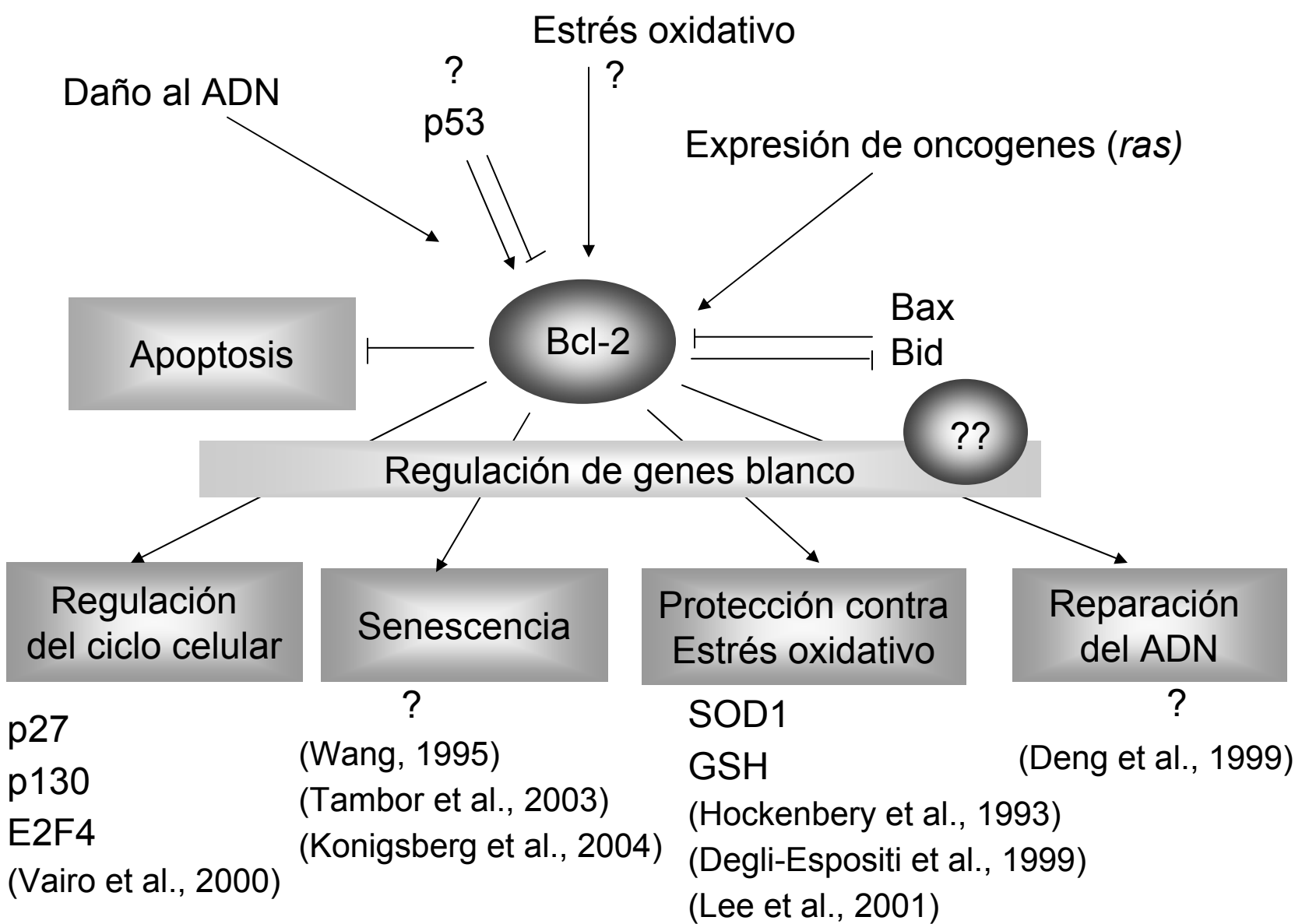


Figura 31: PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA Bcl-2 EN DIFERENTES VÍAS DEL METABOLISMO CELULAR

diferentes niveles de estrés oxidativo a lo largo de la vida, y que el daño acumulado por dicho estrés se manifiesta como envejecimiento. Puesto que Bcl-2 se ha relacionado con una resistencia ante el estrés oxidativo (Hockembery et al.,1993), puede postularse que el incremento en esta proteína pudiera ser una respuesta gradual de las células a los cambios redox que se suceden en la célula (Droge, 2002) y/o a la acumulación de alteraciones moleculares y cambios epigenéticos inducidos por el estrés oxidativo generado por el metabolismo normal, y no por cuestiones relacionadas con el ciclo celular o a la senescencia en si misma. Existen reportes de experimentos en los cuales se utilizaron concentraciones subletales de H₂O₂ para inducir la senescencia prematura en los fibroblastos humanos IMR-90. En estas células se observó una elevación en el contenido de Bcl-2 (y no de Bax) después del tratamiento con H₂O₂ (Chen et al., 1995; Chen et al., 2000). Este no fue el caso en los experimentos realizados con cuatro líneas de fibroblastos humanos (HCA2,TIG-1, TIG-3 and WI-38) que envejecieron *in vitro* y adquirieron un fenotipo senescente, al mismo tiempo que disminuyeron los niveles basales de Bcl-2, sin presentar cambios en otras proteínas anti-apoptóticas (Bcl-XL, Bcl-W) o pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bik, Bad; Sasaki et al., 2001). Si se comparan estos dos experimentos, parecería que la presencia de estrés oxidativo juega un papel muy importante en la inducción de la expresión de Bcl-2 en el envejecimiento *in vitro*. Esto confirma nuestros resultados de que las células derivadas de animales jóvenes que envejecen en cultivo logran obtener un fenotipo senescente, pero que este fenotipo es incompleto o se alcanza por un mecanismo distinto al que se adquiere gradualmente en el envejecimiento *in vivo*.

Recientemente se ha relacionado al envejecimiento con alteraciones a nivel epigenético (Lezhava, 2001; Issa, 2002; Ikura and Ogryzko, 2003). Por lo que no se puede descartar el que la sobreexpresión de Bcl-2 sea un fenómeno secundario ante alguna disfunción del

ciclo celular o una respuesta orientada a contrarrestar los daños por el estrés oxidativo, sino únicamente una desregulación en la estructura, compactación y señalización de la cromatina que induce una sobreexpresión anormal de esta proteína.

Todos estos escenarios podrían coexistir, lo que nos lleva a la siguiente parte de este trabajo en donde se analizó, si no las alteraciones epigénéticas directamente, si los daños a nivel del ADN y la diferente susceptibilidad que muestran las células de animales jóvenes y viejos frente a un reto de estrés oxidativo, así como la respuesta que presentan en cuanto a su proliferación y senescencia cuando se induce artificialmente la sobreexpresión de Bcl-2.

Retomando la teoría de Harman del envejecimiento por radicales libres, existen estudios que correlacionan un incremento en la lipoperoxidación, en los niveles de carbonilos (Mutlu-Turkoglu et al., 2003), así como en el daño oxidativo sobre el ADN (Hamilton et al., 2001; Wolf et al., 2002), con la edad avanzada de los organismos. Es por ello que se propone que la incidencia de estos factores, de manera independiente o en conjunto, contribuya de una manera importante al deterioro y a las enfermedades relacionadas con la vejez.

