



Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

La inhibición del ciclo celular y el cambio en el estado redox como factores determinantes durante el establecimiento del fenómeno de senescencia en fibroblastos de ratón.

TESIS

Para obtener el grado de Doctor en Biología Experimental

Presenta

M.B.E Francisco Triana Martínez

Comité tutorial:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dra. Viviana Isabel Pérez Montes

México D.F, de julio del 2014

Comité tutorial

Directora

Dra. Mina Konigsberg Faintein
Universidad autónoma metropolitana-unidad Iztapalapa
Depto. Ciencias de la salud
Laboratorio de bioenergética y envejecimiento celular
Tel. 52-55-58044732
e-mail. mkf@xanum.uam.mx

Asesores

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Universidad autónoma metropolitana-unidad Iztapalapa
Depto. Ciencias de la salud
Laboratorio de fisiología celular
Tel. 52-55-58046451
e-mail. gomezquiroz@gmail.com

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Universidad autónoma metropolitana-unidad Iztapalapa
Depto. De biotecnología
Tel. 52-55-58046453
e-mail. fjfp@xanum.uam.mx

Dra. Viviana Isabel Pérez Montes
Oregon State University, Corvallis, OR, USA.
Department of Biochemistry & Biophysics.
Tel. 541-737-9551
e-mail. Viviana.Perez@oregonstate.edu

Esta investigación fue realizada en:

- Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa está avalado como posgrado de alto nivel en el programa nacional de posgrados del CONACYT, con número de registro UAMI-309-0 y con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Los estudios de doctorado de Francisco Triana Martínez fueron realizados con el apoyo de una beca otorgada por CONACYT, con el número **de registro:** 268632/224688

Los abajo firmantes, miembros del jurado, asignados por la división de ciencias biológicas y de la salud de la universidad autónoma metropolitana, unidad Iztapalapa, aprobaron la tesis titulada ***“Arresto en la proliferación celular y estado redox pro-oxidante como parte de diferentes etapas durante el establecimiento del fenómeno de senescencia en fibroblastos de ratón”***

México DF. A Julio de 2014

El jurado designado por la división de ciencias biológicas y de la universidad autónoma metropolitana, unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Arresto en la proliferación celular y estado redox pro-oxidante como parte de diferentes etapas durante el establecimiento del fenómeno de senescencia en fibroblastos de ratón”

Presentada por

M.B.E Francisco Triana Martínez

Comité tutorial

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Dra. Viviana Isabel Pérez Montes

Jurado

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Dra. Norma Edith López Díaz-guerrero

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dra. Rebeca López Marure

Dedicatoria

A mi esposa Eréndira, mi compañera de vida. A mi familia, Francisco, Margarita y Alexis.

A la Dra Mina excelente científica y persona. A búho y Don Rubelio. A mis amigos, Omar, Robert, Rulo y Dany.

Agradecimientos

A la Dra Mina Konigsberg Fainstein por su guía y apoyo. A mí familia por su amor, a Eréndira por ser mi compañera de vida, a Cristina Márquez, Dr. Luis Gómez Quiroz y Blanca Salazar por sus consejos. A mis compañeros de laboratorio.

Summary

Senescence phenotype can be achieved by multiple pathways. Most of them involve the activation of negative cell cycle regulators as well as a shift to an oxidative status. However, the exact participation of these events in senescence establishment and maintenance is not completely understood. In this study we investigated the content of three final cell cycle regulators, as well as the redox state in some critical points during the pre-senescent and the full senescent states. The results highlight the existence of a critical pre-phase in senescent phenotype establishment, in which cell proliferation stops with the participation of the cell cycle inhibitors, and a second maintenance stage where the exacerbated pro-oxidant state inside the cell induces the physiological decline characteristic in senescent cells.

Resumen

El fenotipo senescente se puede adquirir por múltiples vías y en respuesta a diversos estímulos. La mayoría de estos incluyen la activación de reguladores negativos del ciclo celular, así como un cambio crítico en el estado redox. Sin embargo la exacta participación de estos eventos durante el establecimiento y el mantenimiento de senescencia no está totalmente entendida. Durante este estudio se investigó el contenido de tres reguladores negativos del ciclo celular, así como el estado redox en puntos críticos durante pre-senescencia y durante la senescencia completa. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una fase previa durante el establecimiento del fenotipo senescente, en la cual la proliferación celular se detiene con la participación de los reguladores negativos del ciclo celular, así como una segunda etapa en donde un estado pro-oxidante exacerbado dentro de la célula induce el deterioro fisiológico característico de las células senescentes.

