

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“LA PROTEÍNA Bcl-2 INDUCTORA DE SENESCENCIA CELULAR, COMO
MECANISMO DE PROTECCIÓN CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN
CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN”

M. en B. E. Norma Edith López Díaz-Guerrero

Co-Directores: Dra. Mina Königsberg Fainstein
Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Asesores: Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz
Dra. Leticia Bucio Ortíz
Dr. Humberto González Márquez

2005

ÍNDICE

ABSTRACT	5
RESUMEN	5
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 <u>La senescencia celular replicativa</u>	6
1.1.1 Sinopsis histórica	6
1.1.2 Fenotipo senescente	8
1.1.3 Mediadores de la senescencia replicativa	10
1.1.4 Senescencia replicativa inducida por el acortamiento de los telómeros	12
1.2 <u>Senescencia celular inducida por estrés oxidativo</u>	14
1.2.1 El estrés oxidativo y el daño a las biomoléculas	17
1.2.2 Senescencia inducida prematuramente por estrés oxidativo SIPS	19
1.3 <u>La senescencia replicativa y el envejecimiento</u>	21
1.4 <u>La proteína Bcl-2</u>	22
1.4.1 Efecto protector de la Bcl-2 ante estímulos apoptóticos	24
1.4.2 La proteína Bcl-2 como protectora frente al estrés oxidativo	25
1.4.3 La proteína Bcl-2 y el ciclo celular	27
1.4.4 La proteína Bcl-2 y la senescencia celular replicativa	29
1.4.5 La proteína Bcl-2 en el envejecimiento	31
2 HIPÓTESIS	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 <u>Objetivo General</u>	33
3.2 <u>Objetivos Particulares</u>	33
4 JUSTIFICACIÓN	34

5	METODOLOGÍA	35
5.1	<u>Ratones CD-1 como modelo experimental</u>	35
5.2	<u>Obtención de los cultivos primarios</u>	35
5.3	<u>Inducción de senescencia prematura por estrés oxidativo</u> <u>SIPS</u>	36
5.4	<u>Sobreexpresión de la proteína Bcl-2</u>	37
5.4.1	Cotransfección por el método de fosfato de calcio.....	37
5.4.2	Infección retroviral para la sobreexpresión de la proteína Bcl-2.....	39
5.5	<u>Fluorescencia de células que sobreexpresan la</u> <u>proteína Bcl-2</u>	40
5.6	<u>Inmunoanálisis de la proteína Bcl-2 por western blot</u>	40
5.7	<u>Parámetros de envejecimiento celular determinados a</u> <u>lo largo del tiempo del cultivo</u>	44
5.7.1	Viabilidad celular por exclusión celular con azul de tripano.....	45
5.7.2	Incorporación de timidina tritiada.....	45
5.7.3	Senescencia asociada a β -galactosidasa.....	46
5.8	<u>Daño al ADN por estrés oxidativo que induce SIPS</u>	47
5.8.1	Electroforesis unicelular alcalina, ensayo cometa.....	48
5.9	<u>Detección de especies reactivas de oxígeno ERO por</u> <u>Citometría de flujo</u>	50
5.10	<u>Tratamiento estadístico de los datos</u>	51
6	RESULTADOS	52
6.1	<u>Parámetros de envejecimiento de los cultivos primarios</u> <u>in vitro</u>	52
6.1.1	Proliferación celular.....	52

6.1.2	Senescencia asociada a β -galactosidasa.....	54
6.2	<u>Exposición a diferentes concentraciones de H₂O₂ para la inducción de senescencia prematura SIPS.....</u>	54
6.2.1	Proliferación celular.....	56
6.2.2	Senescencia asociada a β -galactosidasa.....	58
6.3	<u>Sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios.....</u>	60
6.4	<u>Efecto de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios sometidos a SIPS.....</u>	62
6.4.1	Proliferación celular.....	62
6.4.2	Incorporación de timidina tritiada.....	65
6.4.3	Senescencia asociada a β -galactosidasa.....	67
6.5	<u>Efecto de la proteína Bcl-2 al ADN por estrés oxidativo.....</u>	69
6.6	<u>Efecto de la proteína Bcl-2 sobre la producción de las especies reactivas de oxígeno ERO.....</u>	71
7	DISCUSIÓN.....	73
8	CONCLUSIÓN.....	79
9	PERSPECTIVAS.....	80
10	REFERENCIAS.....	81

ABSTRACT

Replicative senescence is a cellular response to stress that has been postulated to serve as a tumor suppression mechanism and a contributor to aging. Numerous experimental studies have demonstrated that an apparently identical senescent state can also be prematurely induced *in vitro* in different cell types following sublethal oxidative stress stimuli. The former suggests a molecular link between cell cycle regulation and cell survival that could involve regulatory proteins such as Bcl-2. There is strong evidence that, in addition to its well-known effects on apoptosis, Bcl-2 is involved in antioxidant protection and regulation of cell cycle progression. The aim of this work was to determine if the protection against oxidative stress mediated by Bcl-2 could prevent or delay oxidative stress-induced senescence. Using a retroviral infection system, Bcl-2 was overexpressed in primary, nonembryonic mice fibroblasts obtained from lungs derived from 2-month-old CD1 mice. Fibroblasts overexpressing Bcl-2 were exposed to 75 μM H_2O_2 for 2 h to induce SIPS. The rate of proliferation and the increment of senescent cells were then determined. Our results indicate that overexpression of Bcl-2 protected primary fibroblasts against oxidative stress-mediated reduction in cell proliferation, but did not prevent premature senescence.

RESUMEN

El estrés oxidativo puede promover la senescencia celular en organismos multicelulares y esta condición puede contribuir al fenotipo de envejecimiento. En estudios recientes, se ha demostrado que la proteína antiapoptótica Bcl-2 se encuentra elevada en organismos envejecidos. Al parecer tiene un papel modulador de las especies reactivas de oxígeno, protegiendo del daño oxidativo a las células. Para conocer si la Bcl-2 podía retrasar la aparición del fenotipo senescente, se utilizó como modelo experimental el cultivo primario de fibroblastos de pulmón de ratón que sobreexpresaba la Bcl-2 (Bcl-2+). Las células fueron tratadas con H₂O₂ para inducir de manera prematura la senescencia celular SIPS. Se encontró que las células Bcl-2+ con SIPS mostraron una mejor sobrevivencia celular, tanto en su proliferación celular como en un menor daño al ADN después de un reto oxidativo. Sin embargo, la presencia de esta proteína indujo un aumento en el número de células senescentes asociadas a la actividad de β-galactosidasa. Estos resultados sugieren que la Bcl-2 tiene un papel protector contra el estrés oxidativo con activación de un programa de senescencia celular, lo que posiblemente permita a las células promover mecanismos que les permitan sobrevivir y prepararse para poder enfrentar retos oxidativos como los que ocurren en el envejecimiento.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La Senescencia Celular Replicativa

1.1.1 Sinopsis histórica

Hasta la mitad del siglo pasado se pensaba que las células en cultivo se dividían indefinidamente si se les proporcionaba el medio adecuado, esto implicaba que las células de un organismo eran capaces de vivir más tiempo que el organismo del que provenían. Esta aseveración se basó en los experimentos realizados por Carrell (1912), en los cuales disgregó células de corazón de pollo y las mantuvo en subcultivos seriados por más de 40 años. De esta manera concluyó que las células inmortales, como les llamó, eran capaces de proliferar indefinidamente y que la mortalidad del organismo era una consecuencia de la multicelularidad (Figura 1A). Sin embargo, años después, se descubrió que el medio que utilizaba para los cultivos celulares, contenía células frescas y viables que no se habían eliminado. El suero utilizado en el medio se obtenía a partir de células de corazón de pollo.

Fue hasta 1961 cuando Hayflick y Moorhead (1961) observaron que los fibroblastos humanos *in vitro* se duplicaban un número finito de veces en el transcurso del tiempo de cultivo. Ahora se sabe que el crecimiento de las células en los cultivos primarios tiene un número específico de duplicaciones poblacionales, PD, dependiendo del tipo celular y las condiciones del cultivo. El comportamiento que caracteriza a una curva de proliferación de un cultivo *in vitro*, consta de tres partes principalmente. La primera se refiere al establecimiento celular o adaptación, posteriormente existe una proliferación celular vigorosa que finalmente disminuye hasta llegar a una

fase estacionaria en donde el cultivo celular no se duplica más (Figura 1B). Este último punto en la curva de crecimiento se conoce como límite de Hayflick o de senescencia celular replicativa. En estudios posteriores, se ha confirmado que en los cultivos primarios *in vitro* hay una acumulación continua y progresiva de células senescentes (Figura 1B).

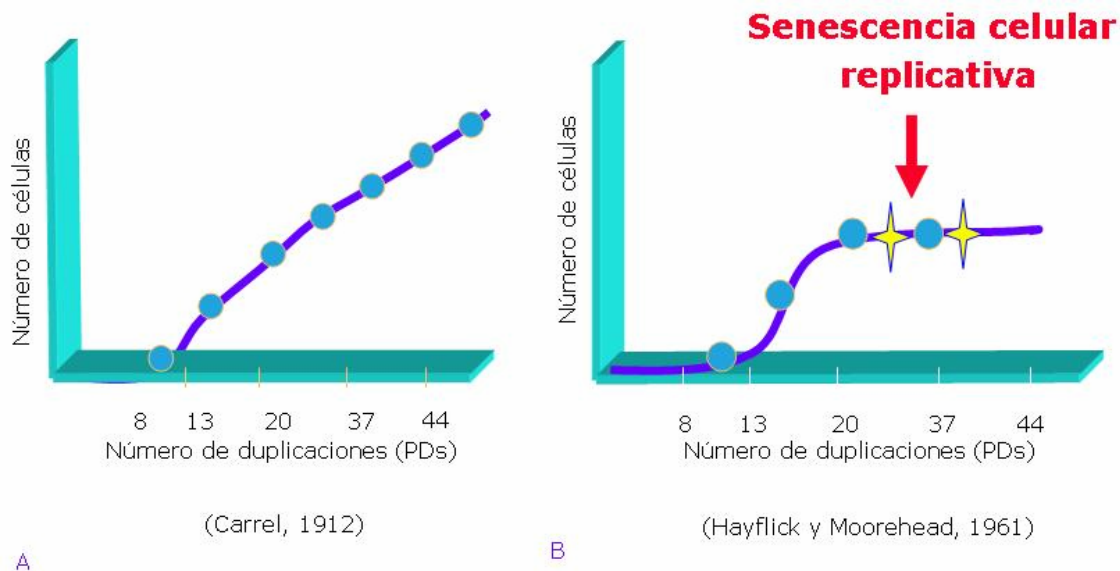


Figura 1 COMPORTAMIENTO CELULAR DE CULTIVOS PRIMARIOS *in vitro*

A. Hasta 1961 se pensaba que los cultivos primarios podían ser inmortales si estaban suplementados con los medios adecuados.

B. A partir de 1961, con los experimentos de Hayflick y Moorehead, se demostró que los cultivos primarios tenían un número finito de duplicaciones poblacionales, después de las cuales entraban en una etapa a la que se le conoce como senescencia celular replicativa, a este punto también se le conoce límite de Hayflick.

Por muchos años permaneció la duda sobre si los cambios morfológicos y funcionales asociados a este fenómeno eran únicamente cambios que ocurrían *in vitro*. Sin embargo, en 1995 se aportó evidencia de que el fenómeno de la senescencia ocurre en las células *in vivo*. Lo anterior se encontró en dermis de humano de edad avanzada, utilizando un ensayo histoquímico para β -galactosidasa (Dimri *et al.*, 1995).

1.1.2 El fenotipo senescente

La senescencia replicativa, se observa en los organismos pluricelulares, particularmente en las células que tienen potencial para el recambio celular (Campisi, 1997). No así en las células postmitóticas como las neuronas maduras o el músculo. Su principal característica es la interrupción del ciclo celular en la fase G₀/G₁. Esta incapacidad para proliferar, a diferencia del estado de la quiescencia, es irreversible aún ante estímulos mitogénicos. La actividad de las enzimas necesarias para la progresión del ciclo celular y la síntesis de ADN están disminuidas o sobre reguladas (Campisi, 1997). Las células senescentes presentan cambios fenotípicos en su aspecto general y alteraciones específicas en sus funciones diferenciadas. Morfológicamente, las células senescentes se observan de tamaño grande y aplanado con una gran cantidad de vacuolas (Figura 2).

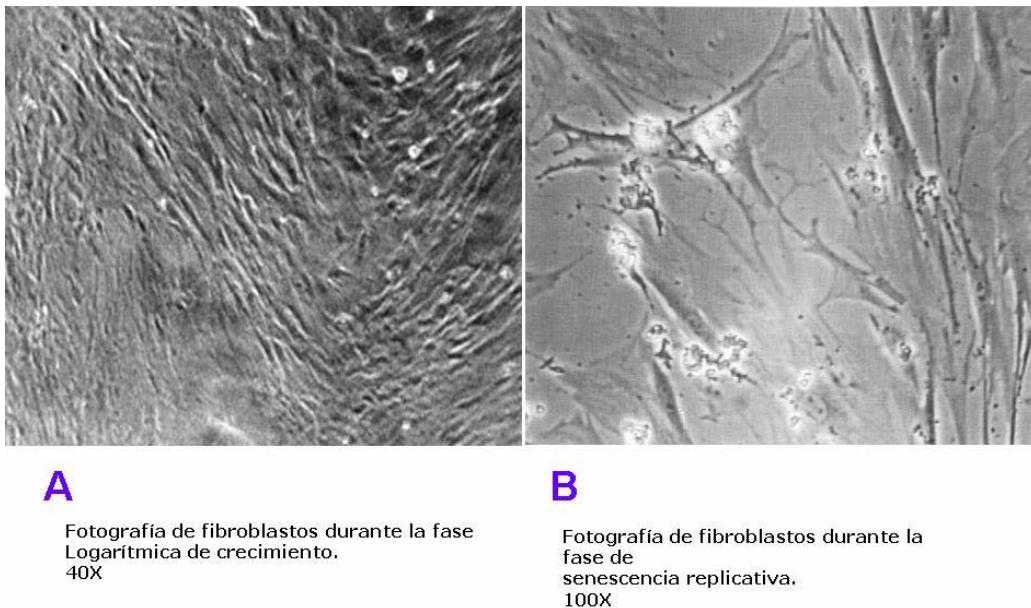


Figura 2 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN

A. Fotografía de fibroblastos durante la fase logarítmica de crecimiento.

B. Fotografía de fibroblastos durante la fase de senescencia replicativa. 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.

Aunque no pueden dividirse, las células senescentes se mantienen metabólicamente activas, sin embargo, muestran cambios selectivos en la expresión génica que altera su fenotipo. Uno de estos cambios, que al parecer se presenta en la mayoría de las células senescentes, es el aumento en la biogénesis lisosomal con la expresión de la enzima β -galactosidasa. Por su elevada expresión, la actividad de esta enzima ha sido utilizada como marcador de senescencia a un pH óptimo de 6 (Campisi, 2000).

También se ha observado que las células senescentes secretan una gran variedad de moléculas como proteasas, citocinas, factores de crecimiento, etc. Las moléculas secretadas pueden alterar el microambiente de las células vecinas, alterando su función, y convirtiéndolas posiblemente en células pre-neoplásicas o cancerosas. Esto explicaría porqué la senescencia replicativa se asocia a un incremento en la tumorigénesis durante la etapa tardía de la vida del organismo (Satyanarayana *et al.*, 2003).