No es por lo tanto sorprendente, que los animales viejos y las personas ancianas sean más propensos a infecciones (Effros, 2003), a enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (Weyand et al., 2003), y especialmente a neoplasias (Campisi, 2000). Además, se ha presupuesto que existe un decremento en la tolerancia al estrés oxidativo asociado a la edad avanzada, que conlleva a daños considerablemente mayores a los que se observan en los organismos más jóvenes (Zhang et al., 2003).

Esta parte de los experimentos estuvo encaminada a determinar la existencia de una susceptibilidad diferencial en el ADN de los animales viejos frente al estrés oxidativo, en

comparación con el de los animales jóvenes. Como agentes tóxicos se emplearon CCl_4 y H_2O_2 debido a su conocido potencial para generar estrés oxidativo (Ahmad et al., 1987; Beddowes et al 2003; Lueken et al; 2004). El CCl_4 es metabolizado rápidamente en el sistema de mono-oxigenasas de las células hepáticas, mediante una deshalogenación reductora catalizada por el citocromo P450, que lo convierte en el radical triclorometilo (CCl_3^\bullet). Sin embargo, la mayoría de las líneas celulares de origen hepático y los cultivos primarios, pierden o disminuyen sus sistemas de P450, lo cual los inhabilita para metabolizar al CCl_4 (Guillouzo, 1998). Por esa razón, se decidió usar otro agente para generar estrés oxidativo en los experimentos *in vitro*. El H_2O_2 es un candidato excelente ya que al ser un precursor de especies reactivas de oxígeno genera al radical hidroxilo (OH^\bullet) en una reacción no enzimática catalizada por metales (Reacción de Fenton) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El daño oxidativo al ADN es una de las consecuencias más importantes del estrés oxidativo, causando disfunciones muchas veces irreversibles, que pueden incluso culminar con la muerte celular (Yoneda et al., 1995), y se ha usado también como un marcador de envejecimiento (Wolf et al., 2002). Para cuantificar el rompimiento de cadenas sencillas del ADN, se realizaron ensayos cometas con los fibroblastos obtenidos de ratones jóvenes y viejos, durante la fase de crecimiento logarítmico, y se encontró que existía un daño basal en ambos tipos celulares. El hecho de que se encontraran más células (35%) con daño moderado ($\text{LCC} \geq 20 \mu\text{m}$) en los cultivos de los animales viejos que en los jóvenes (4%), confirma la idea de que el daño al ADN se acumula con la edad (Hamilton et al., 2001). Después del tratamiento con H_2O_2 , el daño en ambos tipos celulares aumentó, sin embargo la LCC determinada para las células obtenidas de los ratones viejos fue considerablemente

mayor, presentando más de un 50% de células con daño severo ($LCC \geq 60 \mu m$). En contraste, no se encontraron células proveniente de animales jóvenes que presentaran una LCC de esta magnitud. En vista de que las células, en particular la que provenían de individuos viejos, presentaron un daño basal importante previo al tratamiento, fue necesario restar este valor (en términos de LCC), para poder determinar la aportación neta del daño inducido por el H_2O_2 . Después de hacer esta sustracción, en ambos tipos celulares, se encontró que el incremento en la migración de la cola de los cometas promovido por el H_2O_2 en las células de animales viejos, es muy similar a lo que se cuantificó para el ADN de las células de animales jóvenes. Esto sugiere que el aumento en la sensibilidad que se observa en los individuos viejos frente al estrés oxidativo no resulta únicamente por el daño que generan los tóxicos, o por la disminución en los sistemas primarios de defensa antioxidante, sino en gran medida, por el daño previo que se ha acumulado a lo largo de la vida.

En contraste con lo anterior, los resultados obtenidos con los experimentos de citometría para determinar los niveles de ROS endógenos, resultaron también interesantes. Las células derivadas de ratones jóvenes mostraron mayores niveles basales de ROS que las células derivadas de ratones viejos. Lo se puede explicar por el hecho de que las células de los organismos jóvenes tienen un metabolismo más activo y por lo tanto generan más ROS. Esto concuerda con otros reportes donde se compararon diferentes especies de animales encontrándose que las que tenían una tasa metabólica mayor producían más ROS (Pérez-Campo et al., 1998). Este resultado se corroboró con los datos obtenidos en el ensayo de MTT, que también se utiliza para cuantificar especies reactivas de oxígeno del tipo del superóxido (Mosamnn, 1983). Los resultados indicaron que existe una mayor actividad

mitocondrial en las células de los animales jóvenes independientemente de la fase del cultivo que se determine (tabla 3). Sin embargo, al tratar a las células con una dosis subletal de H₂O₂ por 15 min, no se encontraron diferencias estadísticas entre cada uno de los tipos celulares con respecto a sus controles. Este resultado es difícil de explicar, ya que la misma dosis es la que causó el daño que se cuantificó mediante el ensayo cometa. No es factible pensar que la dosis empleada para generar estrés oxidativo en los experimentos de citometría haya sido demasiado baja como para permitir observar una respuesta, ya que de ser así no se habrían generado los daños analizados en el ensayo cometa. Una posible explicación pudiera ser que los 15 min que se esperaron para determinar los niveles de ROS después de agregar el H₂O₂, hayan sido un tiempo demasiado largo, y los sistemas de defensa antioxidante ya hubieran eliminado a los radicales libres generados, no así la reparación del daño que produjeron en ese lapso de tiempo. De manera contraria al paradigma que se tenía de que los sistemas antioxidantes disminuyen con la edad (Ames, 1990), se ha demostrado recientemente que las diferentes enzimas que participan en estos sistemas de defensa, varían con la edad de una manera muy irregular. Se determinaron los niveles de SOD, GPx, CAT, ceruloplasmina, ácido úrico y bilirrubina en sangre de pacientes de diversas edades y no se encontraron diferencias estadísticas entre las concentraciones de ellos (Barnett y King, 1995). En contraste, la actividad de la SOD resultó ser más elevada en el hígado y cerebro de ratas viejas, mientras que la actividad de la GPx disminuyó y el contenido de GSH no tuvo cambio en estos órganos con respecto a la edad (Kim et al., 2003). Mosini y colaboradores reportan que aunque los niveles de GSH disminuyen en músculo de rata en relación a la edad, la actividad de la GPx y de la GSSG reductasa no presentan cambios en músculo e hígado (Mosini et al., 2004).

Por todo lo anterior, se ha sugerido (Barnett y King, 1995), que el incremento en la frecuencia de mutaciones y otras alteraciones del ADN asociada a la edad no son el resultado de un sistema antioxidante disminuido, sino probablemente de un decremento en la eficiencia para reparar los daños inducidos por las ROS, en particular el que se infringe sobre el ADN. Esto es muy interesante ya que se ha propuesto que las ROS no solamente causan daño estructural directamente sobre las biomoléculas, sino que son mediadores fisiológicos importantes que regulan varios procesos metabólicos, que pudieran responder a cambios en el estado redox de las células (Droge, 2002).