Índice

1. Introducción.....	(1)
1.1. Hayflick y Harman (estudios seminales).....	(1)
1.2. Senescencia, características principales.....	(2)
1.3. Senescencia y DDR.....	(2)
1.4. Senescencia y ciclo celular.....	(3)
1.4.1. p16.....	(4)
1.4.2. p21.....	(5)
1.4.3. p27.....	(6)
2. Antecedentes.....	(7)
2.1. p16, p21 y p27 durante senescencia.....	(7)
2.2. Ciclo celular y senescencia.....	(8)
2.3. Estado redox y senescencia.....	(8)
3. Justificación.....	(10)
4. Pregunta a responder.....	(12)
5. Hipótesis.....	(12)
6. Objetivo General.....	(12)
6.1. Objetivos particulares.....	(12)
7. Diseño experimental y protocolos.....	(13)
7.1. Modelo experimental.....	(13)
7.2. Obtención del cultivo de fibroblastos de pulmón de ratón.....	(13)
7.3. Sembrado del cultivo para la evaluación del modelo.....	(14)
7.4. Inducción de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS).....	(14)
7.5. Proliferación celular.....	(14)
7.6. Síntesis de ADN (incorporación de timidina tritiada).....	(15)
7.7. Actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia.....	(15)

7.8. Diseño experimental.....	(16)
7.9. Inmunoblot de p21, p16 y p27.....	(16)
7.10. Cuantificación de GSH/GSSG.....	(17)
7.11. Inmunoblot y cuantificación de grupos carbonilos (DNP).....	(18)
7.12. Diseño experimental para el uso del antioxidante (trolox).....	(18)
7.13. Tratamiento de los datos.....	(19)
8. Resultados.....	(19)
8.1. Evaluación del modelo.....	(19)
8.2. Evaluación de los reguladores negativos del ciclo celular durante senescencia y pre-senescencia.....	(26)
8.3. Estado redox durante senescencia y pre-senescencia.....	(28)
8.4. Efecto del tratamiento antioxidante sobre la inducción de senescencia.....	(32)
9. Discusión.....	(37)
10. Conclusiones.....	(41)
11. Perspectivas.....	(42)
12. Referencias.....	(43)
13. Artículo.....	(54)

1. Introducción

1.1 Hayflick y Harman (estudios seminales).

El primer reporte sobre la existencia de la senescencia replicativa fue publicado por Hayflick y Moorehead en 1961 [1]. En su estudio, pretendían hacer migrar un virus de células ya transformadas a células normales, para provocar cáncer por la exposición de unas células a otras. Sin embargo, su objetivo nunca pudo cumplirse, ya que los cultivos primarios de células normales (fibroblastos de humano) dejaban de dividirse después de determinados pasajes. Aunado a esta detención del ciclo celular, las células presentaban

un fenotipo característico al que denominaron “*envejecido*” [1]. A este número de divisiones se le denominó “*límite de Hayflick*” y fue el primer reporte que ofrecía una explicación al envejecimiento a nivel celular.

En 1956, se publicó otra teoría importante sobre el envejecimiento, esta vez el autor fue Harman y su teoría del envejecimiento incluía la acción parcial o total de radicales libres. En esta teoría se proponía la participación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) que dañaban al ADN y otras biomoléculas, y que este daño era acumulativo [2]. Harman sugería que el daño oxidante podía ser un factor de importancia en la progresión del envejecimiento y las enfermedades asociadas a él. No obstante, tuvieron que pasar algunas décadas para que estas ideas fueran retomadas y se relacionaran con la senescencia. La relevancia de sus afirmaciones se comprobaría posteriormente. Ahora es ampliamente aceptado que el estrés oxidante induce senescencia celular de manera prematura e irreversible (SIPS) [3, 4, 5] y que es un factor causal de la carcinogénesis [6, 7, 8].

1.2 Senescencia, características principales.

En el presente, las células senescentes ya han sido mejor estudiadas. Su característica principal es que mantienen detenido su ciclo celular de manera irreversible entre la fase G0 y G1 del ciclo, sin embargo, el fenotipo senescente completo, así como la irreversibilidad del estado, nos sugiere que las células se encuentran en un fase fuera del ciclo celular [9, 10]. Otra característica importante es el aumento del tamaño de la célula, algunas veces hasta el doble. Esto va aunado a un aumento en el contenido citosólico [1]. En 1995, Dimri y Campisi demostraron, por primera vez, la presencia de células senescentes *in vivo*, así como también, por primera vez lograron encontrar un marcador fisiológico específico para las células en estado senescente: la sobreexpresión de la

enzima β -Galactosidasa [11]. No obstante su uso como marcador, la implicación fisiológica de esta sobreexpresión aún queda por esclarecerse.

En la actualidad se han asociado otras características al fenotipo senescente, y muchas veces incluso se emplean como marcadores adicionales de senescencia. Estas características incluyen la sobre expresión de p16^{INK}, gen encargado de detener el ciclo celular en uno de los “*Checkpoints*” en la transición de la etapa G1 a la etapa S del ciclo celular. A nivel de cromatina podemos encontrar otra característica utilizada como marcador, la formación de foci de heterocromatina asociados a senescencia (SAFH) así como la incidencia de segmentos de ADN modificados denominados DNA-scars [12, 13, 14, 15]. En los últimos años se ha reconocido otra característica de suma importancia y está relacionada con lo que las células senescentes secretan al medio. Este fenotipo secretor relacionado a senescencia (denominado SASP), incluye a proteasas, factores de crecimiento y citocinas con actividad tanto autócrina como parácrina [16, 17].