Los cambios en la regulación y en la expresión de los genes en la senescencia dependen del tipo celular. Por ejemplo, los fibroblastos humanos al senescer, presentan un importante incremento en la expresión de colagenasa y estromielisina, y una disminución de la expresión de los inhibidores de metaloproteinasas tisulares 1 y 3 (TIMP-1 y TIMP-3); de esta manera, en lugar de producir matriz extracelular, hay degradación de la misma.

Se sabe por estudios de fusión, tanto de células humanas como de ratones, que el fenotipo senescente es dominante sobre el fenotipo presenescente o inmortal (Wang, 1995). Lo anterior sugiere que la acumulación de células senescentes puede alterar el entorno en el que se sitúan y estos cambios, a

la larga, pueden ser más importantes que la incapacidad para proliferar (Wang, 1995).

Una última característica de las células senescentes, es que son resistentes a estímulos que inducen la muerte por apoptosis. El mecanismo por el cual se lleva a cabo esta resistencia o los factores que la promueven, aún se desconocen, pero este hecho podría explicar el porqué las células senescentes, a pesar de estar metabólicamente y fisiológicamente alteradas se acumulan *in vivo* (Bodnar *et al.*, 1998).

Todo lo anterior indica que el fenómeno de la senescencia comprende muchos más eventos, que únicamente los cambios en la capacidad replicativa.

1.1.3 Mediadores de la senescencia replicativa

En los últimos años se ha sugerido que las células senescentes no tienen una falla generalizada en todos los mecanismos de transducción de señales y de factores de crecimiento, pero sí en algunos genes cuya respuesta temprana es esencial para iniciar la progresión del ciclo celular. Se ha reportado que tres genes indispensables para comenzar la síntesis del ADN no responden en las células senescentes. Ellos son, el proto-oncogene *c-fos*, que codifica para un componente del factor de transcripción AP-1; y los genes *Id1* e *Id2* que codifican para reguladores negativos de factores de transcripción hélice-asa-hélice, bHLH, que actúan como inhibidores de la diferenciación celular. Algo parecido 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. Además, se presenta una actividad deficiente en E2F1 y E5F5. Esto mismo sucede también con los genes

responsables de la replicación de histonas, los genes que codifican para las ciclinas A y B, y la cinasa dependiente de ciclinas cdk2. De igual manera, los genes de algunas de las enzimas necesarias para el metabolismo del ADN como las timidincinasas (TK), la DNA polimerasa α y la dihidrofolato reductasa (DHFR) se ven reducidas en su expresión (Toussaint *et al.*, 2000).

Lo mismo se ha reportado en relación a la proteína retinoblastoma, Rb, la cual se encuentra hipofosforilada en las células senescentes, deteniendo la proliferación en la fase G1 del ciclo. La participación de la proteína supresora de tumores p53 también es crítica, debido a que puede controlar la respuesta de senescencia por acortamiento de los telómeros, daño al ADN, alteraciones epigenéticas o de oncogenes. Una de las vías más conocidas por la que p53 promueve la senescencia celular es por inducción de la sobreexpresión de p21, que inhibe la transición G1/S. Por otro lado, en fibroblastos humanos, la proteína p21 se encuentra transitoriamente elevada durante la senescencia replicativa, y cuando ésta disminuye después de algunas semanas, p16 aumenta manteniendo la detención del ciclo celular durante la senescencia (Chen *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha visto que cuando se hiperfosforila la proteína Rb, o se inhibe a la proteína p53 (por ejemplo por el antígeno largo T del virus SV40), se bloquea la entrada a la senescencia replicativa y se dispara la proliferación celular indefinida (Gorbunova, 2002), lo que apoya la participación de estos componentes en la senescencia celular (Figura 3).

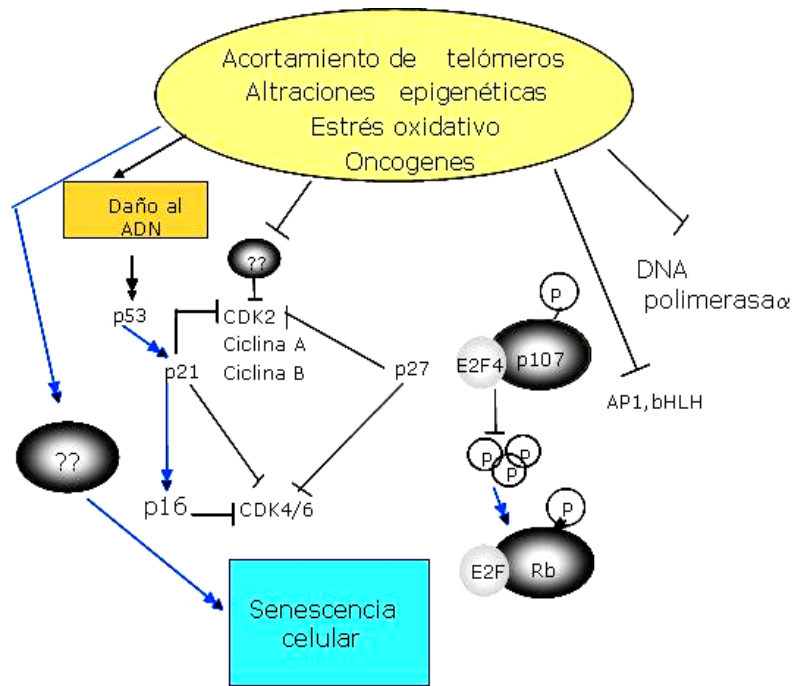


Figura 3 MEDIADORES DE LA SENESCENCIA CELULAR

Una de las vías más conocidas por la que p53 induce senescencia es mediante la sobreexpresión de *p21* que inhibe la transición G1/S, y cuando este disminuye después de algunas semanas, aumenta p16 en el mantenimiento del arresto en la senescencia.

1.1.4 Senescencia replicativa inducida por el acortamiento de los telómeros

Aún después de las evidencias que se han mencionado, no se sabe con certeza cual es el factor inicial que induce a una célula a detener su proliferación y a convertirse en una célula senescente. Como explicación se ha pensado que el acortamiento de los telómeros en las células somáticas humanas es el reloj mitótico con el que las células cuantifican el número finito y específico de divisiones celulares (Stein *et al.*, 1999).

Así también, se ha visto que el desarreglo de la estructura telomérica conlleva a la activación de múltiples y diversos mecanismos de señales que detienen la división celular (von Zglinicki, 2001).

Los telómeros son la parte terminal de los cromosomas, de ahí su nombre, del griego *telos*- final. Al parecer, su función es la de mantener la estabilidad estructural de los cromosomas y evitar las fusiones entre ellos. 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 (Martin *et al.*, 1996).

La idea de que el acortamiento de los telómeros con cada división celular, pudiera ser el único evento responsable de la inhibición de la progresión del ciclo, fue apoyada por los resultados obtenidos al sobreexpresar la subunidad catalítica de la enzima telomerasa, h-TERT, en fibroblastos humanos. En estos experimentos se observó que la enzima podía elongar los telómeros y mantener así la capacidad proliferativa (Steinert *et al.*, 2000). Sin embargo, una evidencia reciente muestra que algunos tipos celulares humanos y de hámster, senescen en presencia de la telomerasa aún y cuando posean sus telómeros largos (Bree *et al.*, 2002).

El número de duplicaciones en las que una población celular senesce varía de acuerdo al tipo celular, la especie donadora, la edad y el genotipo. Por ejemplo, en condiciones estándares de cultivo, los fibroblastos fetales humanos de pulmón senescen después de 50-80 PD, mientras que los fibroblastos fetales de pulmón de ratón senescen después de 5-10 PD. Aunque las células de ratones no muestran un acortamiento considerable de sus telómeros (Crescenzi *et al.*, 2003), después de cierta disminución en el

largo de estas subunidades, sí presentan fenotipo senescente con una cinética similar a la observada en las células humanas.

Wright y colaboradores (2001) han sugerido que la detención en la proliferación observada en las células murinas *in vitro*, es un fenómeno que es ocasionado como respuesta al estrés que se genera al aislar a las células del organismo y transferirlas a un medio de cultivo. Esta evidencia está basada en datos que indican que es el daño generalizado y no el número de divisiones celulares, lo que induce la senescencia celular. Lo anterior apoya la idea de que la longitud y la estructura de los telómeros no son los únicos factores que inducen la senescencia celular.

1.2 Senescencia celular inducida por estrés oxidativo

Como ya se mencionó, 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 celular sin el acortamiento de los mismos (Suzuki *et al.*, 2001; Espejel y Blasco, 2002). Datos recientes han aportado evidencias para correlacionar la senescencia como un programa de respuesta al estrés celular, más que una barrera de la progresión del ciclo celular. El estrés oxidativo fisiológico es capaz de inducir senescencia, de manera independiente del proceso de acortamiento de los telómeros, en algunos tipos celulares (Parrinello *et al.*, 2003).

La toxicidad por oxidantes se ha estudiado ampliamente en muchas especies de animales, en tejidos y diversos tipos celulares. Dentro de los cambios bioquímicos principales encontrados a nivel celular, se encuentran la disminución del glutatión reducido, la disminución de ATP, la elevación de calcio citosólico libre, y la activación de algunas familias de cinasas. Se ha

visto que la activación de factores de transcripción, como la proteína activadora AP-1, el factor nuclear NF- κ B y la proteína p53, contribuyen a los cambios en la expresión de un número de genes en las células expuestas a oxidantes. Las transformaciones celulares que se dan a partir de esos cambios incluyen la senescencia celular, la apoptosis o la necrosis.

Se sabe que diferentes tipos de señales intrínsecas y extrínsecas de estrés, pueden activar genes supresores de tumores como p53, Rb ó ambos, los cuales se han considerado como los principales activadores de la senescencia. La proteína p53 puede ser activada por las vías de señalización de daño al ADN, mediante las proteínas ATM y ATR, o por la proteína p14^{ARF}. Con el estrés oxidativo el gen p16^{INK4a} y la proteína p21, pueden causar la activación de Rb (Ben-Porath y Weinberg, 2005). De esta manera, las dos proteínas supresoras de tumores pueden actuar como integradoras de señales de estrés y su nivel combinado de activación podría determinar la senescencia como respuesta (Figura 4).

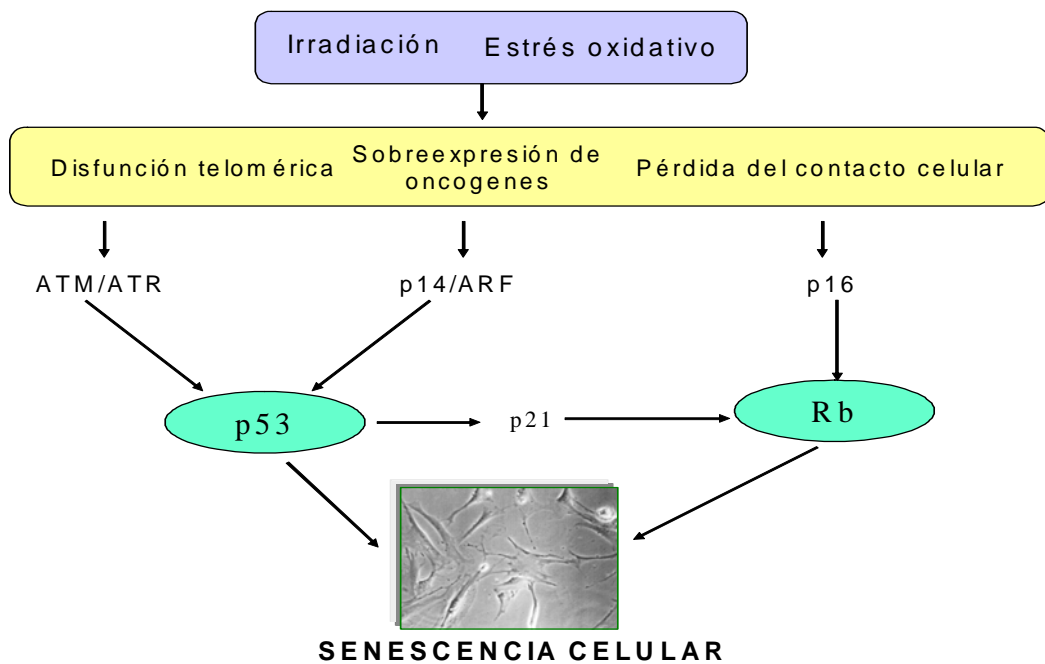


Figura 4 EL ESTRÉS OXIDATIVO COMO INDUCTOR DE SENESCENCIA CELULAR. Diferentes tipos de señales intrínsecas y extrínsecas de estrés oxidativo convergen en la activación de p53, Rb ó ambas. Su nivel combinado de activación podría determinar la senescencia.

Chen y colaboradores (1995), hipotetizaron que la acumulación del daño oxidativo contribuye a la senescencia celular. El daño oxidativo puede ser medido por la formación de aductos en el ADN, como el 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG). Estos investigadores demostraron que las células senescentes contenían 30 % más de oxo8dG en el ADN que las células no senescentes. Un estudio de Allen y colaboradores (1999) confirmó que las células senescentes producen niveles elevados de radicales oxidantes y de H₂O₂. Lo anterior apoya que las células senescentes tienen niveles altos de ERO que les inducen este tipo de daño.

La mayor parte de las células, cuando forman parte de los organismos, están expuestas a una tensión de oxígeno del 3%. Sin embargo, cuando se extraen para hacer cultivos primarios, las células experimentan una tensión de oxígeno mucho mayor que corresponde al 20%.

Las moléculas de oxígeno pueden convertirse en radicales libres a través de reacciones químicas y biológicas, y esto favorece la inducción de la senescencia prematura. Lo anterior se confirmó al cultivar fibroblastos humanos bajo una tensión de oxígeno del 3%. En este caso se alcanzaron 20 PD más, que cuando se cultivaron al 20% de O₂. En experimentos con condiciones de tensión elevada de oxígeno del 20%, pero usando antioxidantes como el N-terbutil-alfa-fenilnitrona (PBN) en el medio de cultivo, las células tuvieron de 4 a 7 PD más, antes de alcanzar la senescencia en comparación a las células no tratadas (Parrinello *et al.*,

2003). Estos datos experimentales apoyan la hipótesis de que el daño oxidativo contribuye a la senescencia celular replicativa.

Aún con todas estas evidencias, es posible que la inducción de la senescencia al someter a las células a un estrés oxidativo, no esté dada de manera directa por efectos de las ERO, sino de manera indirecta (Ben-Porath y Weinberg, 2005).