De manera contradictoria a lo sugerido por Barnett y King, Hamilton y colaboradores (2001) proponen que el aumento encontrado en el contenido de 8-OHdG, tanto en el ADN nuclear como mitocondrial, en los ratones viejos, no es el resultado de una capacidad reducida para remover las lesiones, sino por un incremento en la sensibilidad de los tejidos de animales viejos al estrés oxidativo.

Nuestros resultados indican que los niveles basales de 8-OHdG determinados en el ADN extraído de ratones viejos sin ningún tratamiento, fue 2.3 veces mayor que el que se cuantificó en el ADN de los ratones jóvenes. Después del tratamiento con CCl₄, el contenido de 8-OHdG en ambos grupos de animales aumentó de manera significativa. Se encontró que había un 27% más de daño en el ADN del hígado de los ratones viejos que en el de los jóvenes. Para determinar el valor neto del daño producido por el tóxico, se restó el daño basal que presentaba el ADN de los animales respectivamente, de manera similar a como se hizo para los ensayos cometas. Se encontró que el aumento en el contenido de 8OH-dG determinado para los animales viejos, es solamente de un 16%, apoyando la idea de que la disminución en la tolerancia al estrés oxidativo en los animales viejos correlaciona con el daño previo. Estos resultados indican que cuando las células de los

organismos viejos se tratan con un agente generador de ROS, la cantidad desproporcionada de daño que se ha reportado (Elder et al., 2000; Aikawa et al., 2003) no únicamente está dada por una respuesta inapropiada de las células frente a un reto oxidativo inmediato, sino que esta alta susceptibilidad podría explicarse por el daño al ADN acumulado a lo largo de la vida, como propone la teoría de Harman (Harman, 1956).

Para analizar si existe algún efecto protector conferido por la sobreexpresión exógena de la proteína Bcl-2 en cuanto a la proliferación y al retraso en la entrada a la etapa de senescencia, así como una protección contra el estrés oxidativo, se realizó una infección retroviral para lograr que se sobreexpresara dicha proteína.

Es importante aclarar que la infección retroviral al parecer no causó ningún efecto sobre los fibroblastos primarios de los ratones jóvenes, ya no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de proliferación o la respuesta a la tinción SA- β -gal entre los controles sin infección y las células infectadas únicamente con el gene para la proteína GFP. Esto indica que todas las diferencias encontradas en los cultivos que sobreexpresan a Bcl-2, pueden atribuirse a la expresión de esta proteína y no a la infección. No obstante, este no fue el caso para los cultivos primarios provenientes de los ratones viejos, ya que los datos mostraron diferencias significativas con respecto a los controles no infectados. Por esto no fue posible atribuir algún efecto a la proteína Bcl-2 debido a que la sola infección pudo haber sido la causante de los resultados observados, lo que se discutirá más adelante.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo parecieron inesperados y contradictorios con lo que se esperaba, pero concuerdan con reportes recientes de la literatura (Kumazaki et

al., 2002). En primer lugar, se encontró que la sobreexpresión de Bcl-2 disminuye la proliferación celular de una manera significativa, lo cual concuerda con los resultados observados en fibroblastos murinos y en células linfoides, en donde se determinó que Bcl-2 puede intervenir en el ciclo celular regulando la transición entre el estado quiescente y el estado cíclico de las células (Vairo et al., 1996; O'Reilly et al., 1996). *Bcl-2* fue considerado por años como un oncogene debido a que originalmente se encontró asociado al linfoma folicular humano de las células B (Tsujimoto et al., 1984), y es común encontrar altas concentraciones de Bcl-2 en varias neoplasias (Mandal y Kumar, 1997). Sin embargo, precisamente estas altas concentraciones de Bcl-2, se han asociado tanto con una disminución en la tasa de proliferación celular, como con una prognosis favorable en varios carcinomas humanos (Biden et al., 1999). Por otro lado, se ha establecido una correlación entre la disminución en el contenido de Bcl-2 y la progresión de los tumores (Geisler et al., 1998). Experimentalmente, se ha encontrado una actividad supresora de tumores adjudicada a su acción anti-mitótica en la carcinogénesis hepática y mamaria en ratones transgénicos (Vail et al., 2002; Murphy et al., 1999).

Al parecer la disminución en la tasa de proliferación celular no es el único efecto de Bcl-2 sobre el ciclo celular; se ha demostrado que niveles altos de Bcl-2 pueden incluso promover la senescencia prematura en fibroblastos normales o en carcinomas (Tombor et al., 2003; Crescenzi et al., 2003). Este mismo efecto se observó en los cultivos de las células derivadas de animales jóvenes que sobreexpresaron Bcl-2, puesto que el número de células senescentes fue mayor que el determinado en los cultivos de las células control y las GFP.

El mecanismo para explicar estos efectos aún no se conoce en su totalidad. Algunos grupos de investigación que trabajan desde hace muchos años con Bcl-2, como el de Jerry Adams en Melbourne y con ciclo celular con el de Andrew Koff en Nueva York, han propuesto un

modelo muy sugerente (Vairo et al., 2000). Se sabe que de manera normal, en las células en estado quiescente, con bajos niveles de Bcl-2, la estimulación mitogénica inhibe la síntesis del inhibidor de CDKs p27 e inactiva a p130 que retiene isoformas de E2F, facilitando así la entrada al ciclo celular. Sin embargo, estos investigadores sugieren que la acrecentada actividad de Bcl-2 inducida por ciertos factores ambientales, pudiera incrementar tanto los niveles de p27 como de p130. Un aumento de p27 conllevaría a la inhibición de la actividad de la Cdk-2 inhibiendo así la progresión del ciclo celular. Por su parte p130, al ser una proteína del tipo represor constitutivo de la familia Rb, y por estar hipofosforilada, se uniría al factor E2F4. El complejo p130-E2F4 reprimiría la transcripción de varios genes necesarios para permitir la entrada al ciclo celular desde el estado quiescente, entre ellos E2F1. La inhibición de la cinasa Cdk-2 no sólo detendría el ciclo celular, sino que perpetuaría el arresto, ya que esta enzima es la encargada de fosforilar a p27 y p130 marcándolos para su posterior destrucción. De manera que los diferentes niveles de Bcl-2 que contenga una célula podrían ir disminuyendo la tasa de la proliferación al grado de llegar a un arresto irreversible.

Recientemente se ha publicado más evidencia experimental que apoya la participación de p27, p130, E2F4 y Cdk-2 en la forma en que lo sugieren Vairo y col. (Crescenzi, et al., 2003; Bonnefoy-Berard et al., 2004), por lo que este modelo resulta muy atractivo. Asimismo se ha sugerido que entre los agentes que pudieran activar la senescencia inducida por Bcl-2 se encuentra el oncogene *ras* (Tombor, 2003; Mazzocca et al., 2003).

Lo que sigue siendo una pregunta difícil de contestar es cuál sería el mecanismo por el que Bcl-2 podría inducir la expresión de factores reguladores del ciclo celular como p27 y p130, si dicha proteína se encuentra anclada en las membranas (especialmente en la membrana externa mitocondrial). El mismo grupo de investigadores antes mencionado,

sugiere que presumiblemente Bcl-2 actuó mediante la unión a una proteína hasta el momento desconocida, a la cual se le ha denominado X. La proteína X se uniría a Bcl-2 en el dominio N-terminal, cerca de la tirosina 28, y esta proteína sería la que induciría el incremento de p27 y p130. No obstante, no existen reportes posteriores que apoyen experimentalmente la existencia de la proteína X, por lo que la pregunta sigue sin resolverse (figura 9).