1.3 Senescencia y DDR.

Muchas veces se ha tratado al fenómeno de senescencia como si se tratara de un programa que la célula activa y que la conducirá a alcanzar el fenotipo senescente completo, por medio de la expresión de algunos genes característicos entre los cuales se encuentran p53 y p16. Sin embargo, la activación de ciertos genes y la inducción de la senescencia puede variar en función del estímulo que desencadene la señal necesaria para iniciar el proceso; sin embargo, esta señal muchas veces converge en activar la respuesta al daño al ADN (DDR, en inglés *DNA-damage response*) [18, 20]. Entre los estímulos que pueden iniciar una DDR el más conocido es la erosión y el acortamiento telomérico, que se da cuando la región telomérica alcanza un tamaño crítico después de varias rondas de divisiones. El enzima ADN polimerasa sólo añade nucleótidos en dirección 5' – 3' y necesita un extremo 3'-OH libre que no existe tras la eliminación del

cebador, por lo que no puede completar la síntesis del último fragmento de Okazaki. De esta manera, en las células somáticas se acortan los telómeros a razón de 15 a 25 nucleótidos en cada proceso replicativo, el número de nucleótidos correspondientes a un cebador [19, 20, 21].

Otros estímulos que pueden activar una DDR persistente es el daño al ADN en regiones no teloméricas, esto incluye principalmente al rompimiento de doble cadena. El estrés oxidante es capaz de causar daño suficiente en el ADN para iniciar una DDR y es el agente principal que activa esta vía. Así mismo, la sobre-estimulación con señales mitogénicas, como la activación de oncogenes (mutaciones oncogénicas) o genes proliferativos pueden provocar estrés por replicación y estrés genotóxico activando una DDR [22, 23, 24].

1.4 Senescencia y ciclo celular.

Como se mencionó anteriormente, la detención irreversible del ciclo celular es la característica principal del fenotipo senescente. La activación constante de DDR lleva a la activación de varios genes pro-senescentes, muchos de los cuales están relacionados con la regulación del ciclo celular. Existen dos vías bien caracterizadas para la detención del ciclo celular, las cuales tienen a p38 y p53 como genes reguladores principales, estas vías se activaran dependiendo del estímulo desencadenante. El mecanismo efector que detendrá el ciclo dependerá en primera instancia de algún regulador negativo del ciclo celular (RNCC), y posteriormente de moléculas que mantengan esa detención. Entre los RNCC más potentes se encuentran p16, p21 y p27.

1.4.1 p16.

P16 es un una proteína derivada de un gen supresor de tumores, su papel fisiológico consiste en regular la progresión del ciclo celular por la inhibición directa de las cinasas

dependientes de ciclinas durante la fase G1 del ciclo celular (CDK4 y CDK6 principalmente). La transcripción de *p16* durante un estímulo pro-senescente es controlada por p38/FoxO. P16 es parte del “*checkpoint*” de la parte final de la fase G1 que depende principalmente de la acción de la proteína de retinoblastoma (pRb) que en su estado hipo-fosforilado se encuentra unida al factor de transcripción E2F [10,25].

Además de su papel principal, se han descrito nuevas funciones, mucho más sutiles pero con verdaderos efectos en la fisiología de la célula. En el contexto de la senescencia, el complejo p16/pRB tiene funciones de regulación epigenética. Existen evidencias de que este complejo se une a la cromatina y puede bloquear la transcripción de genes relacionados con E2F, así como pro-apoptóticos como Bax [26, 27].

Además de esta función, también se ha reportado el papel pro-oxidante que posee. Al aumentar los niveles de p16 (como sucede durante el estado senescente), el nivel de oxidación aumenta también dentro de la célula [27, 28].

Productos diferentes de la proteína p16 por corte y empalme (splicing) alternativo, llevan a la formación de un complejo proteínico que estabiliza a p53, e interfiere a su vez con su regulación al interactuar directamente con la proteína mdm2. El gen *p16* está regulado a su vez por la proteína Bmi-1, cuyo gen pertenece a la familia de los denominados “polycomb”, su mecanismo de acción se ejerce mediante la represión de la transcripción del gen *p16* (represor transcripcional) [84]. Estudios realizados en fibroblastos humanos inmortalizados vía telomerasa, han encontrado una relación significativa que liga la represión de *p16* y *p53* con dicho fenómeno. Esta relación posiblemente se debe a una acumulación de metilaciones en el promotor de *p16*, y se halla asociada a su vez al medio circundante de las células, incluyendo a otras células con diferente tipo celular. También existe evidencia de que la inmortalización por la inhibición en la expresión de *p16* es reversible mediante la reintroducción del gen al sistema promoviendo una rápida detención del ciclo celular [29, 30, 31, 32].