1.2.1 El estrés oxidativo y daño a las biomoléculas

Se ha propuesto que la principal fuente intracelular y también blanco de los radicales libres es la mitocondria. Esto debido a que entre el 1 y el 5% del oxígeno consumido por estos organelos es convertido a ERO, en condiciones fisiológicas normales (Roberfroid y Buc, 1995). Los radicales como el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$, y el radical hidroxilo OH^{\cdot} , poseen al menos un electrón desapareado. Esto les confiere inestabilidad y al mismo tiempo gran reactividad. Las ERO se producen en otros sistemas metabólicos en los que intervienen enzimas como las hidroxilasas, las dioxigenasas, las monooxigenasas y las oxidorreductasas dependientes de NAD^+ . Así como, durante la fagocitosis, en la cascada que conduce a la síntesis de las prostaglandinas y los leucotrienos, en la acción del citocromo P-450 y en la β -oxidación de los ácidos grasos dentro los peroxisomas. Recientemente se ha sugerido que las especies reactivas de oxígeno tienen un papel importante en la regulación de la expresión de algunos genes (Roberfroid y Buc, 1995). También existen factores externos que inducen la formación de radicales libres como la luz ultravioleta, la radiación ionizante y las sustancias químicas como el humo del cigarrillo, el aire contaminado y los gases radiactivos naturales (Ames, 1990).

En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidantes (producción de ERO) y los sistemas de defensa (antioxidantes y/o atrapadores de radicales libres), que mantiene la homeostasis celular y la regulación del estado redox intracelular. Esto permite un control versátil en las expresiones génicas y de transducción de señales. Cuando este balance no se mantiene, ya sea por la pérdida o la disminución del sistema protector, por un aumento en la producción de ERO o por ambos eventos simultáneamente, se dice que existe un estado de estrés oxidativo (Fahn, y Cohen, 1992). Si las células se mantienen bajo estrés oxidativo, se puede tener como resultado severas disfunciones metabólicas.

Las principales blancos de las ERO en la célula son los lípidos (Marnett *et al.*, 1985), las proteínas y el proteasoma (Ishii *et al.*, 2005) y los ácidos nucleicos (Fraga *et al.*, 1990). Cuando estas biomoléculas se dañan, se lesiona la función y la estructura celular. Por lo que se ha postulado que el daño oxidativo acumulado es una causa importante de envejecimiento, cáncer y enfermedades degenerativas (Halliwell, 1989).

A pesar de que existen algunos mecanismos de reparación del ADN nuclear (Mecocci *et al.*, 1993) y reparación del ADN mitocondrial (ADNmit) (Bohr, 1998), los radicales libres causan mutaciones como rearrreglos, deleciones, inserciones y amplificaciones de secuencias. Este daño es muy notable cuando se produce sobre algunos genes supresores de tumores, como p53, y en la amplificación de la expresión de protooncogenes. Además, se ha observado que dependiendo del tipo celular, el estado del ciclo celular en que se encuentra la célula y la concentración de estos oxidantes, se pueden desencadenar diferentes respuestas como necrosis, apoptosis, cáncer y/o senescencia celular (Figura 5).

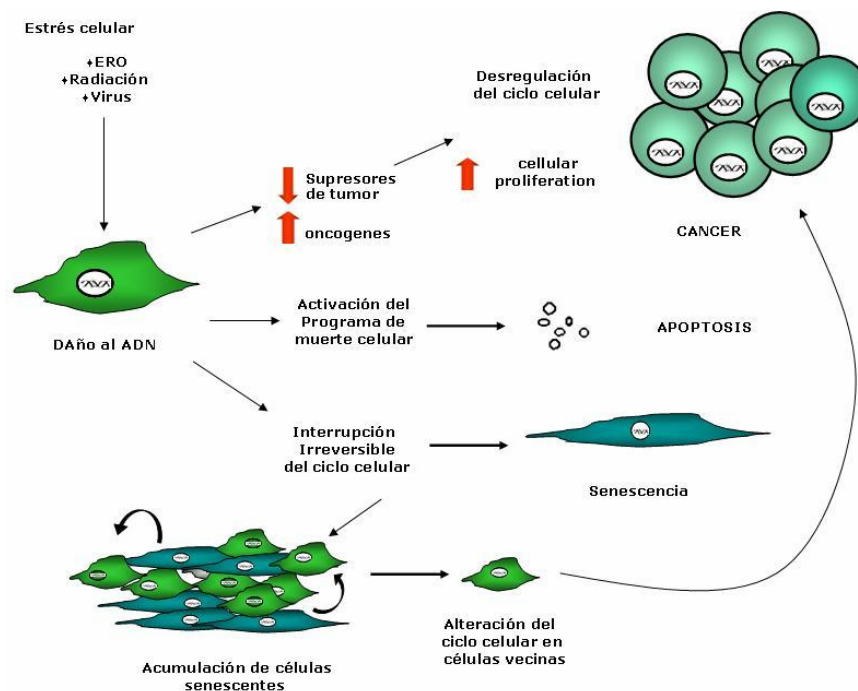


Figura 5 EL ESTRÉS CELULAR COMO INDUCTOR DE RESPUESTAS CELULARES
 Dependiendo del tipo celular, el estado del ciclo en que se encuentra la célula y la concentración de estos oxidantes, se pueden desencadenar diferentes respuestas como necrosis, apoptosis, cáncer y/o senescencia celular.

1.2.2 Senescencia inducida prematuramente por estrés oxidativo

SIPS

Estudios recientes han demostrado que las características senescentes, pueden inducirse de manera prematura en los primeros pasajes del cultivo primario. Se ha reportado que, si se incrementa la expresión del oncogen *ras* (Ferbeyre *et al.*, 2002), o si se somete a los cultivos primarios de fibroblastos humanos a tratamientos con H_2O_2 , éstos muestran características de senescencia replicativa en cuanto a la morfología y la incapacidad proliferativa. Las células no pueden sintetizar ADN en respuesta a estímulos mitogénicos, aún después de que se recuperen 3 semanas con medio nuevo. Al comparar estas células senescentes inducidas

prematuramente por estrés oxidativo con un control de células senescentes normales, se encontró que ambos grupos mostraron de manera similar la disminución de la actividad de la ornitina descarboxilasa, el aumento en la actividad de la β -galactosidasa, la elevación de las proteínas p21 y p16^{INK4a}, la incapacidad de fosforilar Rb, y una elevación de la expresión de la colagenasa y la fibronectina (Chen *et al.*, 2000).

Esta evidencia sugiere que ciertos tipos de estímulos, como la exposición a concentraciones subletales a agentes oxidantes, pueden inducir senescencia de manera precoz. A este fenómeno se le ha denominado senescencia prematura inducida por estrés, SIPS. Este término fue utilizado por primera vez en 1999 durante el Taller de Gerontología Celular y Molecular (EMBO).

Se ha reportado la inducción de SIPS por otros tratamientos como son las radiaciones UV (Chainiaux *et al.*, 2002), hiperoxia oxidante (Parrinello *et al.*, 2003), el uso de inhibidores de desacetilasas de histonas o la sobreexpresión de genes como *ras* (Hutter *et al.*, 2002) y *raf* (Zhu *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha visto que también la SIPS ocurre *in vivo*, pues las células después de estar sometidas a factores de estrés presentan características senescentes (Toussaint *et al.*, 2000). La SIPS está involucrada en algunas patologías relacionadas al envejecimiento y al cáncer (Serrano y Blasco, 2001).

Prevalece la controversia con respecto al mecanismo por el cual estas células entran en senescencia en los organismos, ya que se ha encontrado que en algunas ocasiones se relaciona al acortamiento de los telómeros y en otras no. Aún *in vivo*, la senescencia se ha encontrado sin el acortamiento del telómero (Melk *et al.*, 2003).

De hecho, se ha logrado inducir SIPS en células inmortalizadas que sobreexpresan hTERT, sugiriendo que en este caso, la telomerasa no evitó que las células entraran en SIPS (Gorbunova *et al.*, 2002).

Wright y Shay (2001) mantienen la hipótesis de que la senescencia replicativa y la SIPS poseen procesos diferentes.

Se ha sugerido que el fenotipo observado en SIPS es similar a la senescencia que ocurre *in vivo*, a diferencia de las pocas semejanzas encontradas entre los patrones de expresión génica de las células senescentes *in vitro* y las células de donadores viejos (Mondello *et al.*, 1999).

A pesar del conocimiento de múltiples vías que responden al estrés oxidativo, aún se desconoce la cascada exacta de eventos que conduce a la SIPS

1.3 La senescencia replicativa y el envejecimiento

A nivel molecular, la senescencia replicativa está asociada con cambios en la expresión de un gran número de genes (Campisi, 1992), como ocurre también con el envejecimiento. Un solo cambio no es criterio suficiente para definir ninguno de estos fenómenos. Aunque la senescencia ha sido principalmente estudiada en células en cultivo, hay un número creciente de evidencias que apoyan la idea de que cambios celulares similares ocurren durante el proceso de envejecimiento (Chainiaux *et al.*, 2002).

Cómo se ha visto, el estrés oxidativo parece tener una participación importante en el daño de las células. Una hipótesis, basada en el deterioro celular, sugiere que el envejecimiento es el resultado del daño oxidativo debido a las ERO que fueron producidas durante el curso del metabolismo

celular normal (Harman, 1956). Este daño oxidativo, puede inducir a nivel celular la senescencia replicativa, y el aumento en el número de células senescentes en el organismo puede contribuir al envejecimiento (Hayflick y Moorhead, 1961).

De acuerdo con la hipótesis de Harman, las células que provienen de animales viejos deben haber acumulado mayor daño al ADN en comparación con las células provenientes de animales jóvenes. La evidencia experimental directa se apoya básicamente en los estudios realizados por Dimri y colaboradores (1995) donde se determinó la acumulación de células senescentes en tejido humano envejecido. Esto se comprobó utilizando el marcador de senescencia β -galactosidasa humana.

La paulatina acumulación de las células senescentes en los organismos a lo largo de la vida, se ha confirmado en otras especies y en otros tejidos (Cristofalo *et al.*, 1998). Esta pérdida de la función de las células senescentes, incrementa la vulnerabilidad a las enfermedades o patologías comunes en la vejez. De este modo, la senescencia celular puede ser utilizada como un marcador de patología o de envejecimiento.

En conclusión, la SIPS puede ser un mecanismo importante en ciertas patologías relacionadas con la edad y en tejidos sometidos al estrés oxidativo.

1.4 La proteína Bcl-2

Bcl-2 es una proteína que al parecer tiene una participación importante en la senescencia celular. Esta proteína pertenece a una familia de genes cuyos productos influyen tanto en la sobrevivencia como en la muerte celular. El proceso en el que inicialmente se describió su participación fue en la

apoptosis. Este proceso es una muerte fisiológicamente activa, diferente de la necrosis, que controla las poblaciones celulares durante la embriogénesis, la homeostasis normal de los tejidos, la respuesta inmune y los daños por virus u otros agentes como las ERO (Hockenbery *et al.*, 1993). Los miembros de esta familia comparten una o más regiones de homología designadas como dominios de homología BH1, BH2, BH3, BH4 y un extremo carboxi terminal hidrofóbico que les sirve de anclaje a las membranas. Hasta la fecha se han reportado al menos 15 miembros de la familia de Bcl-2 en células de mamífero y un mayor número en otras especies (Adams y Cory, 1998) (Figura 6).

Dentro del grupo de los genes de supervivencia sobresale el gen *bcl-2* que codifica para una proteína de 26 kDa. Posee un extremo carboxi-terminal hidrofóbico (19-22 aa) que le sirve para anclarse a la membrana del retículo endoplásmico, a la envoltura nuclear y de manera importante a la membrana externa mitocondrial (Reed, 1998).

La proteína Bcl-2 fue originalmente descubierta en el linfoma folicular humano de células B, por la translocación cromosomal t (14; 18), 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 codificante queda bajo el control del promotor de la cadena J de la inmunoglobulina, el resultado es una sobreexpresión aberrante de *bcl-2* (Tsujiimoto *et al.* 1987; Liu *et al.*, 1993). A pesar de que *bcl-2* se caracterizó en un principio como un oncogen, no estimula la proliferación celular, pues se ha visto que retrasa la entrada al ciclo celular (Winter *et al.*, 1998). El mecanismo molecular por el cual la proteína Bcl-2 altera el ciclo celular es poco comprendido, sin embargo, por experimentos de mutagénesis se ha demostrado que tanto la inhibición de la apoptosis como el efecto antiproliferativo pueden tener mecanismos diferentes (Huang *et al.*, 1997).

1.4.1 Efecto protector de la proteína Bcl-2 ante estímulos apoptóticos

Es bien conocido que la proteína Bcl-2 es una de los guardianes de la integridad de la membrana mitocondrial, durante periodos de estrés y estímulos que generan la apoptosis, como son la exposición a radiación ionizante (Manome *et al.*, 1993), el tratamiento con agentes

quimioterapéuticos (Decaudin *et al.*, 1997), el daño por isquemia/reperfusión (Myers *et al.*, 1995), el daño por ausencia de factor de crecimiento y de suero (Zhong *et al.*, 1993), entre otros.

En la regulación de la muerte celular, la proteína Bcl-2 actúa ya sea independientemente o con interacción con otros miembros de la familia Bcl-2. Además, su actividad puede ser influida dependiendo del tipo de tejido y por varios factores a diferentes niveles, como interacciones y modificaciones proteína-proteína, post-traduccionales y de fosforilación, entre otros (Tombor *et al.*, 2003). La concentración relativa tanto de moléculas pro-apoptóticas como anti-apoptóticas, puede modular el programa de muerte. Se propone que cuando dos proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 homodimerizan, la célula no inicia este programa, mientras que cuando heterodimeriza la proteína anti-apoptótica Bcl-2 con una pro-apoptótica como Bax, se inicia la apoptosis (Zha y Reed, 1997).

La manera en que la proteína Bcl-2 protege a la célula de la muerte se desconoce, aunque parece que el sitio clave de acción está en la membrana externa mitocondrial (Green y Reed, 1998), en donde controla la permeabilidad membranal por estabilización (Shimizu *et al.*, 1998; Dispersyn *et al.*, 1999), manteniendo también la homeostasis de Ca^{++} (He *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998). En el proceso antiapoptótico, Bcl-2 impide la liberación del citocromo c de la mitocondria (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997) a través del canal de aniones dependiente de voltaje VDAC. Lo anterior evita que se desencadene la cascada de caspasas, que son proteasas de cisteína, efectoras de este tipo de muerte celular programada (Shimizu *et al.* 1999).

1.4.2 La proteína Bcl-2 como protectora frente al estrés oxidativo

Experimentos de estrés oxidativo crónico realizado en ratones knockout de Bcl-2, han llevado a sugerir la hipótesis de que las células que expresan Bcl-2 tienen capacidades moduladoras que suprimen las señales de estrés oxidativo, generadas durante la fase de iniciación de la vía apoptótica. Así también, la proteína Bcl-2 está asociada con niveles elevados de GSH reducido y de NADH/NAD⁺, indicando un cambio en el potencial redox de la célula hacia un estado más reducido (Ellerby *et al.*, 1996), lo que indica que los tioles mitocondriales constituyen un sensor crítico del potencial redox celular durante la apoptosis (Voehringer y Mein, 2000; Fleury *et al.*, 2002). Los primeros estudios sobre Bcl-2 y el estrés oxidativo, llevaron inicialmente a proponer que la proteína Bcl-2 podía evitar el daño oxidativo al reducir la formación de especies reactivas de oxígeno (Hockenbery *et al.*, 1993; Hochman *et al.*, 1998; Esposti *et al.*, 1999). Ahora se sabe que Bcl-2 pudiera promover la presencia de las ERO (Steinman, 1993; Esposti *et al.*, 1999) e inducir el aumento de las defensas antioxidantes como el glutatión intracelular, entre otros (Rimpler *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Amstad *et al.*, 2001). Esta protección, le permite a la célula un aumento de la longevidad.