Existen numerosos reportes relacionados con el efecto de Bcl-2 como protector contra el estrés oxidativo, sin embargo, no se han relacionado con su efecto regulador del ciclo celular. El grupo de Halliwell, entre otros, ha reportado que la sobreexpresión de Bcl-2 aumenta las defensas antioxidantes, incrementando las concentraciones de GSH y de Cu/Zn-SOD, pero no de Mn-SOD, GPx y GSSG reductasa. Un aumento en la concentración de CAT sólo se ha encontrado en algunas líneas celulares y en otras no (Lee et al 2001). Aún y cuando este mismo grupo no encontró disminución en el daño oxidativo sobre el ADN (medido como 8-OHdG) ni en la lipoperoxidación, si reportó que las células transfectadas con *bcl-2* presentaron mayor resistencia al tratamiento con H₂O₂.

Existen otros grupos que proponen que el efecto protector de Bcl-2 está dado por un mecanismo pro-oxidante (Steinman, 1995). Es decir, la sobreexpresión de Bcl-2 pudiera provocar que aumenten los mecanismos antioxidantes, de tal manera que cuando se somete a las células a un tratamiento generador de estrés oxidativo, las defensas antioxidantes ya se encuentren listas y puedan contrarrestar el efecto de los radicales libres, algo así como una vacuna.

Es difícil pensar que la sola presencia de Bcl-2 genere ROS de algún tipo, por lo que posiblemente actúe inhibiendo y estimulando la expresión de las enzimas y dispositivos antioxidantes. No obstante, no hay reportes que propongan algún mecanismo para explicar

como es que Bcl-2 puede regular la expresión de dichas enzimas antioxidantes, ya que, como se mencionó antes, se piensa que Bcl-2 no se transloca al núcleo. Esto nos lleva al mismo punto ciego referente a las vías de señalización.

Es posible especular que el mismo efecto de retrasar la progresión del ciclo celular pudiera beneficiar a las células a enfrentarse a retos como el del estrés oxidativo. Si la célula no está comprometida a dividirse, puede usar su maquinaria metabólica para detener los radicales libres y reparar el daño. Tal vez la misma maquinaria enzimática que revisa que la célula se encuentre en buen estado antes de duplicarse y dividirse, pudiera incrementar los niveles de antioxidantes y sistemas reparadores que protegen frente al estrés oxidativo. Un efecto parecido al que ocurre cuando se agrega un agente tóxico a los cultivos con un alto grado de confluencia, en los cuales no se puede observar el efecto del tóxico (Ventura, comunicación personal).

Queda aún por discutir los resultados obtenidos mediante la infección retroviral a las células derivadas de los animales viejos. Es evidente que no se puede correlacionar un efecto directo de la sobreexpresión de Bcl-2 con la tasa de proliferación o el número de células senescentes, ya que las células que únicamente fueron infectadas con *gfp*, presentaron diferencias estadísticas con las que no se infectaron, indicando que el tratamiento por sí mismo afectó a las células. Aún así, estos resultados inesperados fueron muy interesantes. El hecho de que no se encontraran diferencias estadísticas entre los datos obtenidos entre las células infectadas con *gfp* o con *bcl-2*, indica que el efecto de la infección retroviral sobre los cultivos primarios de células de animales viejos es algo reproducible y que se puede analizar, como se hará a continuación.

Poniendo especial atención en el aumento del número de células positivas a la tinción SA- β -gal conforme pasa el tiempo de vida del este cultivo (figura 23), se observa que una

diferencia muy grande en el número de células senescentes en los cultivos infectados con respecto al control (132%) los primeros días después de la infección. Sin embargo, conforme el cultivo se acerca al límite de Hayflick e inicia la etapa de senescencia, esta diferencia va desapareciendo, y en el día 21 ya no se encuentra una diferencia estadística con el control. Esto sugiere que la infección viral o los mecanismos de respuesta celulares asociados a ella pudieran haber causado el estrés necesario para inducir una senescencia prematura en las células provenientes de ratones viejos, no así en las de ratones jóvenes en las que la infección no tuvo ningún perjudicial sobre la tasa de proliferación o el número de células senescentes. Lo anterior apoya la sugerencia previa de que el daño acumulado en los organismos viejos los hace ser más susceptibles a los agentes inductores de estrés y, en este caso, la infección viral podría desencadenar respuestas más drásticas que lo que se esperaría en un individuo joven.

En resumen, los datos aquí presentados demuestran que el fenotipo senescente adquirido por las células provenientes de los ratones jóvenes al envejecer en cultivo es indistinguible del que presentan las células provenientes de los ratones viejos, excepto por el contenido de Bcl-2. Esto sugiere que deben existir factores a los cuales los organismos se ven expuestos a lo largo de la vida (como el estrés oxidativo), que pudieran estar relacionados con el proceso del envejecimiento natural, y que no están presentes en el envejecimiento *in vitro*. Estos factores, posiblemente debidos al medio ambiente o al metabolismo particular de los organismos, pudieran dañar de tal modo las biomoléculas, tal y como sugiere Harman, acumulándose, entre otras cosas, en forma de daño al ADN, y que esto se reflejara como una mayor susceptibilidad de los organismos viejos frente a los agentes tóxicos y radicales libres. Por otro lado, los altos niveles de Bcl-2 en las células de

los animales viejos, podría inducir un arresto irreversible (senescencia), de manera que la acumulación de células senescentes si podría relacionarse con el deterioro asociado al envejecimiento como se ha propuesto (Campisi, 1997).

CONCLUSIONES

1. Se determinó que el fenotipo senescente que adquieren las células obtenidas de los animales jóvenes al envejecer *in vitro*, es prácticamente indistinguible (en función de los parámetros analizados) del que ostentan las células provenientes de los animales viejos que han envejecido *in vivo*, a lo largo del tiempo. El hecho de que Bcl-2 no se encontrara incrementado en las células de los animales jóvenes que envejecieron en cultivo, postula la posibilidad de un fenotipo incompleto o diferente, carente de los marcadores que se adquieren de manera gradual en el envejecimiento *in vivo*; y sugiere que se puede llegar a la senescencia aparentemente por vías bioquímicas y moleculares distintas.
2. Los resultados confirman la correlación entre la sobreexpresión endógena de la proteína Bcl-2 y el aumento de la edad en algunos tejidos de los ratones, en este caso en el pulmón. No obstante, aún queda por resolver si el aumento de esta proteína se manifiesta como una respuesta al estrés oxidativo al que se ven sometidos los organismos a lo largo de su vida. O bien, si es el efecto de alguna alteración a nivel epigenético que involuntariamente bloquea la apoptosis favoreciendo la senescencia, o algún otro mecanismo como una posible búsqueda de la supervivencia celular.
3. La mayor susceptibilidad que se observa en el ADN de los animales viejos frente al estrés oxidativo, en comparación con el de los animales jóvenes, no está dada únicamente por una respuesta inapropiada de las células frente a un reto oxidativo inmediato, sino que podría explicarse por la presencia del daño acumulado en el ADN, (oxidativo y epigenético), a lo largo de la vida, como propone la teoría de Harman .