1.4.2 p21.

p21 es un regulador negativo del ciclo celular, su acción fue descrita durante la etapa G1 del ciclo celular, pero ahora se acepta que tiene influencia durante todo el ciclo. Su activación depende del factor de transcripción p53. Después de integrar la diferente información que proviene del citosol y del núcleo, p53 promueve la transcripción del gen *p21 (WAF1)* [33]. Su acción como regulador del ciclo celular se lleva a cabo mediante la inhibición directa de las cinasas dependientes de ciclinas, en particular a CDK2. Trabajos realizados confirman esta función. Durante el inicio del fenómeno de senescencia, se ha encontrado un aumento tanto en los niveles de proteína p21, como su ARN mensajero. Así mismo, la sobreexpresión exógena de *p21* lleva a la detención del ciclo celular [34]. Sin embargo, un hecho bastante llamativo del comportamiento de p21 es que cuando ya se ha establecido el estado senescente, sus niveles comienzan a descender de una manera marcada. Además de su función principal, p21 tiene otras funciones descritas. Existen evidencias que sugieren la interacción directa de p21 con otros reguladores del ciclo celular como ciclina A, ciclina D1 y ciclina E, esta inhibición aumenta su potencia al frenar el ciclo celular. Además, también se ha descrito su capacidad para inhibir proteínas pro-apoptóticas (volviéndolo una proteína con actividad anti-apoptótica). Se ha descrito muchas veces a p21 como un gen supresor de tumores, sin embargo, según su contexto y localización subcelular, p21 también puede adquirir cierta actividad oncogénica. P21 puede inducir la exportación y acumulación nuclear de ciclina D. En el citosol puede unirse a PI3K y bloquear así una potente señal pro-apoptótica, esta inhibición en el citosol en el contexto de tumorigenesis resulta ser negativa y además un signo de mal prognosis en pacientes con cáncer, su interacción con ROCK y RhoA promueve además metástasis en células transformadas [35, 36, 37, 38].

Aparte de lo antes mencionado, p21, al igual que p16, se le ha adjudicado un papel de regulador del estado redox. A mayores niveles de p21 mayor es el nivel de oxidantes en la célula [39].

1.4.3 p27.

P27 es un gen supresor de tumores, su función principal es el inhibir la progresión del ciclo celular y su papel fundamental en la fisiología de la célula es el control de la proliferación. *P27* pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de CDKs (junto con p21 y p16). Los miembros de esta familia poseen efectos distintos en la función de diferentes CDKs. *P27* tiene un efecto negativo en los complejos ciclina E/CDK2 y ciclina A/CDK2, pero puede activar el complejo ciclina D/CDK [40]. Esta capacidad dual de regular la progresión del ciclo celular, la vuelve un candidato especial para participar de una manera fundamental durante la toma de decisión del destino celular que gobierna la aparición de la senescencia, así como también la tumorigénesis.

La proteína p27 fue descubierta en células cuyo ciclo celular había sido detenido por TGF- α . Así mismo se sabe que algunos factores mitogénicos causan la pérdida de la actividad de p27, pero sus niveles y actividad biológica se ven aumentados en respuesta a señales de diferenciación o durante la pérdida de adhesión a la matriz extracelular. Por lo que se le ha atribuido un papel importante durante la diferenciación y la proliferación celular [40]. Debido a estas propiedades fisiológicas, p27 se encuentra desregulado en diferentes procesos cancerígenos donde se incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal y linfomas entre otros [41, 42, 43]. Existen evidencias de que p27 participa en la promoción de la senescencia, aunque siempre de una manera indirecta, ya que depende de un mecanismo de regulación de su expresión genética para llevar a cabo su efecto durante la senescencia; como regulación epigenética diferencial mediada por la histona desmetilasa RBP2 o evitando la degradación selectiva de p27 vía proteosoma [44, 45]. Existen

además reportes de la capacidad antiproliferativa de p27 en modelos de células con una proliferación anormal, algunos de estos incluyen la participación de moléculas antiapoptóticas y vías de señalización activadas por receptores no canónicos. Evidencia de su participación excepcional durante la senescencia viene del uso de fármacos que promueven senescencia en células de cáncer. Muchas veces p16 y p21 se encuentran bloqueados por lo que las células detienen su ciclo celular en fase G2. Por esto la ausencia de p27 en pacientes con cáncer siempre es un motivo de mal pronóstico [46, 47, 48].

2. Antecedentes

2.1 *p16, p21 y p27 durante senescencia.*

La función de los reguladores negativos del ciclo celular durante el establecimiento del fenotipo senescente está bien documentada. En particular la función de p16, puesto que esta proteína responde ante situaciones de estrés como al daño al ADN, se ha considerado como el principal promotor del frenado del ciclo celular durante el desarrollo del fenómeno de senescencia y se ha caracterizado como el factor principal que promueve su irreversibilidad, al grado que muchos investigadores lo consideran un marcador característico de senescencia de igual importancia que al enzima β -galactosidasa [21, 24, 25, 75]. De este mismo modo, existen referencias que afirman la participación de p21 durante senescencia. Su participación ha sido más discutida pues no siempre se encuentra presente o muchas veces sus niveles se ven disminuidos después de un aumento inicial, además su participación depende directamente del correcto funcionamiento de p53 [74, 76, 77]. Esta disminución en su actividad se relaciona directamente con la participación de p21 en procesos carcinogénicos, ya que su expresión elevada y su localización en el citosol promueve metástasis y resistencia a la apoptosis,

por lo que se le considera un factor de mal pronóstico [78, 79, 80]. El último de los reguladores analizados fue p27, el cual, como ya se mencionó, tiene la característica de poder detener el ciclo celular sin importar la fase del mismo. Es interesante que una gran parte de la investigación en la literatura en donde se incluyen tanto la senescencia como p27, se enfoque en la inducción de senescencia por fármacos en células cancerígenas. El fenotipo que adquieren estas células es muy similar al fenotipo senescente, exceptuando la morfología de las células. A este fenotipo se le ha llamado senescencia celular acelerada o farmacológica. Cuando las células cancerígenas cambian a este fenotipo se ha observado que la capacidad para expresar a p27 resulta en que la senescencia se revierta o no y que las células reactiven su ciclo celular y por lo tanto el fenotipo cancerígeno [80, 81, 82].