Mucho se ha discutido si el papel de la proteína Bcl-2 es antioxidante o prooxidante. Existen trabajos que apoyan el papel antioxidante de la Bcl-2. Se ha reportado que la sobreexpresión de esta proteína protege contra la muerte por estrés oxidativo a las células FL5.12, línea celular murina dependiente de interleucina 3, además de mantener niveles bajos de fragmentación del ADN (Hockenbery *et al.*, 1993). Longo y col. (1997), realizaron estudios en donde sobreexpresaron la Bcl-2 en *Saccharomyces*

cerevisiae y encontraron que disminuyó la frecuencia de mutaciones y el daño oxidativo con aumento en la actividad de la catalasa cuando los cultivos se expusieron a estímulos de muerte celular con la ceramida o TNF- α . De tal manera, los autores propusieron que la Bcl-2 posee una actividad antioxidante de manera similar a lo que sucede en las células de mamíferos. Por lo anterior, se ha sugerido que la vía antioxidante utilizada por Bcl-2 pudiera involucrar un estado redox por tioles (Mirkovic *et al.*, 1997). Por otra parte, existen estudios que apoyan el papel prooxidante de la proteína Bcl-2, cuya función al parecer es la de alertar o preparar a la célula a enfrentar un estrés oxidativo severo. En 1999, Esposti y colaboradores transfectaron el gen *bcl-2* en células de linfoma de Daudi y reportó un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno, así como un incremento en las defensas antioxidantes celulares.

De manera interesante, se ha reportado que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 puede promover la presencia de las enzimas de reparación, tales como la endonucleasa apurinica/apirimidinica. Esto implica que las células que sobreexpresan Bcl-2 podrían sobrevivir más tiempo con un incremento en la capacidad de reparación del daño en el ADN (Robertson *et al.*, 1997). Por ejemplo, al someter a un estrés oxidativo con óxido nítrico a la línea neuronal PC12 que sobreexpresa la Bcl-2, se encontró un bloqueo en la producción de las ERO y una disminución en la fragmentación del ADN nuclear y mitocondrial. Al parecer, la proteína Bcl-2 tiene una posible participación en la regulación de la expresión o función de enzimas de reparación como la uracil-DNA glicosilasa, la endonucleasa, la DNA ligasa y la 8-oxoguanina DNA glicosilasa (Deng *et al.*, 1999).

1.4.3 La proteína Bcl-2 y el ciclo celular

Aunque Bcl-2 fue descubierto como un oncogen, se ha demostrado que no posee una actividad oncogénica dominante, pero sí tiene influencia sobre el ciclo celular (Hawkins y Vaux, 1994).

La proteína Bcl-2 en células normales puede favorecer la transición del estado ciclante al estado quiescente o el ciclo detenido transitoriamente en G1. Sin embargo, los mecanismos de esta nueva función son poco comprendidos.

Por ejemplo, se ha encontrado que las células de mamíferos que sobreexpresan Bcl-2, presentan tanto sobrevivencia como retraso en la proliferación celular aún ante estímulos apoptóticos, con prolongación de la fase G0/G1 del ciclo celular, de manera quiescente. Cuando simultáneamente se expresa la proteína proapoptótica Bax, se revierte este proceso (Borner, 1996). Sin embargo, en un estudio realizado en una línea celular de cáncer ovárico, se encontró que la sobreexpresión de la Bcl-2 retrasó la progresión del ciclo celular promoviendo la acumulación de células en la fase S (Belanger *et al.*, 2005). El mecanismo por el cual la proteína Bcl-2 actúa sobre el ciclo celular aun se desconoce.

Esta propiedad antiproliferativa se ha utilizado para explicar la actividad supresora de tumores de la proteína Bcl-2 (Crescenzi *et al.*, 2003). Por ejemplo, los tumores hematopoyéticos como los linfomas foliculares no-Hodkin B-CLL que normalmente sobreexpresan Bcl-2, son de bajo grado y contienen un elevado número de células detenidas o en estado G1 prolongado (Winter *et al.*, 1998)

La proteína Bcl-2 parece retrasar la entrada al ciclo celular por el incremento de los niveles de p27 y un miembro de la familia de Rb: p130.

Cuando aumenta p130, esta molécula se une a E2F4 formando un complejo, que impide la transcripción de E2F1 necesaria para la progresión del ciclo celular (Vairo *et al.*, 2000) (Figura 7).

Se ha reportado que la proteína Bcl-2 no sólo influye para convertir a las células en quiescentes, sino que también en senescentes. Un estudio realizado por Rincheval y colaboradores (2002) reveló que las células embrionarias de rata sensibles a temperatura que sobreexpresan Bcl-2, podían quedar detenidas en la fase G2 del ciclo celular con fenotipo de tipo senescente. De igual manera, Crescenzi y colaboradores (2003) observaron que la expresión constitutiva de la Bcl-2 en una línea celular de carcinoma de endometrio humano, inducía la detención del ciclo en la fase G1 del ciclo celular de manera irreversible. En este caso, las células adquirieron un fenotipo senescente con características morfológicas alteradas y un aumento en la actividad de β -galactosidasa.

Al parecer, la inducción de senescencia prematura está dada por la inhibición de la actividad de la cinasa Cdk2 mediada por p27. Por tanto, se propone que la proteína Bcl-2 tiene la capacidad de inducir senescencia prematura endógena lo que le permite a su vez, suprimir el crecimiento de tumores.

Así también, una investigación reciente sugiere que la regulación de las ERO por la proteína Bcl-2 podría controlar los niveles de p27 (Deng *et al.*, 2003).

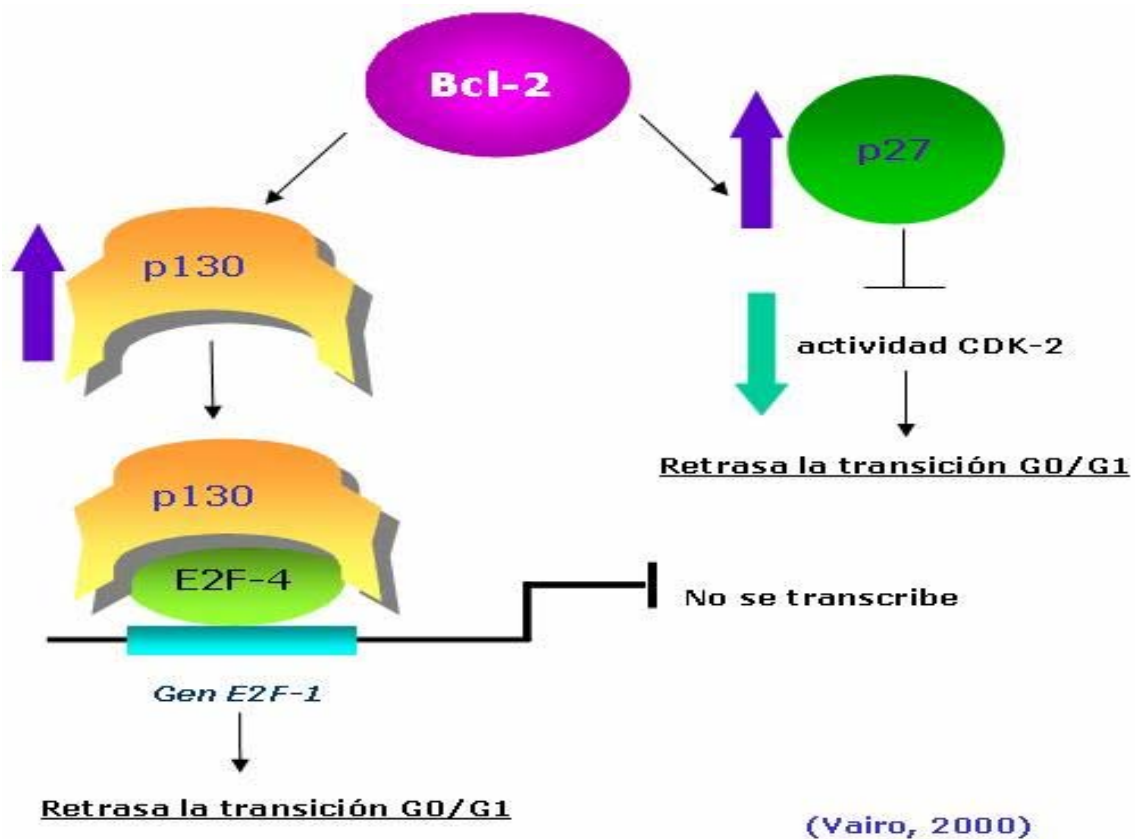


Figura 7 INDUCCIÓN DE LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR EN G1 POR LA PROTEÍNA Bcl-2
 Dos inhibidores del ciclo celular en respuesta a la expresión de Bcl-2, p27^{KIP1} y p130. Esta respuesta puede estar mediada por diferentes vías.

1.4.4 La proteína Bcl-2 y la senescencia celular replicativa

Recientemente se ha reportado que la senescencia celular está asociada con niveles elevados de la proteína Bcl-2 y con la detención del ciclo celular en la fase G1; mientras que la apoptosis está asociada con bajos niveles de la Bcl-2 y detención del ciclo celular en la fase G2 (Vairo *et al.*, 2000).

Wang en 1995, al estudiar fibroblastos humanos senescentes, encontró que tenían un mayor contenido de la proteína Bcl-2, además de que eran resistentes a la apoptosis cuando el suero era eliminado del medio de cultivo.

Por otro lado se ha visto que la expresión constitutiva de Bcl-2 en las células HEC1B y H1299, induce la expresión de algunas características distintivas de la senescencia celular, como células con morfología grande y aplanada, aumento en el número de vacuolas en el citoplasma, expresión de β -galactosidasa e inhibición de la proliferación. Además, las células senescentes mostraron un aumento en la expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, cdk, y disminución de la regulación de genes E2F (Crescenzi *et al.*, 2003).

Así mismo, cuando los fibroblastos humanos de la línea IMR-90 se sometieron a un estrés oxidativo para inducir la SIPS, se reportó que una fracción de la población sufrió apoptosis y otra desarrolló características senescentes y detención en G1. Al medir los niveles de Bcl-2, resultaron elevados en el grupo de células senescentes (Chen *et al.*, 2001).

Por otro lado, Rincheval y colaboradores (2002) al estudiar el efecto de la restricción de temperatura sobre una línea celular de fibroblastos de embrión de rata que sobreexpresaba Bcl-2, observaron que las células sobrevivientes adoptaron una morfología senescente. Estos investigadores concluyeron que el gen *bcl-2* puede promover la senescencia replicativa ante ciertos niveles de estrés, inhibiendo la apoptosis y la proliferación celular, pasando de un fenotipo apoptótico a un fenotipo del tipo senescente en la fase G2.

1.4.5 La proteína Bcl-2 en el envejecimiento

Se han realizado pocos estudios para determinar la presencia de la proteína Bcl-2 en tejidos de mamíferos, sin embargo, recientemente se ha

encontrado una sobreexpresión endógena de esta proteína en algunos tejidos de organismos viejos y en células senescentes.

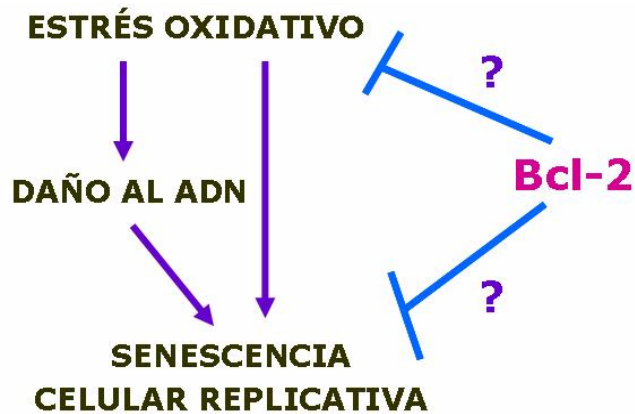
Se ha correlacionado que la variación cuantitativa en la frecuencia de mutación de *bcl-2* aumenta con la edad, con riesgo para la aparición de linfoma (Migheli *et al.*, 1994). También que el incremento de esta proteína puede ser el reflejo de un mecanismo de protección de daño contra las ERO. Por ejemplo, en un estudio se compararon linfocitos humanos de individuos jóvenes (<35 años) y de individuos viejos (>60 años) y se encontró una correlación entre el aumento en la expresión de la Bcl-2 y la edad avanzada del paciente (Schindowski *et al.*, 2000). Kaufman y colaboradores (2001) reportaron que una sobreexpresión endógena de la Bcl-2 en el hipocampo y el cerebelo de ratas de 24 meses en comparación con ratas de 3 meses. Al tratar a los animales viejos con el antioxidante PBN (N-tert-butil-afenilnitrona), se encontró una reversión en la sobreexpresión de la Bcl-2.

De igual manera, en estudios realizados en nuestro laboratorio se encontró un incremento en los niveles de esta proteína en homogenados de pulmón de ratón desde neonatos hasta 12 meses (Konigsberg *et al.*, 2004).

Por lo anterior, es interesante conocer cuales son los mecanismos y las condiciones por las cuales la Bcl-2 responde al estrés oxidativo protegiendo a la célula. Así como su papel en la senescencia celular que pudiera contribuir a la comprensión del envejecimiento y enfermedades relacionadas como el cáncer.

2 HIPÓTESIS

Se sabe que el estrés oxidativo induce senescencia celular de manera prematura. Así mismo, se ha reportado que la proteína Bcl-2 tiene varias funciones además de su papel anti-apoptótico. Una de estas funciones es la de proteger a las células del estrés oxidativo. De tal modo, si las células que sobreexpresan Bcl-2 se someten a un estrés oxidativo subletal que induzca la SIPS, se espera que esta molécula prevenga a las células de iniciar un proceso de senescencia celular.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón confiere una protección contra el estrés oxidativo que evite o retrase la senescencia celular.

3.2 Objetivos particulares

- a. Sobreexpresar la proteína Bcl-2 de manera estable en los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón.
- b. Evaluar el potencial que tienen diferentes concentraciones de H₂O₂ en la inducción de senescencia inducida prematuramente por estrés, SIPS.
- c. Determinar los parámetros de envejecimiento en las células que sobreexpresan la proteína Bcl-2 ante un reto oxidativo que induce la SIPS.
- d. Determinar el daño al ADN por estrés oxidativo que induce la SIPS en las células que sobreexpresan la proteína Bcl-2.
- e. Evaluar los niveles de las ERO y correlacionarlo con el estrés oxidativo que induce la SIPS, en las células que sobreexpresan la proteína Bcl-2.

4 JUSTIFICACIÓN

Existe un interés considerable en el estudio de las bases moleculares de la senescencia celular, debido a su papel potencial en el envejecimiento y en las enfermedades relacionadas como el cáncer, así como en su papel en la supresión de tumores.

En estudios recientes, se ha mostrado que la proteína antiapoptótica Bcl-2 posee un papel modulador de las ERO, protegiendo y favoreciendo la sobrevivencia celular. De esta manera, es fundamental conocer la protección que brinda la Bcl-2 a la célula, para evitar el daño oxidativo que la conduzca a la senescencia.

Esperamos que los conocimientos generados de este estudio, puedan contribuir en un futuro, a una mejor comprensión de las enfermedades relacionadas con el envejecimiento y el cáncer.