4. En las células provenientes de los ratones jóvenes se encontró que la sobreexpresión exógena de la proteína Bcl-2 retrasa la tasa de proliferación celular. Una posible explicación podría relacionarse con el hecho de que la alta concentración de Bcl-2 fomentaran el arresto transitorio de algunas células en la fase G1 del ciclo celular, mientras que en otras, ese arresto fuera permanente induciendo la senescencia celular.
5. El aumento de Bcl-2 mostró un efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por el H₂O₂ lo que permitió que las células continuaran proliferando. Esto corroboró una de las funciones conocidas y reportadas de la sobreexpresión de la proteína Bcl-2.
6. La infección retroviral o el mecanismo de respuesta celular ante esta agresión, indujo la senescencia de manera prematura en las células provenientes de los animales viejos, apoyando la idea previa de que la susceptibilidad que presentan los organismos viejos frente a los agentes estresantes pudiera estar asociado a la acumulación del daño a lo largo del tiempo.
7. El modelo animal de ratonas hembras de 12 meses de edad pero que han tenido múltiples embarazos, es un modelo interesante y relevante, que debiera, por tanto ser explorado más ampliamente puesto que dichas hembras presentan características fenotípicas y bioquímicas relacionadas al envejecimiento aún y cuando cronológicamente no han llegado a esa etapa.
8. El modelo en cultivo de estos mismos animales es muy complicado y presenta varios inconvenientes, por lo que para estudiar la senescencia *in vitro*, se propone usar el modelo de senescencia inducida por estrés o SIPS.

PERSPECTIVAS

1. Estudiar más a fondo el modelo de hembras con múltiples embarazos y compararlo con las hembras vírgenes de la misma edad, para tratar de determinar si existe alguna correlación entre el desgaste metabólico asociado a la procreación y la aceleración del proceso del envejecimiento.
2. Inducir la senescencia de manera prematura por estrés en los cultivos de fibroblastos de ratón joven usando para ello H₂O₂ (Stress-Induced Premature Senescence = SIPS). Esto con el fin de reducir el tiempo en el cual la mayor parte de la fracción poblacional se encuentra en fase senescente. Además de que, al someter a las células a una concentración subletal de estrés oxidativo, es probable que el mecanismo por el cual se induzca el fenómeno de senescencia sea lo más parecido posible (para un modelo *in vitro*) del que ocurre durante el envejecimiento normal adquirido a lo largo del tiempo. Este modelo ya se ha descrito para fibroblastos primarios humanos de origen embrionario como las líneas WI-38, IMR-90, HCA-2 etc (que son líneas celulares que senescen) (En nuestro caso podría ser muy interesante ya que tiene la ventaja de que se emplean ratones jóvenes, pero al someterlos a estrés oxidativo es probable que el mecanismo por el cual se induzca el fenómeno de senescencia sea más parecido al que ocurre durante el envejecimiento normal adquirido a lo largo del tiempo para usarlo como modelo de estudio *in vitro*).
3. Determinar los niveles de Bcl-2 en diferentes tejidos a lo largo de la vida de los ratones. Por ejemplo: hígado, riñones, cerebro, etc.
4. Estudiar si la expresión de Bcl-2 se induce como respuesta al estrés oxidativo, y tratar de diferenciar si esta es una respuesta regulada por el estrés o debido al daño en el ADN (via p53).

5. Estudiar la relación entre la proteína Bcl-2 y otras moléculas asociadas al ciclo celular y al envejecimiento, por ejemplo la enzima telomerasa.
6. Estudiar la participación de las modificaciones epigenéticas con el arresto de la proliferación y la inducción de la senescencia.
7. Estudiar la relación entre los niveles de algunas enzimas antioxidantes y la cadena respiratoria mitocondrial.
8. Estudiar participación de la senescencia como respuesta celular al estrés en otros modelos, por ejemplo fibrosis hepática.

REFERENCIAS

- Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival. *Science*. 281:1322-1326.
- Ahmad FF, Cowan DL, Sun AY. 1987. Detection of free radical formation in various tissues after acute carbon tetrachloride administration in gerbil. *Life Sci* 41: 2469-2475.
- Aikawa K, Leggett RE, Levin RM. 2003. Effect of age on hydrogen peroxide mediated contraction damage in the male rat bladder. *J Urol* 170: 2082-2085.
- Altamirano A. 1994. *Manual de Manejo de Animales de Laboratorio*. Ed. Facultad de Estudios Superiores Veterinarios Zaragoza UNAM. México. 97pp.
- Ames BM, Shigenaga MK, Hagen TM. 1990. Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
- Aritomi M, Kunishima N, Inohara N, Ishibashi Y, Ohta S, Morikawa K. 1997. Crystal structure of rat Bcl-xL. Implications for the function of the Bcl-2 protein family. *J Biol Chem* 272: 27886-27892.
- Baliga BC, Kumar S. 2002 Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol Oncol* 20: 663-74.
- Bandyopadhyay D, Medrano EE. 2003. The emerging role of epigenetics in cellular and organismal aging. *Exp Gerontol* 38: 1299-1307.
- Barja G, Cárdenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López-Torrez M. 1994. Low mitochondrial free radical production per unit O₂ consumption can explain the simultaneous presence of high longevity and high aerobic rate in birds. *Free Rad Res* 21: 317-328.

- Barnett YA, King CM. 1995. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutations as a function of age in humans. *Mutat Res* 338:115-128.
- Bass DA, Parce JW, Dechatelet, LR, Szejdr P, Seed M.C, Thomas M.. 1983. Flow Cytometry studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130: 1910-1917.
- Basanez G, Zhang J, Chau BN, Maksaev GI, Frolov VA, Brandt TA, Burch J, Hardwick JM, Zimmerberg J. 2001. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xL form cytochrome c-conducting pores in pure lipid membranes. *J Biol Chem* 276: 31083-31091.
- Beal MF. 2002. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Rad Biol Med* 32: 797-803.
- Beddowes EJ, Faux SP, Chipmann JK. 2003. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology* 187:101-15.
- Bermúdez-Fajardo, A. 2001. Xantina Oxidasa. En: *Estrés Oxidativo en Biomedicina*. CIBIOMED. La Habana Cuba. (CD interactivo).
- Betancourt M, Ortiz R, González C, Pérez P, Cortés L, Rodríguez L, Villaseñor L. 1995. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat Res* 331: 65-77.
- Biden KG, Simms LA, Cummings M, Buttenshaw R, Schoch E, Searle J, Gobe G, Jass JR, Meltzer SJ, Leggett BA, Young J. Expression of Bcl-2 protein is decreased in colorectal adenocarcinomas with microsatellite instability. *Oncogene* 18: 1245-1249.
- Blackburn EH, Gall JG. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120:33-53.

- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chio C-P, Morin GB, Harley CB, Shay J W, Lichtsteiner S, Wrigth WE. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
- Bohr V, Anson RM, Mazur S, Dianov G. 1998. Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol Lett* 102-103: 47-52.
- Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marçais A, Marvel J. 2004. Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* 1644: 159-168.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bree RT, Stenson-Cox C, Grealy M, Byrnes L, Gorman AM, Samali A, 2002. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology* 3: 195-206.
- Bruce SA, Deamond SF, Ts'o PO. 1986. *In vitro* senescence of Syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between *in vivo* donor age and *in vitro* proliferative capacity. *Mech Ageing Dev* 34: 151-73.
- Cadet J, D'Ham C, Douki T, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S. 1998. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Rad Res* 29: 541-550.
- Cadet J, Douki T, frelon S, Sauvaigo S. Pouget JP, Ravanat JL. 2002. Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC- MS/MS measurement. *Free Rad Biol Mol* 33: 441-449.

- Campisi J, Dimri GP, Nehlin JO, Testori A, Yoshimoto K. 1996. Coming of age in culture. *Exp. Gerontol* 31: 7-12.
- Campisi J, 1997. Aging and Cancer: The Double-Edged Sword of Replicative Senescence. *J Am Geriatr Soc* 45: 482-488.
- Campisi J. 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo* 14:183-188.
- Cancino L. 2001. Citocromos P450. En: *Estrés Oxidativo en Biomedicina. CIBIOMED. La Habana Cuba. (CD interactivo).*
- Cárdenas-Aguayo MC, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L. 2003. 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* 12: 735-748.
- Cathcart R, Schwierts E, Ames BN. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* 134:111-116.
- Chen KY, Chang ZF. 1987. A marked increase of fucosylation of glycoproteins in IMR-90 human diploid fibroblasts during senescence in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 767-74.
- Chen QM, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. 1995. Oxidative damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4337-4341.
- Chen QM, Liu J, Merrett JB. 2000. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem J* 347: 543-551.

- Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MHK. 2001. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 265: 294-303.
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. *J Biol Chem* 267: 166-172
- Collins AR, Dobson VL, Dusinka M, Kennedy G, Stetina R. 1997. The Comet assay: what can it really tell us?. *Mutat Res* 375: 183-193.
- Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. 2003. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J* 375 :263-274.
- Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD. 1997. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 272: 23469-23472.
- Cypser JR, Johnson TE. 1999. The spe-10 mutant has longer life and increased stress resistance. *Neurobiol Aging* 20: 503-512.
- Degli-Esposti M, Hatzinisiriou I, McLennan H, Ralph S. 1999. Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. *J Biol Chem* 274: 29831-29837.
- Deng G, Su J, Ivins K, Van Houten B, Cotman C. 1999. Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp Neurol* 159: 309-318.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubeli I, Pereira-Smith O, Peacocke M. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in ageing skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9362-9367.

- Dimri GP, Itahana K, Acosta M, Campisi J. 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor p^{14ARF} tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 20: 273-285.
- Dobashi Y, Goto A, Fukayama M, Abe A, Ooi A. 2004. Overexpression of cdk4/cyclin D1, a possible mediator of apoptosis and an indicator of prognosis in human primary lung carcinoma. *Int J Cancer* 110: 532-541.
- Doyle A, Griffiths JS, Newwell DG. 1998. *Cell & Tissue culture: Laboratory & Procedures*. Ed. John Wiley & sons, New York, 4B: 7.
- Droge W. 2002. The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev* 1: 257-278.
- Ducray C, Pommier JP, Mertins L, Boissin FD, Sabatier L. 1999. Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* 18: 4211-4223.
- Dulic V, Beney GE, Frebourg G, Drullinger LF, Stein GH. 2000. Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol* 20: 6741-6754.
- Effros RB. 2003. Genetic alterations in the ageing immune system: impact on infection and cancer. *Mech Age Dev* 124: 71-77.
- Elder AC, Gelein R, Finkelstein JN, Cox C, Oberdorster G. 2000. Pulmonary inflammatory response to inhaled particles is modified by age, ozone exposure, and bacterial toxin. *Inhal Toxicol* 12: 227-246.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58: 39-46.

- Fairban D, Olive P, O'Neill K. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.
- Faragher RGA, Kipling D. 1998. How might replicative senescence contribute to human ageing?. *BioEssays* 20: 985-991.
- Fernández.Checa J, Kaplowitz N, García-Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A. 1997. GSH Transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am Physiol Soc* G7-G17.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-245.
- Freshney IR. 1984. *Culture of Animal Cell. A manual of basic technique*. Ed. Alan R. Liss Inc. New York, USA.
- García-Triana, B. 2001. NADPH oxidasa fagocítica: Características, ensamblaje y mecanismo de acción. En: *Estrés Oxidativo en Biomedicina*. CIBIOMED. La Habana Cuba. (CD interactivo).
- Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. 1998. Lack of bcl-2 persistence: an independent prognostic indicator of poor prognosis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 71: 305-307.
- Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. 2002. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 277: 38540-38549.
- Grune T, Davies JA. 2001. Oxidative processes in aging. En: *Handbook of the Biology of Aging*. 5^a ed. Academic Press. EUA. p 25- 42.

- Guarante L. 2000. Sir2 links chromatin silencing, metabolism and aging. *Gen Dev* 14: 1021- 1026.
- Guillouzo A. 1998. Liver Cell Models in *in vitro* toxicology. *Environ Health Perspec* 106: 511-525.
- Halliwell B, Gutteridge MC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14
- Halliwell B, Gutteridge MC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd. edition. New York: Oxford University Press Inc. 936pp.
- Ham-Chande R. 1999. Conceptos y Significados del Envejecimiento en las políticas de Población. En: *El envejecimiento demográfico de México: Retos y Perspectivas*; Consejo Nacional de Población. México, D.F. p: 43-53.
- Hamilton ML, Van Remmen H, Drake JA, Yang H, Guo ZM, Kewitt K, Walter CA, Richardson A. 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10469-10474.
- Hara E, Uzman JA, Dimri GP, Nehlin JO, Testori A, Campisi J. 1996. The helix-loop-helix protein Id-1 and a retinoblastoma protein binding mutant of SV40 T antigen synergize to reactivate DNA synthesis in senescent human fibroblasts. *Dev Genet.* 18: 161-172.
- Harman D, 1956. Ageing: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
- Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman N, Capdevila J, Holla V, Helvig C, Falck RJ, Farrell G, Kaminsky LJ, Spivack SD, Boitier E, Beaune P. 1999. Human cytochromes P450. *Mol Apect Med* 20: 1-137.

- Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid stains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- Hayflick L. 1985. Theories of biological aging. *Exp Gerontol* 20: 145-159.
- Hekimi S. 2000. Crossroads of Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Results Probl Cell Differ* 29: 81-112.
- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. 1998. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 288-293.
- Hendrich B, Tweedie S. 2003. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Gen* 19: 269-274.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
- Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. 2004. p53: 25 years after its discovery. *Trend Pharmacol Sci* 25: 177-181.
- Hwang ES. 2002. Replicative senescence and senescence-like state induced in cancer-derived cells. *Mech Ageing Dev.* 123: 1681-1694.
- Ikura T, Ogryzko VV. 2003. Chromatin dynamics and DNA repair. *Front Biosc* 8: 149-155.
- Imai S, Johnson FB, Marciniak RA, McVey M, Park PU, Guarente L. 2000. Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:297-302.
- Issa JP. 2002. Epigenetic Variation and Human Disease. *J Nutr* 132: 2388S-2392S.