2.2. Ciclo celular y senescencia.

En los organismos adultos la mayor parte de las células se encuentran fuera del ciclo celular, pero esto no significa que las células sean senescentes. Lo anterior nos indica que el arresto o detención del ciclo celular no necesariamente es sinónimo de senescencia. A este paro en el ciclo celular se le denomina quiescencia y puede ser adquirida por la ausencia de factores de crecimiento. Sin embargo esta no es la única forma, la inducción de los inhibidores de CDK's (como p21, p16 o p27) pueden causar arresto del ciclo aun en presencia de factores de crecimiento o suero [83, 84]. Lo que sugiere que la activación de factores anti-proliferativos no es suficiente para adquirir un estado de senescencia completo. Para esto hace falta que otros mecanismos diferentes entren en acción.

2.3 Estado redox y senescencia.

Como ya se mencionó anteriormente, desde la aparición de la teoría del envejecimiento propuesta por Harman, ha salido a la luz la participación directa que tiene el estrés oxidante sobre la incidencia y desarrollo de diferentes procesos como la apoptosis, el cáncer y la senescencia celular. Los radicales libres y las especies reactivas son moléculas altamente reactivas capaces de provocar daño en el ADN e inducir de esta manera la detención del ciclo celular. Se ha reportado, que en células senescentes y en células provenientes de organismos viejos, los niveles de oxidantes se encuentran aumentados o bien, sus sistemas antioxidantes están disminuidos, provocando un estado de estrés oxidante constante, muchas veces auto sostenido, hacia el interior de la célula [49].

Existe un fenotipo similar al de senescencia replicativa que se alcanza al tratar células normales con estímulos oxidantes sub letales. Las células expuestas a estos tratamientos sufren un proceso denominado senescencia prematura inducida por estrés [50]. Este fenómeno denominado SIPS (por sus siglas en inglés: stress induced premature senescente), comparte vías similares para el establecimiento del fenómeno con el de senescencia replicativa (como la activación de la respuesta al daño al ADN), pero los puntos de inicio son diferentes, así como los efectores finales. Las vías que llevan al establecimiento de la SIPS convergen también en p38 y p53, que son las señales provenientes de la activación de la respuesta de daño a ADN ya mencionadas, así como señales guiadas por MAPK's. Sin embargo, el fenómeno de SIPS es independiente del acortamiento y erosión de los telómeros. Aunque se ha descrito que, si bien el acortamiento no es el evento desencadenante de la senescencia, este sí se puede encontrar en SIPS en mayor o menor grado dependiendo de los niveles de oxidantes utilizados, ya que estos afectan directamente el acortamiento de los telómeros y el tiempo de vida de las células en cultivo. En contraste, el tratamiento con antioxidantes retrasan

la aparición de la senescencia en cultivos de fibroblastos humanos y reduce el grado de pérdida de telómeros [51, 52].

Como ya se mencionó, durante la senescencia replicativa las células presentan un estado oxidante constante, que se asume como el responsable de la progresión y el mantenimiento del estado de senescencia. Por lo que el aparente desajuste en el balance del estado redox, juega un papel más de efector que de iniciador principal durante este fenómeno. Evidencias que sugieren esto las podemos hallar en múltiples trabajos; el regulador p53 por ejemplo, es susceptible al estado redox pues tiene en su estructura 10 cisteínas susceptibles a oxidación, mismas que juegan un papel funcional durante su activación. Así mismo, los niveles de glutatión reducido (GSH) juegan un papel importante; el disminuir los niveles de GSH conlleva a una aceleración de la aparición del estado definido de senescencia. Así mismo cambios en el cociente GSH/GSSG activan la vía Erk/p38, la cual como ya se mencionó, es una vía clave durante el establecimiento de la senescencia replicativa y SIPS [53, 54, 55].

3. Justificación

El envejecimiento es un fenómeno natural que sufren todos los organismos vivos. Está caracterizado por un decaimiento en las funciones fisiológicas y estructurales del organismo. También está acompañado de un aumento en la susceptibilidad a enfermedades y afecciones, síndrome conocido como fragilidad. Una edad avanzada se relaciona frecuentemente con afecciones metabólicas (diabetes, síndrome metabólico, hígado graso), neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Párkinson, enfermedad de Huntington) y la mayoría de formas de carcinoma. Debido a esto, el estudio del fenómeno del envejecimiento ha tomado más relevancia en la actualidad que

en el pasado. Ello se debe a un fenómeno que ocurre a nivel mundial, pero principalmente en países económicamente avanzados y en países en vías de desarrollo, entre los cuales se encuentra México. Este fenómeno se denomina transición demográfica y se caracteriza por un retraso en la tasa de mortalidad. En ocasiones va acompañada por un alza en la tasa de natalidad. Sin embargo una baja tasa de natalidad no es excluyente. Este comportamiento poblacional proporciona un escenario futuro en el cual el porcentaje poblacional correspondiente a los adultos mayores ha aumentado. Este aumento vendrá aunado a nuevas necesidades de salud, para las cuales es necesario investigar tópicos ligados directamente con la biología subyacente del envejecimiento, para poder prevenir las enfermedades y el deterioro asociado con él.