5 METODOLOGÍA

5.1 **Ratones CD-1 como modelo experimental**

En este trabajo se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón de hembras de 2 meses de edad de la cepa CD-1. Los cultivos primarios son un modelo adecuado para el estudio de los aspectos celulares del envejecimiento (Warner *et al.*, 1997) y la senescencia celular (Campisi, 1997).

Se eligió aislar fibroblastos de pulmón debido a que el pulmón es un órgano que se encuentra expuesto a elevadas concentraciones parciales de oxígeno y posee mecanismos que le permiten sobrellevar el estrés oxidativo (López-Torres *et al.*, 1993).

5.2 **Obtención de los cultivos primarios**

El cultivo primario se obtuvo según la técnica de Doyle y colaboradores (1998). Todos los ratones se sacrificaron mediante dislocación médulo-encefálica y los pulmones se extrajeron mediante incisión torácica.

El pulmón se colocó en cajas Petri estériles que contenían una solución amortiguadora de fosfatos, PBS (Sigma) adicionada con 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO).

El tejido se lavó de 2 a 3 veces con la solución anterior y se aspiró el PBS con una jeringa evitando la pérdida del tejido. Con bisturí y pinzas el tejido se disgregó lo más finamente posible.

Los fragmentos de tejido se transfirieron a tubos Falcon que contenían 7 mL de colagenasa 1.A (Sigma) al 0.03% en DMEM (Sigma), sin suero fetal de bovino SFB (Hyclone). Los tubos se colocaron en la incubadora durante 12

horas, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 90 % de humedad a 37°C de temperatura.

Pasado ese tiempo se agregó a cada tubo 30 mL de DMEM suplementado con 1.5% de Antibiótico-antimicótico (Microlab), 15% de suero fetal bovino inactivado (SFB) (Hyclone), denominado medio completo. La suspensión se homogenizó vigorosamente utilizando una pipeta de vidrio y posteriormente se distribuyó homogéneamente en cajas Petri de 100 x 20 mm de diámetro (Corning).

El establecimiento de las primeras células fue aproximadamente entre 4 y 6 días después de la obtención del cultivo. El medio de cultivo se cambió cada 3 ó 4 días. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora con 5% de CO₂ y 90% de humedad a 37°C de temperatura.

5.3 Inducción de Senescencia prematura por estrés oxidativo SIPS

Se ha reportado que existen 2 aproximaciones experimentales para estudiar la senescencia. En una de ellas se miden los biomarcadores de senescencia sin permitir que la célula se recupere del estrés oxidativo. Mientras que en la otra, las células después del tratamiento, son cambiadas a un medio de cultivo sin peróxido de hidrógeno (Dumont *et al.*, 2000). Este último caso fue el que nosotros llevamos a cabo. Las determinaciones de senescencia se realizaron 2 días después para evitar la interferencia del efecto del estrés oxidativo inmediato.

Mediante una curva de proliferación celular se evaluó el efecto de 75, 150 y 200 µM de H₂O₂ para determinar la dosis adecuada que indujera la SIPS.

En el día 7 de cultivo, las células se sometieron al tratamiento con las diferentes concentraciones de H₂O₂ durante dos horas.

Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron suavemente con PBS y se les añadió medio DMEM completo.

A partir del día 9, se determinó la proliferación celular a lo largo del tiempo de cultivo, así como el número de células positivas al ensayo SA β -galactosidasa.

5.4 Sobreexpresión de la proteína Bcl-2

Para estudiar el papel de la Bcl-2 en la senescencia celular y su protección contra el estrés oxidativo, se indujo la sobreexpresión de esta proteína en las células del cultivo primario. Como control de infección o control vector, se obtuvieron células que sobreexpresaban a la proteína reportera GFP (Green Fluorescent Protein).

5.4.1 Cotransfección por el método de fosfato de calcio

Para la obtención de las partículas virales, primero se realizó una cotransfección de plásmidos por el método de fosfato de calcio. Con esta técnica, los complejos formados por el ADN plasmídico con el fosfato de calcio entran a la célula por endocitosis y son transportados hacia el núcleo, en donde son integrados en el genoma de la célula y transcritos para la sobreexpresión transitoria de las partículas virales (Kufe *et al.*, 2003).

Se usaron 3 plásmidos para la cotransfección. Uno de los plásmidos contenía la información para la construcción de la cápside del virus pCLECO (*gag + env + pol*), otro tenía la información referente a la proteína Bcl-2 pCLNRxBcl-2GFP y el tercer plásmido pCL-NRX-GFP tenía la información de la

proteína GFP. Los plásmidos fueron proporcionados por el Dr. Covarrubias del instituto de Biotecnología UNAM.

Se cotransfectaron en las células empaquetadoras 293T de riñón de embrión (Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 17), los plásmidos: pcl-NRX-GFP-Bcl-2 y pcl-ECO para el caso de las células que sobreexpresaron la Bcl-2, y los plásmido pcl-NRX-GFP y pcl-ECO como el control de infección GFP. A las primeras se les denominó 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+.

Las células 293T se sembraron en placas de 6 pozos, a una densidad de 200×10^3 células en un volumen de 3 mL de medio DMEM + 10% SFB por pozo. Se mantuvieron en la incubadora por 21 horas. Pasado ese tiempo, se les aspiró el medio y se agregaron 2 mL de medio sin antibiótico por pozo.

Pasadas 3 horas, se realizó la cotransfección usando el kit calcium phosphate transfection system (GIBCO BRL®).

Los tubos 1 contenían los fosfatos: Solución HSB 1x. Se preparó el volumen para todos los pozos a transfectar (incluido el control) y se utilizaron 100µl de esta solución para cada pozo.

	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

Los tubos 2 contenían el ADN plasmídico y el fosfato de calcio:

- 85.8µl de agua de transfección (kit)
- 0.1µl de ADN acarreador (kit)
- 5µg de ADN plasmídico pcl-NRX- GFP- Bcl-2 ó pcl-NRX-GFP
- 5µg de ADN plasmídico pclECO

Posteriormente se le añadió a cada tubo, 1µl de solución de calcio y se resuspendió suavemente. Se le agregaron otros 5µl de solución de calcio 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 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se agregó a cada uno de los pozos con células 293T.

A las 24 h se extrajo el medio y se agregó medio DMEM completo.

Colecta de partículas virales

La colecta de partículas virales se realizó 48 h después de la cotransfección, pues se ha visto una producción elevada a ese tiempo.

El medio colectado se colocó en un tubo de 15 mL. Se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min. Se tomó el sobrenadante que contiene las partículas virales y se alicuotó en tubos Eppendorf que se guardaron a -70°C .

5.4.2 Infección retroviral para la sobreexpresión de la proteína Bcl-2

Cuando los pozos con células primarias de fibroblasto de ratón mostraron aproximadamente una confluencia celular del 60% en el día 5 o 6 del

cultivo, fueron infectados con las partículas obtenidas, GFP+ o Bcl-2+, a una concentración 1:1 con DMEM + Polibrent (4mg/mL de medio). Al pozo control se le agregó solamente DMEM con polibrent en lugar de las partículas.

A las 24 horas, se les cambió el medio. Las células con sobreexpresión de Bcl-2+ o GFP+ se mantuvieron en la incubadora para las determinaciones posteriores.

5.5 Fluorescencia de células que sobreexpresan la proteína Bcl-2

En un microscopio de fluorescencia confocal se observó la emisión fluorescente de las células que incorporaron la información para la sobreexpresión de Bcl-2+ y GFP+.

En esterilidad y por goteo de un volumen no mayor a 400 μ L, se sembraron en portaobjetos aproximadamente 40-50 mil de cada uno de los grupos celulares: control, Bcl-2+ y GFP+. Después de incubarse 2 a 3 horas, se les agregaron 7 mL de DMEM completo. Transcurridas 30 horas, se aspiró el medio y se lavó tres veces con PBS frío.

Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído 4% disuelto en PBS frío y se colocaron en hielo por 10 minutos.

Transcurrido ese tiempo, a cada portaobjetos se le agregó una gotita de glicerol 50% con PBS y se taparon con sus respectivos cubreobjetos para ser observados en el microscopio.

5.6 Inmunoanálisis de la proteína Bcl-2 por western blot

Para corroborar la expresión de la proteína Bcl-2 en las células control, GFP+ y Bcl-2+, se realizó la técnica de inmunoanálisis por Western blot. En

esta técnica, las proteínas de cada una de las muestras se separaron mediante una electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida. Posteriormente, la Bcl-2 se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se reveló la presencia de la proteína con un anticuerpo conjugado con peroxidasa, como se describe a continuación.

Lisis de las células de cultivo primario para extracción de proteínas

Se utilizaron 5 cajas Petri de 60 mm de diámetro con una confluencia celular del 70%. Las células se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS. El exceso de PBS se extrajo por aspiración.

A cada caja Petri se le agregaron 50 μ L de solución de lisis (aprotinina 1mg/mL, leupeptina 1mg/mL y PMSE 1mg/mL) y se incubaron durante 3-5 minutos sobre hielo. Las cajas se movieron cada minuto para que la solución se repartiera homogéneamente.

Pasado este tiempo se utilizó un gendarme de goma para reunir todo el contenido celular.

La muestra se colocó en un tubo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15-20 minutos a 4°C (centrifuga Eppendorf 5415C).

En el sobrenadante quedó el material citosólico que se transfirió a un tubo Eppendorf para almacenarlo a -20°C.

Determinación de la proteína total por el método de Bradford

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

Se tomaron 2 μL de la proteína total extraída, y se colocaron en tubos de ensayo con 800 μL de agua destilada cada uno. Se agregaron 200 μL de reactivo de Bradford a cada tubo y se mezcló cada uno utilizando un vórtex. Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro a 595 nm y se determinó la concentración de proteína para cada caso usando la curva patrón.

Electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida-SDS

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

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

Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 3 minutos para relajar la estructura secundaria de las proteínas.

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

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

Transferencia de proteínas totales a la membrana de nitrocelulosa.

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

El gel de acrilamida se dividió en dos secciones. El fragmento que contenía la proteína Bcl-2 se utilizó para la transferencia. El otro fragmento se tiñó con azul de Comassie para verificar la cantidad de proteína total y el corrimiento de la electroforesis.

El gel se colocó cuidadosamente con pinzas entre papel filtro y la membrana de nitrocelulosa, y sobre ésta otras 2 capas de papel filtro, todos cortados exactamente del mismo tamaño. Formando un "sándwich".

El "sandwich" se colocó sobre la placa de la cámara de transferencia que contenía buffer de transferencia frío (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.05%, Metanol 20% y tween 20 1X). La transferencia se realizó con un voltaje de 100 mV durante toda la noche.

Anticuerpo primario, secundario y revelado.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 60 minutos a temperatura ambiente con TBS-tween (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, tween 200.1%, pH 7.5) + 3% de leche descremada. Después de este tiempo, se lavó 2 veces con TBS-tween.

La membrana se colocó en una solución que contenía 15 µL del anticuerpo primario α -Bcl-2 (Neomarker) en 3 mL de TBS-tween + albúmina al 0.1%, durante 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación ligera. El anticuerpo primario se utilizó a una dilución 1:200.

La membrana se lavó durante 5 minutos con TBS-tween 3 veces.

Posteriormente, se agregó 1 mL de anticuerpo secundario α -Mouse IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) en 10 mL de TBS-tween + albúmina al 0.1%, durante 90 min a temperatura ambiente y en agitación.

El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución de 1:10000.

Se lavó la membrana durante 5 minutos con TBS-tween 2 veces y 3 veces con TBS solo.

Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 2 μ L de luminol Super Signal West Pico y 2 μ L de peróxido Super Signal West Pico Stable.

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

5.7 Parámetros de envejecimiento celular determinados a lo largo del tiempo del cultivo

Para los ensayos de proliferación celular, determinación del tiempo de duplicación celular con incorporación de timidina tritiada y SA β -galactosidasa, se sembraron aproximadamente 5000 células/pozo en placas de 48 pozos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en al menos 3 experimentos independientes.

Después del día 7 del cultivo, las células se lavaron cuidadosamente con PBS. Las células se despegaron agregando 0.3 ml de tripsina- EDTA al 0.25% (Sigma) a cada caja Petri.

Las células se contaron utilizando un hemocitómetro y se repartieron, aproximadamente 5000 células/pozo en placas de 48 pozos.

Cuando existía confluencia celular de aproximadamente 80%, las células se subcultivaron en nuevos pozos, para evitar que llegaran a confluencia.

Se realizaron las determinaciones correspondientes cada tercer día.

5.7.1 Viabilidad celular por exclusión celular del azul de tripano

La proliferación celular se determinó contando células viables cada tercer día a lo largo del tiempo de los cultivos. Se utilizó el colorante azul de tripano, que es excluido activamente por las células vivas. En las células muertas, el colorante difunde fácilmente hacia el citoplasma (Doyle *et al.*, 1998).

Las células se lavaron con PBS una vez y se les agregó 200 μ L de tripsina-EDTA al 0.25% (Sigma).

Al despegarse las células, se inactivó la enzima con 200 μ L de DMEM + SFB al 15%.

Se tomó una alícuota de 20 μ L de la suspensión celular y 20 μ L de azul de tripano. Se homogenizó la mezcla y se tomaron 10 μ L para contar el número de células viables en 4 campos del hemocitómetro, del que se obtuvo un promedio:

(el promedio de células) (2) (10^4) = N^o de células/mL

5.7.2 Incorporación de timidina tritiada

Para conocer la tasa de síntesis de ADN relacionada con la duplicación celular, se determinó la incorporación de timidina tritiada en cada uno de los grupos celulares antes mencionados.

A cada pozo se agregaron 500 μ L de medio DMEM con SFB inactivado que contenía 1 μ Ci/mL de timidina tritiada (NEN, USA). Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

Pasado ese tiempo se aspiró con cuidado el medio y se lavó dos veces con PBS, cuidando de no despegar a las células.

Las células se fijaron con 500 μ L de una solución con metanol al 95% + 5% de PBS y se dejaron incubando durante 15 minutos a 37 °C. Se retiró el metanol y se lavó cuidadosamente con PBS dos veces.

Se agregaron 500 μ L de NaOH 0.2N a cada pozo para hidrolizar y despegar las células adheridas y se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 37 °C.

Pasado ese tiempo, el contenido de cada pozo se transfirió a un vial que contenía 5 mL de líquido de centelleo (120g de Naftaleno, 8g de PPO, 0.4g de POPOP, 200 mL de metanol, 40 mL de etilenglicol y 2000 mL de Dioxano).

La radiactividad se cuantificó utilizando un contador de centelleo (BECKMAN LS 6500) y se reportó como cuentas por minuto, cpm de timidina tritiada incorporada/número de células.

5.7.3 Senescencia Asociada a β -galactosidasa

Se ha observado que la actividad de la hidrolasa lisosomal β -galactosidasa a pH 6, se encuentra sobreexpresada en las células senescentes. De tal modo, se le considera un marcador bioquímico de este estado. El ensayo SA β -galactosidasa se basa en la utilización del sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactosido) que es degradado por la enzima, produciendo un precipitado de color azul que se observa mediante un microscopio óptico (Dimri *et al.*, 1995).