- Izzotti A, Cartiglia C, Taningher M, De Flora S, Balansky R. 1999. Age-related increases of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA-protein crosslinks in mouse organs. *Mut Res* 13:215-223.
- Jacobson MD, Raff MC. 1995. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature* 374: 814-816.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science*. 293: 1074- 1080.
- Kaeberlein M, McVey M, Guarante L. 1999. The *SIR2/3/4* complex and *SIR2* alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Gen Dev* 13: 2570-2580.
- Kaufmann J, Bickford P, Tagliatela G. 2001. Oxidative-stress-dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. *J Neurochem* 76: 1099-1108.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide –ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Kim HG, Hong SM, Kim SJ, Park HJ, Jung HI, Lee YY, Moon JS, Lim HW, Park EH, Lim CJ. 2003. Age-related changes in the activity of antioxidant and redox enzymes in rats. *Mol Cells* 16: 278-284.
- Kimura A, Umehara T, Horikoshi M. 2002. Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against silencing. *Nat Genet* 32: 370-377.
- King V, Tower J. 1999. Aging-specific expression of *Drosophila hsp 22*. *Develop Biol* 207: 107-118.

- Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A potential link between cancer and ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12072-12077.
- Kodama S, Mori I, Roy K, Yang Z, Suzuki K, Watanabe M. 2001. Culture condition-dependent senescence-like growth arrest and immortalization in rodent embryo cells. *Radiat Res.* 155: 254-262.
- Kopjar N, Garaj-Vrhovac V. 2001. Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs. *Mutagenesis* 16: 71-78.
- Kumazaki T, Sasaki M, Nishiyama M, Teranishi Y, Sumida H, Mitsui Y. 2002. Effect of Bcl-2 down-regulation on cellular life span. *Biogerontology* 3: 291-300.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee MH, Hyun DH, Marshall KA, Ellerby L, Bredesen DE, Jenner P, Halliwell B. 2001a. Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses and the proteasome. *Free Rad Biol Med* 31: 1550-1559.
- Lee MH, Hyun DH, Halliwell B, Jenner P. 2001b. Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potential injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J Neurochem* 78: 209-220.

- Lee HC, Yin PH, Chi CW, Wei YH. 2002. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative senescence. *J Biomed Sci* 9: 517-526.
- Lezhava T. 2001. Chromosome and aging: genetic conception of aging. *Biogerontology* 2: 253-260.
- Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopasai G. 1994. Bcl-2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8910-8914.
- Liu JP. 1999. Studies of the molecular mechanism in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 13:2091-2104.
- Liu K, Luo Y, Lin FT, Lin WC. 2004. TopBP1 recruits Brg1/Brm to repress E2F1-induced apoptosis, a novel pRb-independent and E2F1-specific control for cell survival. *Genes Dev.* 18: 673-686.
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Cárdenas S, Rojas C, Barja G. 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp Biochem Physiol B* 105: 757-763.
- Lueken A, Juhl-Strauss U, Krieger G, Witte I. 2004. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicol Lett* 147: 35-43.
- Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. 2000. Genes involved in senescence and immortalization. *Cell Multiplication* 12: 705-709.
- Maciera-Coelho A. 1980. Implications of the reorganization of the cell genome for aging or immortalization of dividing cells *in vitro*. *Gerontology* 26: 276-282.

- Mandal M, Kumar R. 1997. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J Biol Chem* 272: 14183-14187.
- Margulis M. 1971. Symbiosis and Evolution. *Sci Am.* 225: 48-57.
- Martin GM, 1997. Genetics and the pathobiology of ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 1773-1780.
- Martin GM, Austad SN, Johnson TE. 1996. Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Genetics* 113:25-34.
- Martínez GR, Loureiro AP, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LF, Onuki J, Almeida EA, Garcia CC, Barbosa LF, Medeiros MH, Di Mascio P. 2003. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat Res* 544: 115-127.
- Matos HR, Capelozzi VL, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MHG. 2001. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitiolacetate. *Arch Biochem Biophys* 396: 171-177.
- Mazzocca A, Giusti S, Hamilton AD, Sebti SM, Pantaleo P, Carloni V. 2003. Growth inhibition by the farnesyltransferase inhibitor FTI-277 involves Bcl-2 expression and defective association with Raf-1 in liver cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 63: 159-166.
- McCord JM. 1993. Oxygen-derived free radicals. *New Horizons* 1: 70-76.
- McClintock B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes of *Zea mays*. *Genetics* 26:234-282.
- Melov S, Coscun P, Patel M, Tuistra L, Cottrell B, Jun A, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman S, Huang TT, Miziorko H, Epstein C, Wallace D. 1999. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 846-851.

- Melov S, Doctrow SR, Schneider JA, Haberson J, Patel M, Coskun PE, Huffman K, Wallace DC, Malfroy B. 2001. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J Neurosci* 21: 8348-8353.
- Meredith MJ, Cusick CL, Soltaninassab S, Sekhar KS, Lu S, Freeman ML. Expression of Bcl-2 increases intracellular glutathione by inhibiting methionine –dependent GSH efflux. 1998. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 458-463.
- Mignotte B, Vayssiere JL. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Eur J Biochem* 252: 1-15.
- Mockett RJ, Orr WC, Rahmandar JJ, Sohal BH, Sohal RS. 2001. Antioxidant status and stress resistance in long- and short-lived lines of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 36: 441-463.
- Monti D, Salvioli S, Capri M, Malorni W, Straface E, Cossarizza A, Botti B, Piacentini M, Baggio G, Barbi C, Valensin S, Bonafe M, Franceschi C. 2000. Decreased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from healthy elderly and centenarians. *Mech Ageing Dev* 121: 239-250.
- Mosini L, Breuille D, Buffiere C, Obled C, Patureau P. 2004. Age-related changes in glutathione availability and skeletal muscle carbonyl content in healthy rats. *Exp Gerontol* 39: 203-210.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65: 55-63.
- Muchmore, SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SC, Fesik SW. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-x_L an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381: 335-341.

- Muller HJ. 1938. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* 13:181-195.
- Murphy KL, Kittrell FS, Gay JP, Jager R, Medina D, Rosen JM . 1999. Bcl-2 expression delays mammary tumor development in dimethylbenz(a)anthracene-treated transgenic mice. *Oncogene* 18: 6597-6604.
- Mutlu-Turkoglu U, Ilhan E, Oztezcan S, Kuru A, Auykac-Toker G, Uysal M. 2003. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clin Biochem* 36: 397-400.
- O'Connor L, Strasser A. 1999. The Bcl-2 Protein Family. En: *Apoptosis: Biology and Mechanisms*. Kumar, S. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania. Cáp 23: 172-207.
- Orr WC, Sohal RS. 2003. Does overexpression of Cu,Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? *Exp Gerontol* 38:227-230.
- Otter I, Conus S, Ravn U, Rager M, Olivier L, Monney L, Fabbro D, Borner C. 1998. The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli. *J Biol Chem* 273: 6110-6120.
- Pahlavany MA, Vargas DA. 2001. Aging but not dietary restriction alters the activation-induced apoptosis in rat T cells. *FEBS Lett* 491: 114-118.
- Pantoja C, Serrano M. 1999. Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18: 4974-4982.
- Park YM, Han MY, Blackburn RV, Lee YJ. 1998. Overexpression of HSP25 reduces the level of TNF-alpha oxidative DNA damage biomarker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in L929 cells. *J Cell Physiol* 174: 27-34.

- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741-747.
- Pérez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. J 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *Comp Physiol [B]*168: 149-158.
- Phaneuf S, Leeuwenburgh C. 2002. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. *Am.J Physiol Regul Comp Physiol* 282: R423-430.
- Pouget JP, Douki T, Richard MJ, Cadet J. 2000. DNA damage induced in cells by γ and UVA Radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and comet assay. *Chem Res Toxicol* 13: 541-549.
- Prescott JC, Blackburn EH. 1999. Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Curr Op Genet Develop* 9:368-373.
- Ramsay RE, Rowan AJ, Pryor FM. 2004. Special considerations in treating the elderly patient with epilepsy. *Neurology* 62: S24-S29.
- Reeds JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. 1998. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1366: 127-137.
- Richter C, Park JW, Ames BN. 1998. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 6465-6467.
- Rikans LE, Hornbrook KR. 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging *Biochim Biophys Acta* 1362: 116-127

- Roberfroid M, Buc-Caldern P. 1994. Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. Marcel Dekker Inc. New York, USA. 265 pp.
- Rodríguez-Ajenjo C. 1999. El papel de las instituciones públicas en la atención de la tercera edad. En: El México: Retos y Perspectivas; Consejo Nacional de Población. México, D.F. Pág: 55-68.
- Rohme D. 1981. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and lifespan of normal fibroblasts *in vitro* and erythrocytes *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 78: 5009-5013.
- Russel ES. 1964. Lifespan and aging patterns, in: Biology of the laboratory mouse. NY. Ed. Green EL, Dover Publications, Inc. pág 685.
- Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Vol 1.3a ed. Cold Spring Harbor Laboratory: Press Cold Spring Harbor. New York, USA: pág: 1.1-1.31 y 1.74-1.84.
- Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M, Mitsui Y. 2001. Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. Mech Age Dev 122: 1695-1706.
- Satoh T, Yamagata T, Ishikawa Y, Yamada M, Uchiyama Y, Hatanaka H. 1999. Regulation of reactive oxygen species by nerve growth factor but not Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death. J Biochem 125: 952-959.
- Satyanarayana A, Wiemann SU, Buer J, Lauber J, Dittmar KE, Wustefeld T, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL. 2003. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. EMBO J 22: 4003-4013.

- Sattler M, Liang H, Nettlesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. 1997. Structure of Bcl-x_L – Bak peptide complex recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275: 983-986.
- Schindowski K, Leutner S, Muller WE, Eckert A. 2000. Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging*. 21: 661-670.
- Schmitt CA, Fridman MY, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW. 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109: 335-346.
- Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6:168-170.
- Sedivy JM. 1998. Can ends justify the means?:Telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9078-9081.
- Seshadri T, Campisi J. 1990. Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 247: 205-209.
- Shimizu S, Nartia M, Tsujimoto Y.1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487.
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang Ch, Gearing M, Salvo R, Watts RL, Juncos JL, Hansen LA, Brain LB, Fayad M, Reckord CL, Wallace DC.1993. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 17: 171-184.

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19: 2109-2117.
- Steinman HM. 1995. The Bcl-2 Oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J Biol Chem* 270: 3487-3490.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mut* 35: 206-221.
- Tice RR. 1994. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of ADN damage and repair in individual cells. *Mutat Res* 271: 243-252.
- Tombor B, Rundell K, Oltvai ZN. 2003. Bcl-2 promotes premature senescence induced by oncogenic Ras. *Biochem Biophys Res Commun.*303: 800-807.
- Tominaga K, Olgun A, Smith JR, Pereira-Smith OM. 2002.Genetics of cellular senescence. *Mech Age Dev* 123: 927-36.
- Toussaint O, Medrano EE, Von Zeglinicki T, 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35: 927-945.
- Tritschler HJ, Medori R. 1993. Mitochondrial DNA alterations as a source of human disorders. *Neurology* 43: 280-288.

- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097-1099.
- Tsujimoto Y, Ikegaki N, Croce CM. 1987. Characterization of the protein product of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene* 2:3-7.
- Tuirán R. 1999. Desafíos del Envejecimiento Demográfico en México. En: México: Retos y Perspectivas; Consejo Nacional de Población. México, D.F. Pág: 15-23
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237: 408-414.
- Turnheim K. 2003. When drug therapy gets old: pharmacokinetics and pharmacodynamics in the elderly. *Exp Gerontol* 38: 843-853.
- Vairo G, Innes KM, Adams JM, 1996. Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. *Oncogene* 13: 1511-1519.
- Vairo G, Soos T, Upton TM, Zalvide J, Decaprio JA, Ewen ME, Koff A, Adams JM, 2000. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27^{Kip1}, pRb relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol* 20: 4745-4753.
- Vail ME, Chaisson ML, Thompson J, Fausto N. 2002. Bcl-2 expression delays hepatocyte cell cycle progression during liver regeneration. *Oncogene* 21: 1548-1555.
- Vaziri H, Dessain SK, Ng EE, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarante L, Weinberg RA. 2001. hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 desacetilasa. *Cell* 107: 149-159.

- Von Zglinicki T, 2000. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann NY Acad Sci USA* 908: 99-110.
- Wang E. 1995. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress Bcl-2 is involved. *Cancer Res* 55: 2284-2292.
- Wang L, Hirayasu K, Ishisawa M, Kobayash Y. 1994. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res* 22: 1774-1775.
- Wei YH. 1998. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 53-63.
- Weyand CM, Fulbrigh AW, Goronzy JJ. 2003. Immunosenescence, autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Exp Gerontol* 38:833-841.
- Wilson VL, Jones PA. 1983. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 220: 1055-1057.
- Wiseman H, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313: 17-29.
- Wolf FI, Torsello A, Covacci V, Fasanella S, Montanari M, Boninsegna A, Cittadini A. 2002. Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. *Exp Gerontol* 37: 647-656.
- Wright RM, Warpula RW. 2004. Geriatric pharmacology: safer prescribing for the elderly patient. *J Am Podiatr Med Assoc* 94: 90-97.
- Wright WE, Shay JW. 2002. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol* 20: 682-688.

- Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T. 1995. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Comm* 209: 723-729.
- Young JI, Smith JR. 1961. DNA methyltransferase inhibition in normal human fibroblasts induces p21-dependent cell cycle withdrawal. *J Biol Chem* 276: 19610-19616.
- Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. 2003. Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* 38: 47-52.
- Zhang, Y. Marcillat O, Giulivi C. Ernster L, Davies KJ. 1990. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* 265: 16330-16336
- Zhang Y, Herman B. 2002. Ageing and apoptosis. *Mech Age Dev* 123. 245-260.
- Zhang HJ, Xu L, Drake VJ, Xie L, Oberley LW, Kregel KC. 2003. Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation. *FASEB J* 17: 2293-2295.
- Zurcher C, Van Zwieten MJ, Solleveld HA, Hollander CF. 1982. The mouse in biomedical research: Experimental biology and oncology. Vol IV. Ed. Foster HL, Small JD, Fox JG. NY. Academic Press, Inc. 450pp.