Para México el escenario poblacional en el futuro (proyecciones para el año 2050) está caracterizado por un aumento del porcentaje de adultos mayores de 64 años, que cambiará del 6.5% actual al 22% para el 2050. Así como un aumento del índice de dependencia de adultos mayores rebasando por un 20% al de dependencia juvenil [55]. Por esta razón es necesario más y mejor investigación en este campo de la biología, sobre todo en México donde este tipo de investigaciones apenas está dando sus primeros pasos. La investigación básica que se realizó en este proyecto pretende impactar de forma directa en nuestra manera de ver dos fenómenos biológicos que siempre han estado unidos a la senescencia celular, me refiero al cáncer y al envejecimiento.

4. Pregunta a responder

¿Es la senescencia un proceso celular que se lleva a cabo en dos etapas, comenzando con la activación de mecanismos anti-proliferativos y terminando con un desbalance exacerbado en el estado redox al alcanzar el fenotipo senescente completo?

5. Hipótesis

Si la senescencia en fibroblastos de pulmón de ratón se alcanza en dos etapas, se esperaría que durante el inicio funcionaran los mecanismos dirigidos a evitar la proliferación celular y posteriormente terminará con un desbalance en el estado redox que promoviera los cambios fisiológicos finales del fenotipo senescente.

6. Objetivo general

Determinar si existen dos etapas bien definidas durante el establecimiento del fenotipo senescente en fibroblastos de pulmón de ratón. La primera etapa definida por la detención del ciclo celular como mecanismo supresor de tumores y la segunda definida por cambios fisiológicos determinados por un estado redox pro-oxidante.

6.1 Objetivos particulares

- Evaluar los dos modelos a utilizar (senescencia replicativa y SIPS) para conocer su dinámica de proliferación y el tiempo en que el cultivo alcanza la senescencia.
- Con los resultados obtenidos elegir dos puntos representativos para evaluar las dos fases propuestas durante la progresión del fenómeno de senescencia.
- Evaluar el estado redox para ambos modelos en dos puntos diferentes representativos de las dos etapas propuestas.
- Evaluar la acción de reguladores negativos del ciclo celular (p21, p16 y p27) como prueba del funcionamiento del sistema supresor de tumores celular en ambos modelos en dos puntos diferentes representativos de las dos etapas propuestas.

- Evaluar el estado oxidante del proteoma como parámetro que ligue el estado redox con la capacidad fisiológica funcional dentro de la célula en ambos modelos y en dos puntos diferentes representativos de las dos etapas propuestas.

7. Diseño experimental y protocolos

7.1 Modelo experimental.

Se utilizaron ratones neonatos de la cepa CD-1 (de 3 a 6 días de nacidos) sin distinción del sexo para obtener cultivos primarios de fibroblastos de pulmón. Para cada cultivo se utilizaron 3 ratones. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa y se trataron según la norma oficial mexicana 062- ZOO-1999.

7.2 Obtención de los fibroblastos de pulmón

Para obtener los cultivos primarios de fibroblastos de pulmón, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se desinfectaron con etanol al 70% y se abrió la parte superior del tórax. Se removieron los pulmones enteros y se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL que contenía 15 mL de PBS con 2% de antibiótico-antimicótico (antibac) para enjuagarlos. Posteriormente, se transfirieron a una caja de Petri con PBS + 2% de antibac, en la que se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 mm³. Los fragmentos se lavaron varias veces con PBS + antibac. Después del último lavado se agregaron 10 mL de colagenasa tipo IA al 0.3% y se incubó a 37°C por 40 min agitando algunas veces utilizando un agitador magnético estéril. Después de la incubación se centrifugó el cultivo para eliminar la colagenasa y se agregaron 15 mL de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 15% de suero fetal bovino inactivado (In vitro), con

3% de antibac. Se repartió el homogenado celular en las cajas de Petri, que se guardaron en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ en el aire a 37°C. El medio se cambió cada tercer día. Dado que la técnica ha sido probada en varias ocasiones en el laboratorio se omitieron pruebas de pureza en los cultivos.

7.3 Sembrado del cultivo para la evaluación del modelo

Después de obtener los fibroblastos del cultivo, se lavaron y se les cambió el medio cada tercer día hasta el día 8. En el día 8 se sembraron las células para la evaluación del modelo evaluando el índice de proliferación celular, síntesis de ADN y actividad de β-galactosidasa. Se sembraron 3x10³ células para cada evaluación en cada pozo, así como sus respectivos triplicados. Las evaluaciones se realizaron cada 3 días a partir del día 9 y hasta el día 21 para SIPS y día 30 para SR.

7.4 Inducción de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS).

En el día 6 del cultivo se trataron las células con 75 μM de H₂O₂ durante dos horas. Pasado este tiempo las células se lavaron y se les cambió el medio de cultivo.