Técnica de ensayo Senescencia Asociada a β -galactosidasa

A cada pozo se le agregaron 300 μ L de solución fijadora (paraformaldehído al 2 %, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 1.35 mM y Buffer piperazina-N, N'-bis 2-etanol-ácido sulfónico (PIPES) 0.1 M provenientes de soluciones stock a pH 6.9 y pH 8, respectivamente). Las células se incubaron 1 h a temperatura ambiente.

Pasado ese tiempo se retiró la solución y se lavó cada pozo tres veces con PBS.

Se agregaron 300 μ L de solución X-gal que contenía 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM de $K_3Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 2 mM $MgCl_2$ y 1 mg/mL de X-gal (PROMEGA). El pH se ajustó a 6.

Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, se contaron 100 células en un microscopio óptico. El total de células teñidas y no teñidas correspondieron al 100%.

Las células fijadas se almacenaron a 4 °C.

5.8 Daño al ADN por estrés oxidativo que induce la SIPS

Para la detección del daño al ADN por rompimientos de cadena sencilla, se realizó la técnica de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa. En este ensayo se reveló el daño al ADN en cada célula. Las células se embebieron en un gel de agarosa y se lisaron con detergentes que contienen concentraciones elevadas de sales. Con este tratamiento se liberó el superenrollamiento del ADN, formándose una estructura relajada llamada nucleoide. Cuando los nucleoides se colocaron en un campo eléctrico, se formó una estela que da la apariencia de un cometa, de ahí el

nombre. La longitud de la estela refleja la cantidad de daños en el ADN de cada célula (Tice, 1994).

5.8.1 Electroforesis unicelular alcalina

En el día 13 del cultivo se realizó el ensayo cometa para determinar el daño basal en el ADN, así como el originado después de someter a las células a un reto oxidativo con 0.3 mM de H₂O₂ durante 30 minutos.

La agarosa regular al 1% se disolvió en PBS libre de calcio y magnesio (Microlab) y se calentó en el horno de microondas por 30 segundos.

Cuando estuvo completamente disuelta, se tomó un volumen de 110 µL que se colocó sobre un cubreobjetos que estaba sobre el hielo. El cubreobjetos se empalmó sobre un portaobjetos completamente esmerilado (Fisher Finest). Todos los pasos para formar las capas se hicieron sobre una cama de hielo.

Aproximadamente 100 000 células de cada uno de los grupos control, GFP+ y Bcl-2+, se despegaron con tripsina-EDTA al 0.25%. La enzima se inactivó con medio DMEM completo.

La suspensión de células se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el botón se mezcló con 80 µL de agarosa LMP tibia al 0.5%, disuelta en PBS libre de calcio y magnesio (Microlab). Se tomó un volumen de 80 µL y se colocó sobre un cubreobjetos que a su vez se puso sobre el portaobjetos con la capa de agarosa regular preparada anteriormente. Se despegó cuidadosamente el cubreobjetos y a este se le agregaron otros 80 µL de la solución de agarosa LMP tibia, que se colocó de nuevo sobre el portaobjetos, quedando así la

muestra con las células entre una capa de agarosa regular y otra de agarosa LMP.

El cubreobjetos se despegó cuidadosamente. El portaobjetos con las capas de agarosa adheridos a él se colocaron en la solución de lisis que contenía NaCl 2.5 M (JT Baker), EDTA 100 mM (Sigma), Tris 10 mM (JT Baker), NaOH 10 N (JT Baker) a pH 10, más 1% de tritón (Sigma) y 10% de DMSO (Merck), que se preparó en el momento de usarse. Las preparaciones se dejaron en ésta solución durante 3 horas a 4°C.

Pasado ese tiempo, las preparaciones se colocaron en un buffer de corrida de electroforesis que contenía 45 mL de solución stock de NaOH 10 N y 7.5 mL de solución stock de EDTA (para 1.5 L) y se dejaron equilibrar durante 20 minutos.

Posteriormente, las preparaciones se colocaron en una cámara de electroforesis y se corrió a 25 volts y 300 miliamperes por 20 minutos.

Al término del corrimiento, los geles se enjuagaron en 3 ocasiones con solución de neutralización (Tris 0.4 M). Cada enjuague fue durante 5 minutos.

A cada preparación, se le agregaron 2-3 gotas de bromuro de etidio 0.1 mg/mL y se les colocó un cubreobjetos (para evitar que se deshidrataran los geles).

El daño al ADN se cuantificó midiendo la longitud de la cola del cometa entre el nucleoide en μm . Se observaron los cometas con un microscopio de fluorescencia (Olympus) equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se contaron 25 células por muestra.

Se utilizó un sistema de imágenes de video, con una cámara de alta resolución CCD y el programa VIDS IV como sistema de medición analítico.

La longitud de las colas y nucleoides se determinó directamente del monitor, con la ayuda de una escala calibrada en pantalla.

Los experimentos se realizaron por triplicado en 3 eventos independientes, de los cuales se cuantificaron 25 cometas de cada condición.

5.9 Detección de especies reactivas de oxígeno ERO por citometría de flujo

Los radicales de baja potencia que provienen de los peróxidos, se determinaron por el método de citometría de flujo mediante una prueba fluorescente. Se utilizó el fluoróforo diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), que se oxida al ceder un electrón a una molécula de peróxido dentro de la célula. La molécula oxidada emite un fotón que es detectado espectrofotométricamente a 520 nm cuando se excita a 480 nm (Esposti *et al.* 1999).

Técnica de Determinación de radicales libres

Aproximadamente 500 000 células de cada uno de los grupos celulares se despegaron con tripsina-EDTA al 0.25%. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm (CENTRA 4 IEC) durante 2 minutos a 4 °C.

El botón celular se resuspendió en 0.5 mL de PBS que contenía 25 µL de DCFH-DA a una concentración de 4 µM (stock de 100 mg en 2 mL de DMSO 1:100).

Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente para que se incorporara el fluoróforo.

Pasado ese tiempo, la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm para quitar el exceso de DCFH-DA y el botón se resuspendió en 0.5 mL de PBS.

La intensidad de fluorescencia se cuantificó dentro de los siguientes 30 minutos en el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson). El software utilizado fue CELLQUEST (Beckton Dickinson).

5.10 Tratamiento estadístico de los datos

Los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

En los experimentos de viabilidad celular, incorporación de timidina tritiada determinación de ERO y SA β -galactosidasa, se utilizó la prueba de ANOVA seguida por un análisis de varianza de Tuckey, para comparar cada uno de los datos

Para los resultados del ensayo cometa se usó el análisis de varianza Tamhane, seguido por la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

En ambos casos se manejó un nivel de probabilidad de $p < 0.05$ como criterio mínimo de significancia.

6 RESULTADOS

6.1 Parámetros de envejecimiento celular de los cultivos primarios

in vitro

La proliferación celular, y la cuantificación de la actividad de la enzima β -galactosidasa se establecieron como parámetros de envejecimiento del cultivo primario de fibroblastos de pulmón de ratón. Estos indicadores hacen referencia al comportamiento de la población celular a lo largo del tiempo del cultivo.

6.1.1 Proliferación celular

Una vez establecido el cultivo primario, lo primero que se realizó fue determinar la proliferación de células en un cultivo normal de fibroblastos primarios de pulmón de ratón. La proliferación celular se determinó cada tercer día a partir del día 7 del cultivo. Se consideró a las células viables, como aquellas que excluían el azul de tripano. En la Figura 8 se grafica el número de células a lo largo del tiempo de vida del cultivo, desde el día 7 hasta el día 27. Se observa que existe un tiempo de establecimiento del cultivo hasta aproximadamente el día 13. A partir de esta fecha, los fibroblastos muestran una fase logarítmica o de proliferación vigorosa hasta aproximadamente el día 19. A partir de este tiempo se observa que disminuyen tanto la capacidad proliferativa como el número de células, lo que sugiere que el cultivo está entrando en la etapa de senescencia replicativa.

6.1.2 Senescencia asociada a β -galactosidasa

En la Figura 9, se presentan los resultados del ensayo SA β -gal. Se aprecia que la cantidad de células teñidas como positivas senescentes aumentan conforme avanza la vida del cultivo. Se corrobora la entrada a la senescencia en el día 19 pues cambia la pendiente de la curva hasta alcanzando un 21 % de células senescentes. A partir de este momento se incrementa el número de células positivas a SA β -galactosidasa, llegando hasta el 40% el día 25 del cultivo.

6.2 Exposición a diferentes concentraciones de H_2O_2 para la inducción de senescencia prematura SIPS

Para determinar la dosis óptima para inducir la SIPS, las células se sometieron a diferentes tratamientos con 75, 150 y 200 μ M de H_2O_2 . Posteriormente se determinaron los parámetros de envejecimiento a lo largo del tiempo de cultivo.

6.2.1 Proliferación celular

Al tratar los cultivos celulares a diferentes exposiciones de estrés oxidativo, se observó una disminución acentuada de la población celular con respecto al control sin tratamiento (Figura 10).

Al utilizar las concentraciones de 150 y 200 μM de H_2O_2 . Se encontró una disminución del 65% en el número de células en comparación al número inicial de células del día 9. Con estas dosis, la disminución llegó hasta un 97% con respecto al control en el día 15. Este comportamiento puede deberse a la muerte celular ante el la exposición oxidativa.

Con el tratamiento de 75 μM de H_2O_2 , se observó un 10% menos de células desde el día 9, con respecto al número de células con las que se empezó el experimento y una disminución celular del 55% con respecto al control. A partir de este momento, se observó una entrada paulatina en la fase estacionaria, con una ligera recuperación en la proliferación celular hasta el día 15.

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el control y los tratamientos. Sin embargo, también se observa una diferencia entre las dosis mayores y la de 75 μM de H_2O_2 . Lo anterior indica que con la dosis más pequeña, se pudo obtener una población celular senescente, sin el efecto de muerte, encontrada en las otras dosis.

6.2.2 Senescencia Asociada a β -galactosidasa

En las células control, se observó un incremento paulatino en el número de células positivas al marcador de senescencia, desde un 3.5% en el día 9 hasta un 12.5% en el día 15. Sin embargo, las células tratadas con 75 y 150 μM de H_2O_2 duplicaron el número de células senescentes desde el primer día de medición con un 8% y 10 % respectivamente. En los días subsiguientes, se mantuvo esta tendencia. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre estos dos grupos a lo largo del cultivo, pero sí una diferencia entre estos dos grupos con el control (Figura 11).

Las células sometidas a 75 μM de H_2O_2 presentaron un 23% de células senescentes en el día 15, lo que corresponde a un incremento del 95% sobre el grupo control.

Por los resultados anteriores, se decidió utilizar la concentración de 75 μM de H_2O_2 como inductora de SIPS, debido a que promovió la detención en la proliferación celular, ocasionando una muerte celular mucho menor a la observada con las concentraciones de 150 y 200 μM de H_2O_2 .

Como se aprecia, se pudo recorrer el tiempo de inicio de la senescencia celular del día 19 observada en las células control, al día 15 al utilizar una concentración 75 μM de H_2O_2 . De esta manera, se decidió realizar los siguientes experimentos únicamente hasta el día 15 del cultivo celular, para que no interfirieran con la senescencia natural *in vitro* del día 19.

6.3 Sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios

Para inducir la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios se realizó una infección retroviral como se explica en la metodología.

La presencia de células fluorescentes permitió comprobar por microscopía de fluorescencia que la infección retroviral en el cultivo primario fue efectiva (Figura 12A).

Para determinar de manera directa la sobreexpresión de la proteína Bcl-2, se realizó un ensayo de inmunoanálisis por western blot en el día 15 de cultivo (Figura 12B). Las células que sobreexpresaron Bcl-2+ mostraron una expresión de la proteína siete veces mayor en comparación con las células control y el control vector GFP+.

6.4 Efecto de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios sometidos a SIPS

Se determinaron los parámetros de envejecimiento para conocer el papel protector de la proteína Bcl-2 frente a estrés oxidativo que induce la SIPS en el cultivo primario.

6.4.1 Proliferación celular

Los resultados en la Figura 13A muestran que a lo largo del cultivo no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las células control y las GFP+. Lo anterior indica que la infección retroviral no tuvo ningún efecto sobre la proliferación celular, por lo que los resultados obtenidos en los experimentos pueden atribuirse a la proteína Bcl-2.

Es interesante notar que desde el inicio de las determinaciones, las células Bcl-2+ presentaron una disminución en la proliferación celular, estadísticamente diferente con las control y las GFP+. Aún así, las células Bcl-2+ continuaron proliferando con una pendiente que indica una entrada temprana en la senescencia celular. En la Figura 13B, se aprecia el comportamiento de las células, cuando fueron sometidas a estrés oxidativo que induce la SIPS. Los tres grupos muestran una drástica disminución en el número celular. Las células control y GFP+ tienen una disminución en la población celular de un 55% en el día 9 hasta un 80 % en el día 15 con respecto a las control no tratadas. Sin embargo, las células Bcl-2+ sometidas a estrés oxidativo presentan solamente una disminución del 21% en el día 9 y un 36% en el día 15 con respecto al control no tratado. A pesar de esta disminución, la pendiente de la curva de Bcl-2+ demuestra

que las células continúan proliferando, aunque no de manera tan vigorosa como las control sin tratamiento.

Es importante hacer notar que las curvas de proliferación de las células Bcl-2+ y Bcl-2+ tratadas con H_2O_2 , muestran una pendiente similar que puede indicar que las células que expresan esta proteína, presentan una mejor sobrevivencia con actividad proliferativa, aún ante estrés oxidativo que induce la SIPS.

Este aumento se presentó de manera constante durante todo el tiempo del cultivo.

6.4.2 Incorporación de timidina tritiada

Se realizó la cuantificación de la incorporación de timidina tritiada relacionándola con la duplicación celular. En la Figura 14 se grafican las cpm/número de células a lo largo del tiempo de cultivo. Como se observa, desde el inicio del cultivo se muestra un incremento paulatino de la incorporación de timidina en los tres grupos. Sin embargo, es claro que desde el principio, las células Bcl-2+ tienen un 65% menos de incorporación de timidina con respecto a los controles. Esta diferencia se va haciendo menor hasta llegar a un 50%. Las pendientes de los controles entre los dos últimos puntos son más acentuadas que la que se observa en la curva de Bcl-2+.

6.4.3 Senescencia Asociada a β -galactosidasa

En los grupos control, Bcl-2+ y GFP+ se observó un aumento en el número de células senescentes a lo largo del tiempo del cultivo (Figura 15).

En el día 9, las células control y GFP+ presentaron 5% de células positivas al marcador de senescencia. El aumento continuó hasta un 13% al final de las determinaciones. Sin embargo, las células Bcl-2+ mostraron una mayor presencia de células senescentes desde el inicio del cultivo, 8% en el día 9 y 17% en el día 15, valores estadísticamente diferentes con los encontrados en las células control y GFP+. Al parecer la proteína pudiera tener un efecto en la inducción de senescencia en los cultivos primarios estudiados.

Cuando los tres grupos se sometieron a la concentración inductora de la SIPS 75 μ M de H₂O₂, se encontró que en cada uno había mayor presencia de células senescentes a diferencia de los grupos no tratados. A pesar de este comportamiento generalizado, el grupo de células Bcl-2+ tratadas mostró un menor número de células senescentes con respecto a lo observado en los grupos control y GFP+ tratados. En el día 15, las células Bcl-2+ presentaron 18% de células senescentes y las control y GFP+ 23%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

Lo anterior pudiera reforzar la observación de que la proteína Bcl-2 induce senescencia celular.

6.5 Efecto de la proteína Bcl-2 en el daño al ADN por estrés

oxidativo Por medio de la electroforesis unicelular alcalina se midió la relación longitud de la cauda/diámetro del nucleóide, como indicador de daño en el ADN. La longitud de la cauda se refiere al daño oxidativo visto como desarreglo en la cromatina, y por tanto laxitud en la misma.

En el día 13, se midió el daño en el ADN y se observó que los tres grupos presentaron un daño basal sin diferencia estadísticamente significativa entre ellas (Figura 16). Sin embargo, 30 minutos después de una exposición a una dosis que genera estrés oxidativo con 0.3 mM de H₂O₂, se encontró en los tres grupos un importante aumento en el tamaño de la cauda en relación con el nucleoide que corresponde al daño en el ADN. Tanto las células control como las GFP+ mostraron un incremento de 1900 y 2300% respectivamente comparado con sus grupos no tratados.

De manera sobresaliente, aunque las células Bcl-2+ también presentaron un importante aumento de daño al ADN del 1100% con respecto a las no tratadas, este fue 40% menor que en las células control tratadas. Al parecer, la presencia de la proteína Bcl-2 en las células protege en cierta medida que el daño al ADN no sea tan considerable como lo observado en las células control. Entre este grupo y las control y GFP+ existe una diferencia estadísticamente significativa.

6.6 Efecto de la proteína Bcl-2 sobre la producción de especies reactivas de oxígeno, EROs

En el día 13 de cultivo y por medio de la técnica de citometría de flujo, se determinó la presencia de las ERO del tipo de superóxidos. La unidad que indica su presencia se conocen como de intensidad de fluorescencia (F=intensidad de fluorescencia x % gated).

Las células control y GFP+ mostraron una intensidad de fluorescencia IF aproximadamente de 25. De forma sobresaliente, en las células Bcl-2+ se detectó un considerable aumento de estas ERO con una IF de 200, lo que equivale a un aumento de 800 veces la expresión de estos radicales.

Sin embargo, 6 días después del tratamiento oxidativo que indujera la SIPS, no se encontró de manera general un aumento en la producción de peróxidos. Entre cada uno de estos grupos no hubo diferencia estadísticamente significativa (Figura 17).

Cabe subrayar que aunque no hay diferencia en cuanto a la presencia de peróxidos, entre las células tratadas y no tratadas de los grupos control y GFP+, sí la hay entre las células Bcl-2+ tratadas y las no tratadas, pues estas últimas presentan una reducción considerable del 76% de intensidad de fluorescencia. De manera que la proteína Bcl-2 tiene efecto inductor de EROs en las células.

7 DISCUSION

El envejecimiento está relacionado con el daño oxidativo generado a lo largo de la vida de un organismo (Harman, 1956). No obstante, a nivel celular el estrés oxidativo en concentraciones subletales puede inducir la aparición de células senescentes (Chen *et al.*, 2000).

Se ha reportado que la senescencia celular *in vitro* que se observa en los cultivos, y la senescencia *in vivo* presente en los organismos, muestran un fenotipo celular similar con expresión de algunos genes en común. Aunque se ha sugerido que los mecanismos para adquirirlas son diferentes. Sin embargo, por estudios con microarreglos, se propone que la senescencia *in vivo* tiene mayor semejanza con la observada en la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) en los cultivos *in vitro* (Lundberg *et al.*, 2000). Por estas razones, en la presente investigación se utilizaron como modelo, los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón, a los que se les indujo la SIPS. Este sistema aporta información interesante para el estudio del envejecimiento, considerando que las células provienen de un organismo y no de una línea celular. Además de que las células inducidas a SIPS presentan un fenotipo similar a la senescencia que ocurre en los organismos conforme envejecen.

El primer dato a determinar, fue conocer el momento en el que un cultivo primario normal de fibroblastos de pulmón llega a la senescencia celular. A este respecto, se encontró que el límite de Hayflick para este tipo celular, comienza el día 19 del cultivo, con una disminución de la proliferación celular que coincidió con un incremento en el número de células positivas al marcador de senescencia β -galactosidasa (Konigsberg *et al.*, 2004).

Con base en este dato, se utilizaron diferentes concentraciones de H₂O₂ para lograr la inducción de senescencia prematura. Se encontró que la mejor dosis para SIPS era 75 μM de H₂O₂ por 2 horas, en comparación con las dosis de 150 y 200 μM de H₂O₂, en las que se observó mayor proporción de muerte celular. Con dicha dosis inductora de SIPS, se logró recorrer la senescencia celular de manera prematura en un 34%, esto es, del día 19 al día 15 del cultivo.

Estudios recientes le han atribuido un papel importante a la proteína Bcl-2 en la protección celular contra el estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2001; Kowaltowski *et al.*, 2004; Jang y Surh, 2004; Tang *et al.*, 2005). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue conocer si la presencia de la proteína Bcl-2 en las células sometidas a SIPS podía retrasar o evitar que el cultivo entrara en senescencia. Para ello, se sometieron los cultivos a una infección retroviral para sobreexpresar dicha proteína. Es importante mencionar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles sin infección y las células control-vector que sólo expresaban la proteína GFP, de manera que se demostró que la infección por sí misma no tuvo un efecto significativo, y los resultados observados obedecen únicamente a la presencia de la proteína Bcl-2.

Se determinó el efecto de la sobreexpresión de la Bcl-2 sobre la proliferación celular en cultivos control (sin SIPS), y se encontró que las células que sobreexpresaban la proteína tuvieron una disminución en la tasa de crecimiento, con una curva que presentó una entrada temprana del límite de Hayflick o de senescencia celular, en comparación con los controles. Estos datos concuerdan con los experimentos realizados con

incorporación de timidina tritiada, en donde se detectó disminución de la síntesis de ADN en el cultivo Bcl-2+.

Así mismo, al determinar el número de células positivas al marcador de senescencia β -galactosidasa, se cuantificó un mayor porcentaje de células senescentes en las células Bcl-2+. Todo lo anterior sugiere fuertemente que la proteína Bcl-2 promueve la aparición de células senescentes, con detención del ciclo celular de manera irreversible. Nuestros resultados son apoyados por estudios recientes en los que se ha encontrado que la sobreexpresión de la Bcl-2 puede intervenir en el ciclo celular incrementando los niveles de p27 como de p130 (Bonney-Berard *et al.*, 2004) y que puede inducir la quiescencia en una línea celular (Vairo *et al.*, 2000) o la senescencia en células tumorales (Crescenzi *et al.*, 2003).

Al someter a los cultivos a SIPS, se encontró que los grupos control, control-vector GFP+ y Bcl-2+ tuvieron una disminución en el número de células durante la proliferación celular. Este detrimento se debió posiblemente, a la muerte celular por el efecto del oxidante. Sin embargo, esta disminución fue solamente del 36% en el cultivo Bcl-2+ con respecto al control no tratado, manteniendo aunque de manera lenta, una tendencia proliferativa. Este dato apoya el hecho de que la sobreexpresión de la Bcl-2 protege de la muerte celular a las células sometidas a estrés oxidativo, confirmando los datos reportados por Godley colaboradores (2002).

Los resultados anteriores indican que la sola sobreexpresión de la proteína Bcl-2 puede conducir a las células a un estado senescente, pero que al mismo tiempo las protege de la muerte por estrés oxidativo.

Cuando las células Bcl-2+ fueron sometidas a SIPS, no se observó que se evitara la senescencia, pero sí se encontró una mejor sobrevivencia celular.

Debido a que algunos investigadores han propuesto que la Bcl-2 puede actuar como prooxidante induciendo la presencia de ERO, decidimos realizar la determinación de las especies reactivas presentes en las células que sobreexpresaban la Bcl-2, pensando que posiblemente esta fuera una causa para la inducción de senescencia. La presencia de las especies reactivas del tipo de los peróxidos, se cuantificó por citometría de flujo en los tres grupos, y se encontró que el cultivo Bcl-2+ tenía 800 veces más ERO que los cultivos control. Sin embargo, cuando las células se sometieron a SIPS, las células Bcl-2+ mostraron 76% menos de ERO con respecto a las no tratadas. Estos resultados indican que efectivamente, al parecer la proteína Bcl-2 es una molécula prooxidante que favorece la producción de ERO. Esta situación puede alertar a la célula para que active sistemas antioxidantes y/o de reparación, que le permitan una mejor sobrevivencia como lo observamos en nuestros experimentos.

Si bien encontramos que la proteína Bcl-2 promueve en la célula una mejor adaptación contra el estrés oxidativo aún sin retrasar la senescencia celular, era importante conocer si esta protección se estaba reflejando en la integridad del ADN, y por lo tanto en su función que pudiera explicar la protección conferida por esta molécula (López-Diazguerrero *et al.*, 2005). A pesar de que existen algunos mecanismos de reparación del ADN nuclear (Mecocci *et al.*, 1993) y reparación del ADN mitocondrial (ADNmit) (Bohr, 1998), los radicales libres pueden causar daños estructurales como mutaciones de pares de bases, rearrreglos, deleciones, inserciones y amplificaciones de secuencia; así como rompimientos de ADN.

Mediante el ensayo cometa se encontró que en el día 13 las células control, GFP+ y Bcl-2+ mostraron un daño basal que corresponde el estado en que

se encontraba el ADN. Sin embargo, tras someter a los tres grupos a una exposición aguda con 0.3 mM de H₂O₂ se observó un daño muy elevado en las células control y control-vector, pero no de tal magnitud como la observada en las Bcl-2 que presentaron menor daño con diferencia significativa. Estos datos corroboran la protección que confiere la proteína Bcl-2 a las células a nivel del ADN ante un estrés oxidativo.

Con lo anterior, pudiera pensarse que la proteína Bcl-2 es una molécula multifuncional que participa en la sobrevivencia celular.

Pareciera que en los organismos la Bcl-2 responde al estrés oxidativo para proteger a la célula de los daños que estos oxidantes puedan causarle; de ahí que se observe el incremento de esta proteína en los organismos envejecidos.

Se desconocen los mecanismos por los que se lleva a cabo esta protección. Nuestros datos demuestran que la proteína Bcl-2 pudiera actuar de manera importante en la preservación de la supervivencia celular.

Este trabajo se aportaron algunos datos que contribuyen al esclarecimiento del papel de la proteína Bcl-2 en la SIPS y su posible asociación con el envejecimiento:

1. La Bcl-2 puede comportarse como una molécula prooxidante, induciendo la generación de ERO que permita encender los mecanismos antioxidantes de la célula. Como si la Bcl-2 tuviera un efecto parecido al de una vacuna, permitiendo que la célula esté mejor preparada para afrontar un estrés oxidativo de mayor magnitud.

2. El aumento de los niveles de ERO causados por la Bcl-2, puede conducir al retraso de la progresión del ciclo celular, de manera paralela con la inducción de la senescencia prematura. Es posible que este mecanismo sea dependiente de moléculas del ciclo celular como la p27 y p130 que se ha reportado son mediadas por la Bcl-2 (Vairo *et al.*, 2000). El que sea más lento el ciclo celular puede permitir a las células invertir más energía y recursos en repararse.
3. La proteína Bcl-2 confiere una protección contra el daño por estrés oxidativo en la estructura global del ADN, como se demostró en los ensayos cometas. Esto podría estar relacionado con protección contra alteraciones epigenéticas y podría ser parte de su función como una molécula de supervivencia.

Al parecer, la concentración endógena de la proteína Bcl-2 es parte del conjunto de proteínas de la célula que influyen en la "decisión" celular de entrar a un estado de sobrevivencia por senescencia y no de muerte celular. Es decir, si se favorecen los niveles de la proteína Bcl-2 se evitaría que las células se encontraran en la disyuntiva de continuar con la vía de la reparación o con la proliferación celular.

Sin embargo, un incremento exógeno en los niveles de la Bcl-2 (como el que se realizó en este trabajo) con aumento en las ERO, puede inducir la senescencia prematura con detención del ciclo celular de manera permanente.

8 CONCLUSIONES

- Se logró inducir de manera prematura la senescencia con H₂O₂, SIPS, en un cultivo primario de fibroblastos de pulmón de ratón. Adelantando de esta manera la senescencia en un 34%. Lo anterior es importante, puesto que este modelo, no nada más anticipa la senescencia, sino que el fenómeno de SIPS es en realidad más parecido a lo que ocurre *in vivo*. Además de que dicho modelo puede emplearse para estudiar otros fenómenos como el cáncer.
- La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 por si misma, retrasó la tasa de proliferación celular e indujo la entrada prematura a la senescencia. Esto fue corroborado por el aumento en el número de células positivas a β-galactosidasa.
- La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 mostró un efecto protector en cuanto al mantenimiento de la estructura del ADN, frente a una exposición oxidativa aguda con 0.3 mM de H₂O₂.
- Las células Bcl-2+ sometidas a la dosis subletal que induce SIPS, mostraron mejor viabilidad y sobrevivencia celular, que las células control y GFP+. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína Bcl-2, no evitó que los cultivos se transformaran en senescentes.
- La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 indujo un aumento transitorio en la expresión de especies reactivas de oxígeno. Es posible que el cambio en el estado redox de la célula pudiera favorecer la activación de los sistemas de defensas antioxidantes y al mismo tiempo inducir algunos factores de transcripción relacionados con la regulación del ciclo celular.

9 PERSPECTIVAS

- Debido al efecto que tiene la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en la inducción de senescencia, se pretende realizar determinaciones por citometría de flujo para conocer la etapa del ciclo celular en que se encuentran las células Bcl-2+.
- Como se ha reportado que la proteína Bcl-2 induce el aumento de los inhibidores del ciclo celular p27 y p130, se propone estudiar la expresión de estas dos moléculas en nuestro modelo.
- La hipótesis de que el daño oxidativo cambia la expresión génica para inducir senescencia celular o envejecimiento, nos lleva a la idea de estudiar modificaciones epigenéticas, específicamente metilaciones, en las células Bcl-2+.
- Se ha visto que la proteína Bcl-2 induce quiescencia en líneas celulares humanas no tumorales. Sin embargo, en este trabajo y en el realizado por Crescenzi (2003) se reporta que induce senescencia en células primarias de ratón y en células de carcinoma humano respectivamente. Al parecer, el punto en común entre estos modelos es la presencia de la enzima telomerasa. Por otro lado, se ha visto que las células que sobreexpresan telomerasa y son sometidas a un daño oxidativo que causa apoptosis, se convierten en senescentes. Por lo anterior, se sugiere estudiar la relación entre la proteína Bcl-2 y la enzima telomerasa, que pudieran en conjunto ser moléculas de sobrevivencia celular ante estrés oxidativo, favoreciendo la senescencia celular.

10 REFERENCIAS

1. Adams, J.M., Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281(5381):1322-6. Review.
2. Allen, R. G., Tresini, M., Keogh, B. P., Doggett, D. L., Cristofalo, V. (1999) Differences in electron transport potential, antioxidant defences, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J Cell Physiol*. 180(1):114-22.
3. Ames, B.M, Signage, M.K, Hagen, T.M: (1990) Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:7915-7922.
4. Amstad, P. A., Liu, H., Ichimiya, M., Berezsky, I. K., Trump, B. F., Buhimschi, I. A., Gutierrez, P. L. (2001) Bcl-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production. *Redox Rep*. 6(6):351-62.
5. Bazan, N. G., Marcheselli, V. L., Cole-Edwards, K. (2005) Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signalling. *Ann N Y Acad Sci*. 1053:137-47.
6. Belanger, S., Cote, M., Lane, D., L'Esperance, S., Rancourt, C., Piche, A. (2005) Bcl-2 decreases cell proliferation and promotes accumulation of cells in S phase without affecting the rate of apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol*. 97(3):796-806.
7. Ben-Porath, I., Weinberg, R. A. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(5):961-76.

8. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chio, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., Wrigth, W. E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
9. Bohr, V., Anson, R., M, Mazur, S., Dianov, G. (1998) Oxidative DNA damage processing and changes with aging. *Toxicol Lett.* 102-103:47-52
10. Bonnefoy-Berard, N., Aouacheria, A., Verschelde, C., Quemeneur, L., Marcais, A., Marvel, J. (2004) Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta.* 1644(2-3):159-68.
11. Borner, C. (1996) Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. *J Biol Chem* 271(22):12695-12698.
12. Bradford, M. (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.
13. Bree, R. T., Stenson-Cox, C., Grealy, M., Byrnes, L., Gorman, A. M., Samali, A. (2002) Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontol* 3:195-206.
14. Campisi, J. (1992) Gene expression in quiescent and senescent fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 663:195-201.
15. Campisi, J. (1997) Aging and cancer: the double-edge sword of replicative senescence. *J Am Geriatr Soc* 45:482-488.
16. Campisi, J. (2000) Cancer, aging and cellular senescence. *In vivo* 14:183-188.
17. Carrel, A. (1912) On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Ep Med* 15:516-528.

- 18.Chainiaux, F., Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J., Toussaint, O. (2002) UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(11):1331-9.
- 19.Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S., Linskens, M. H. K. (2001) Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 265: 294-303
- 20.Chen, Q., Fisher, A., Reagan, J.D., Yan, L., Ames, B. N. (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblasts cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4337-4341.
- 21.Chen, Q.M., Liu, J., Merret, J.B. (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.
- 22.Cooper, G. (2000) The cell. A Molecular Approach. Second Edition. ASM Press.
- 23.Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ (2003) Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem J* 375:263-274.
- 24.Cristofalo, V., Allen, R. G., Pignolo, R. J., Martin, B. G., Beck, J. C. (1998). Relation between donor age and the replicative life-span of human cells in culture: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9362-9367.
- 25.Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 17
- 26.Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler R., Kroemer, G (1997) Bcl-2 and Bcl-XL antagonize

- the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* 57(1):62-7.
27. 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.
28. Deng, X., Gao, F., May, W. S. (2003) Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood.* 2003 102(9):3179-85.
29. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., Campisi, J. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 92:9363-9367.
30. Dispersyn, G., Nuydens, R., Connors, R., Borgers, M., Geerts, H. (1999) Bcl-2 protects against FCCP-induced apoptosis and mitochondrial membrane potential depolarization in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1428(2-3):357-71.
31. Doyle, A., Griffiths, J.S., Newell, D.G., (1998), *Cell & Tissue, Culture: Laboratory & Procedures*, Ed. John Wiley & Sons, New York, 4B:7.
32. Dumont, O., Burtonj, M., Chen, Q., Gonos, E., Frippiat, T., Mazarati, J., Eliaers, F., Remacle, J., Toussaint, O. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sub lethal oxidative stresses in normal human fibroblasts. *Free Rad Biol Med* 28(3):361-373.
33. Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Park, S. M., Holleran, A. L., Murphy, A. N., Fiskum, G., Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Bredesen DE. Related Articles, Links (1996) Shift of the cellular oxidation-reduction

- potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem* 67(3):1259-67.
34. Espejel, S. Blasco, M. A. (2002). Identification of telomere-dependent "senescence-like" arrest in mouse embryonic fibroblasts. *Exp Cell Res* 276(2):242-8.
35. Esposti, D., Hatzinisiriou, I., McLennan, H. (1999) Bcl-2 and mitochondrial oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 274(42): 29831-29837.
36. Fahn, S., Cohen, G. (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* 32(6):804-12.
37. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A. W., Querido, E., McCurrach, M. E., Hannon, G. J., Lowe, S. W. (2002) Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol.* 22(10):3497-508.
38. Fleury, C., Mignotte, B., Vayssiere, J. L. (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. *Biochimie.* 84(2-3):131-41.
39. Fraga, C. G., Shinenaga, M.K, Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:4533-4537.
40. Godley, B. F., Jin, G. F., Guo, Y. S., Hurst, J. S. (2002) Bcl-2 overexpression increases survival in human retinal pigment epithelial cells exposed to H₂O₂. *Exp Eye Res.* 74(6):663-9.
41. 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.
- 42.Green, D. R., Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281(5381):1309-12.
- 43.Halliwell B. (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* 70(6):737-57.
- 44.Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300.
- 45.Hawkins, C.J., Vaux, D. L. (1994) Analysis of the role of Bcl-2 in apoptosis. *Immunol Rev.* 142:127-39. Review.
- 46.Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid stains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- 47.He, H., Lam, M., McCormick, T.S., Distelhorst, C.W. (1997) Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol.* 138(6):1219-28.
- 48.Hochman, A., Sternin, H., Korsmeyer, S., Ziv, I., Melamed, E., Offen, D. (1998) Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J. Neurochem.* 71: 741- 748.
- 49.Hockenbery, D.M., Oltavi, Z., Ying, X., Milliman, C., Korsmeyer, S. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251.
50. Huang, D., O'Reilly, L., Strasser, A., Cory, S. (1997) The antiapoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J.* 16 (15):4628-4638.

51. Hutter, E., Unterluggauer, H., Uberall, F., Schramek, H., Jansen-Durr, P. (2002) Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signalling and oxidative stress. *Exp Gerontol.* 37(10-11):1165-74.
52. Ishii, T., Sakurai, T., Usami, H., Uchida, K. (2005) Oxidative modification of proteasome: identification of an oxidation-sensitive subunit in 26 S proteasome. *Biochemistry.* 44(42):13893-901.
53. Jang, J. H., Surh, Y. J. (2004) Bcl-2 protects against Abeta (25-35)-induced oxidative PC12 cell death by potentiation of antioxidant capacity. *Biochem Biophys Res Commun.* 320(3):880-6.
54. Kaufmann, J., Bickford, P., Tagliamonte, 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.
55. Kluck, R. M., Bossy-Wetzler, E., Green, D. R., Newmeyer, D.D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997 (5303):1132-6.
56. Konigsberg, M., López-Díazguerrero, N. E., Aguilar, M. C., Ventura, J. L., Gutierrez-Ruiz, M. C., Zentella, A. (2004). Senescent phenotype achieved in vitro is indistinguishable, with the exception of Bcl-2 content, from that attained during the in vivo aging process. *Cell Biol Intern.* 28:641-651.
57. Kowaltowski, A. J., Fenton, R. G., Fiskum, G. (2004) Bcl-2 family proteins regulate mitochondrial reactive oxygen production and protect against oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 37(11):1845-53.

58. Kufe, D., Pollock, R., Weichselbaum, R., Bast, R., Gansler, T., Holland, J., Frei, E. (2003) *Holland-Frei CANCER MEDICINE 6*. American Cancer Society. BC Decker Inc.
59. Lee, M., Hyun, D.H., Marshall, K.A., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Jenner, P., Halliwell, B. (2001) Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defences, and the proteasome. *Free Radic Biol Med.* 31(12):1550-9.
60. Liu, J., Johnson, R.M., Traweek, S.T. (1993) Rearrangement of the Bcl-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. *Diagn Mol Pathol.* 2(4):241-7.
61. Longo, V., Ellerby, L., Bredesen, D., Valentine, J., Gralla, E. (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell Biol.* 137(7): 1581- 1588.
62. Lopez-Diazguerrero, N. E., Luna-Lopez, A., Gutierrez-Ruiz, M. C., Zentella, A., Konigsberg, M. (2005) Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice. *Life Sci.* 77(22):2840-54.
63. López-Diazguerrero, N. E., López-Araiza, H., Bucio, L., Cárdenas-Aguayo, M. C., Ventura, J. L., Covarrubias, L., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Zentella, A., Konigsberg, M. (2005) Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Rad Biol Med.* Aceptado noviembre 2005.
64. Lopez-Torres, M., Perez-Campo, R., Cadenas, 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(3-4):757-63.

65. Lundberg, A. S., Hahn W. C., Gupta, P., Weinberg, R. A. (2000) Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol.* 12(6):705-9. Review.
66. Manome, Y., Weichselbaum, R.R., Kufe, D.W., Fine, H.A. (1993) Effect of Bcl-2 on ionizing radiation and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced internucleosomal DNA fragmentation and cell survival in human myeloid leukemia cells. *Oncol Res.* 5(3):139-44.
67. Marnett, L.J., Hurd, H.K., Hollstein, M.C., Levin, D.E., Esterbauer, H., Ames, B.N. (1985) Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104. *Mutat Res.* 148(1-2):25-34.
68. Martin, G. M., Austad, S. N., Johnson, T.E. (1996) Generic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Genetics* 113:25-34.
69. Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koomtz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C., Beal, M.F. (1993) *Ann Neurol* 34:609-616.
70. Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I., Halloran, K. M., Grimm, P., Schmidt, B. M., Halloran, P. F. (2003) Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int.* 2003 Jun;63(6):2134-43.
71. Migheli, A., Cavall, P., Piva, R., Giordana, M., Schiffer, D. (1994) Bcl-2 protein expression in aged brain and neurodegenerative diseases. *Neuroreport* 5 (15):1906-8.
72. Mirkovic, N., Voehringer, D.W., Story, M.D., McConkey, D.J., McDonnell, T.J., Meyn, R.E. (1997) Resistance to radiation-induced

- apoptosis in Bcl-2-expressing cells is reversed by depleting cellular thiols. *Oncogene*. 15(12):1461-70.
73. Mondello, C., Petropoulou, C., Monti, D., Gonos, E. S., Franceschi, C., Nuzzo, F. (1999) Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Exp Cell Res*. 248(1):234-42.
74. Myers, K., Fiskum, G., Liu, Y., Siemmens, J., Bredesen, D., Murphy, A. (1995) Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability. *J. Neurochem*. 65: 2432-2440.
75. 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(8):741-7.
76. Reed, J.C. (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 17(25):3225-36. Review.
77. Rimpler, M.M., Rauen, U., Schmidt, T., Moroy, T., de Groot, H. (1999) Protection against hydrogen peroxide cytotoxicity in rat-1 fibroblasts provided by the oncoprotein Bcl-2: maintenance of calcium homeostasis is secondary to the effect of Bcl-2 on cellular glutathione. *Biochem J*. 340 (Pt 1):291-7.
78. Rincheval, V., Renaud, F., Lemaire, C., Godefroy, N., Trotot, P., Boulo, V., Mignotte, B., Vayssiere, J.L. (2002) Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 298(2):282-8.
79. Roberfroid, M.B., Buc, C.P. (1995) Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

80. Robertson, K.A., Hill, D.P., Xu, Y., Liu, L., Van Epps, S., Hockenbery, D.M., Park, J.R., Wilson, T.M., Kelley, M.R. (1997) Down-regulation of apurinic/aprimidinic endonuclease expression is associated with the induction of apoptosis in differentiating myeloid leukemia cells. *Cell Growth Differ.* 8(4):443-9.
81. 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.
82. Serrano, M., Blasco, M. A. (2001) Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol.* 13(6):748-53. Review. Erratum in: *Curr Opin Cell Biol* 2002 Feb;14(1):123.
83. Schindowski, K., Leutner, S., Muller, W., Eckert, A. (2000) Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes. *Neurobiol Aging*, 21(5): 661-70.
84. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(4): 1455- 1459.
85. 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.
86. Steinert, S., Shay, J., Wright, W. (2000) Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res* 273:1095-1098.

87. Steinman, H. (1993) The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J. Biol. Chem.* 270(8):3487-3490.
88. Suzuki, K., Mori, I., Nakayama, Y., Miyakoda, M., Kodama, S., Watanabe, M. (2001) Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res.* (1 Pt 2):248-253.
89. Tang, X. Q., Feng, J. Q., Chen, J., Chen, P. X., Zhi, J. L., Cui, Y., Guo, R. X., Yu, H. M. (2005) Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: Mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res.* 1057(1-2):57-64.
90. Tice, R. (1994) The single cell gel/comet assay: a microgel electroforetic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. Laboratory systems. USA.
91. Tombor, B., Rundell, K., Oltvai, Z.N. (2003) Bcl-2 promotes premature senescence induced by oncogenic Ras. *Biochem Biophys Res Commun.* 303(3):800-7.
92. Toussaint O, Medrano EE, Von Zglinicki T (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35: 927-945.
93. Tsujimoto, Y., Bashir, M.M., Givol, I., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C. M. (1987) DNA rearrangements in human follicular lymphoma can involve the 5' or the 3' region of the Bcl-2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(5):1329-31.
94. Vairo, G., Soos, T.J., Upton, T.M., Zalvide, J., DeCaprio, J.A., Ewen, M.E., Koff, A., Adams, J.M. (2000) Bcl-2 retards cell cycle entry

- through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol.* 20(13):4745-53.
95. Voehringer, D.W., Meyn, R.E. (2000) Redox aspects of Bcl-2 function. *Antioxid Redox Signal.* 2(3):537-550.
96. Von Zglinicki, T., Burkle, A., Kirkwood, T.B. (2001) Stress, DNA damage and ageing: an integrative approach. *Exp Gerontol.* 36(7):1049-62.
97. Wallace, D.C., Ye, J.H., Neckelman, S.N., Singh, G., Webster, K.A., Greenberg, B.D. (1987) *Curr Genet* 12:81-90.
98. Wang, E. (1995) Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55(11):2284-92.
99. Warner, H., Hodes, R., Pocinki, K. (1997) What does cell death have to do with aging? *JAGS* 45:1140-1146.
100. Winter, J.N., Andersen, J., Reed, J.C., Krajewski, S., Variakojis, D., Bauer, K.D., Fisher, R.I., Gordon, L.I., Oken, M.M., Jiang, S., Jeffries, D., Damer, P. (1998) Bcl-2 expression correlates with lower proliferative activity in the intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas: an Eastern Cooperative Oncology Group and Southwest Oncology Group cooperative laboratory study. *Blood.* 91(4):1391-8.
101. Wright, W. E., Shay, J. W. (2001) Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Op Genet Develop* 11:98-103.
102. Yang, L., Matthews, R., Schulz, B., Klockgether, T., Liao, A., Martinou, J., Penney, J., Hyman, B., Beal, F. (1998) 1-methyl-4-

- phenyl- 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J. Neurosci.* 18(29): 8145- 8152.
103. Zha, H., Reed, J.C.(1997) Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells *J Biol Chem.* 272(50):31482-8.
104. Zhong, L. T., Sarafian, T., Kane, D. J., Charles, A. C., Mah, S. P., Edwards, R. H., Bredesen, D. E. (1993) Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(10):4533-7.
105. Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., Bishop, J.M. (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 12(19):2997-3007.
106. Zhu, L., Ling, S., Yu, X. D., Venkatesh, L. K., Subramanian, T., Chinnadurai, G., Kuo, T. H. (1999) Modulation of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis by Bcl-2. *J Biol Chem.* 274(47):33267-73.