7.5 Proliferación celular.

El número de células cada tercer día se determinó contando el número de células totales por pozo con el hemocitómetro. Para lo cual se despegaron las células con tripsina al 0.01%, se tomó una alícuota de 20 μL a la cual se le agregaron 20 μL de azul tripano. Las células se contaron con un microscopio de campo claro. El número de células se obtuvo mediante la aplicación de la fórmula: #cel = Σcel contadas x Vol x 10⁴.

7.6 Síntesis de ADN: Incorporación de timidina [H⁻³].

Esta determinación también se realizó cada tercer día. Para ello se tomó una alícuota de timidina [$H-^3$] 1 μ Ci en el medio de cultivo. Las células se dejaron incubar con el medio con timidina durante 24 h. Pasado este tiempo las células se lavaron con PBS-antibac varias veces y se fijaron por 15 min con una solución al 95% de metanol-PBS. Las células se volvieron a lavar y se les agregó 0.5mL de una solución de NaOH 0.2N, las células se incubaron durante toda la noche para hidrolizar el ADN. El extracto alcalino se transfirió a un vial con 3 mL de líquido de centelleo. La incorporación de timidina se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman).

7.7 Actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal).

El ensayo de actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia se utilizó para cuantificar el número de células senescentes en el cultivo, igualmente cada tercer día. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2%, se lavaron y se incubaron con solución de tinción SA- β -Gal por 12 h a 37°C, la solución contenía 1 mg of 5-bromo-4-cloro-3-indoilo β -D-galactoside (X-Gal, Promega, USA) por mL (stock=20 mg de dimetilformamida por mL)/ 40mM ácido cítrico / fosfato de sodio, pH 6.0/ 5 mM ferricianuro de sodio/ 5mM ferricianuro de potasio/150 mM NaCl/2 mM MgCl₂. Las células se contaron en el microscopio óptico. Para obtener el porcentaje de células senescentes se tomaron en cuenta 100 células por pozo.

7.8 Diseño experimental para la evaluación de las dos etapas.

Después de analizar la dinámica de crecimiento de los cultivos y evaluar el tiempo en el cual se alcanza la senescencia (tanto SIPS como SR) decidimos buscar evidencias de la existencia de las dos etapas propuestas determinadas por sus características hipotetizadas (mecanismo antiproliferativo y estrés oxidante exacerbado). Para esto y con base en los resultados obtenidos de la evaluación del modelo escogimos dos días

representativos, uno del estado pre-senescente (SIPS día 15 y SR día 25) y uno del estado en senescencia completa (SIPS día 20 y SR día 30). En estos días evaluamos tanto la acción de los mecanismos antiproliferativos (evaluación de p21, p16 y p27 mediante inmunoblot) así como el estado redox y el efecto del mismo sobre el funcionamiento celular (utilizando razón glutatión reducido GSH/ glutatión oxidado GSSG y oxidación proteínica por oxyblot).

7.9 Inmunoblot de p16, p21 y p27.

La determinación del contenido de las proteínas p16, p21, p27 se realizó mediante western blot en los dos puntos elegidos para cada tipo de senescencia, antes del establecimiento de la misma (estado pre-senescente) y cuando ya se tenía el estado establecido (estado senescente). Las células tratadas fueron tripzinizadas y resuspendidas en el buffer de lisis. Los homogenados celulares se incubaron a 4 °C durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm a 4°C durante 20 min. La concentración de proteínas fue determinada en el sobrenadante utilizando el reactivo comercial de Bradford (BioRad, Hercules CA, USA) [Bradford, 1976]. Los lisados celulares fueron separados en un gel SDS-PAGE al 12% y transferido a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules CA, USA). Las Membranas fueron bloqueadas con TBS-Tween 0.1%, 5% leche libre de grasa durante 1 h, y posteriormente se incubó con un anticuerpo para cada proteína durante 2 h. P16 (Santa Cruz Biotechnology), p21 (Santa Cruz Biotechnology) y p27 (Santa Cruz Biotechnology). Todos los anticuerpos primarios se utilizaron en una dilución de 1: 200. Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-Tween e incubadas con un anticuerpo secundario (anti-ratón; Santa Cruz Biotechnology) conjugado con peroxidasa de rabano durante 1 hora a una dilución 1:100. Después se lavó la membrana tres veces, los blots fueron revelados utilizando un reactivo

quimioluminiscente comercial (Immobilon Western, Millipore), la fluorescencia se analizó utilizando un fotodocumentador (Kodak gel logic 100 system).

7.10 Cuantificación de GSH/GSSG.

Para determinar la concentración de GSH y GSSG en los puntos elegidos (estado pre-senescente y estado senescente para SR y para SIPS), 10×10^4 células se homogenizaron en 3.75 mL de una solución amortiguadora de EDTA/fosfatos a la cual se le agregó 1 mL de H_3PO_3 (25%). El homogenizado se centrifugó a $3,000 \times g$ durante 15 min, los sobrenadantes fueron separados. 5 mL de sobrenadante fue agregado a 4.5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos a la cual se le agregó 100 μL de O-phthalaldehído (OPA). Para cuantificar GSSG el mismo método fue utilizado. Se tomó una alícuota de 500 μL del sobrenadante, el cual se resuspendió en 200 μL de N-etil-maleimida (0.04M) y se dejó reposar durante 30 min. Pasado este tiempo 100 μL del homogenado se mezcló con 4.3 mL of NaOH (0.01N) a la cual se le agregó 1.8 mL de solución amortiguadora de fosfatos y 100 μL de OPA. Todas las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. La señal de fluorescencia fue medida en un espectrómetro de luminiscencia / fluorescencia a una longitud de onda de 420 nm de emisión y a 350 nm de excitación. Los resultados fueron expresados en μg de GSH y GSSG por mg de proteína [85].

7.11 Inmunoblot y cuantificación de grupos carbonilos (DNP).

Se obtuvieron 1×10^4 células en los días determinados para el estado pre-senescente y estado senescente para cada tipo de senescencia. Las células fueron incubadas con 5 μL de una solución de SDS (120g/l). Cinco min después se añadió 10 μL de una solución de DNPH (10 mmol/l) en HCl (2 mol/l). Para derivatizar la muestra se dejó reaccionar la

mezcla durante 25 min, seguida de la adición de 5 μ L de solución neutralizadora (provista en el kit; Oxyblot protein oxidation detection-Kit). La cuantificación de los grupos carbonilos se realizó por inmunoblot (descrito en el apartado Inmunoblot de p16, p21 y p27). Se utilizó el anticuerpo primario para DNP-proteína provisto en el kit.

7.12 Diseño experimental para el uso de un antioxidante (Trolox)

Después de evaluar ambas etapas y darnos cuenta de la relevancia del estado redox en el establecimiento del fenotipo completo de senescencia, decidimos probar el efecto de un antioxidante sobre el crecimiento del cultivo y la aparición de senescencia en ambos modelos. El antioxidante escogido fue Trolox. Trolox es un antioxidante similar a la vitamina E, por lo que su mecanismo de acción se basa en la captura de especies reactivas, por lo que no interfiere directamente con la fisiología normal de la célula como lo haría por ejemplo el N-acetil-cisteína (modifica el balance del glutatión), ya que así podríamos comprobar directamente el efecto del estado redox sobre el establecimiento de senescencia. Para SIPS se comenzó a suplementar el trolox en dos diferentes tratamientos, el primero inició el día 9, inmediatamente después del tratamiento para la inducción de SIPS. El segundo se comenzó a partir del día 12. Para ambos tratamientos se volvió a suplementar el cultivo con trolox cada vez que el medio fue cambiado. Para SR se comenzó a suplementar el trolox al cultivo a partir del día 15, y se siguió suplementado cada vez que se cambio el medio de cultivo. La concentración utilizada para SIPS y SR fue de 0.5mM. El trolox se disolvió en DMSO, se llevaron a cabo las pruebas pertinentes y no se observaron cambios en el cultivo por el DMSO.

7.13 Tratamientos de los datos.

Los datos son reportados como medias \pm DE (desviación estándar) con al menos 3 experimentos independientes por triplicado. Los datos fueron comparados mediante un

análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de la prueba Post Hoc Tuckey-Kramer. Para el análisis del modelo (Proliferación, síntesis de ADN y actividad de β -galactosidasa) se utilizó la prueba t-Student para muestras pareadas. En todas las pruebas se utilizó un nivel de probabilidad de 0.05 ($p < 0.05$) como criterio mínimo de significancia.

8. Resultados

8.1 Evaluación del modelo.

El primer paso que se tenía que dar era sin duda la evaluación del modelo, con esto me refiero a conocer de manera fehaciente la dinámica de crecimiento de ambos tipos de cultivos que utilizaremos como modelos experimentales, esto para encontrar los puntos más sobresalientes durante el tiempo del cultivo así como el tiempo exacto en el cual se alcanza el fenómeno de senescencia en un porcentaje mayor del 70%, tanto para las células tratadas con peróxido de hidrógeno (SIPS) como para las células no tratadas (senescencia replicativa SR). Para completar este objetivo se midieron tres parámetros: proliferación celular, síntesis de ADN y senescencia.

Con respecto a la proliferación celular (figura 1), encontramos que los cultivos modelos de SR incrementan su número de manera logarítmica durante los primeros 21 días. Hasta este día cada medición fue diferente estadísticamente (ANOVA $p < 0.05$) con respecto a la medición anterior. A partir de la medición en el día 24, el número de células se vuelve constante. Esto significa que no existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los días anteriores ($p < 0.05$), por lo que se considera que las células ya no

están proliferando (no aumenta su número) y es uno de los indicadores de senescencia. Para los cultivos tratados SIPS, la proliferación se detuvo al día 12, solo 3 días después del tratamiento sub letal con peróxido de hidrógeno. Después de este día el número de células permaneció constante. Para comparar el comportamiento entre SIPS y SR analizamos los datos utilizando la prueba t de Student ($p < 0.05$). Encontramos diferencias significativas en el día 15 del cultivo. Esto significa que en este día los cultivos comienzan a diferenciarse entre si y adquieren características diferentes en su manera de proliferar.

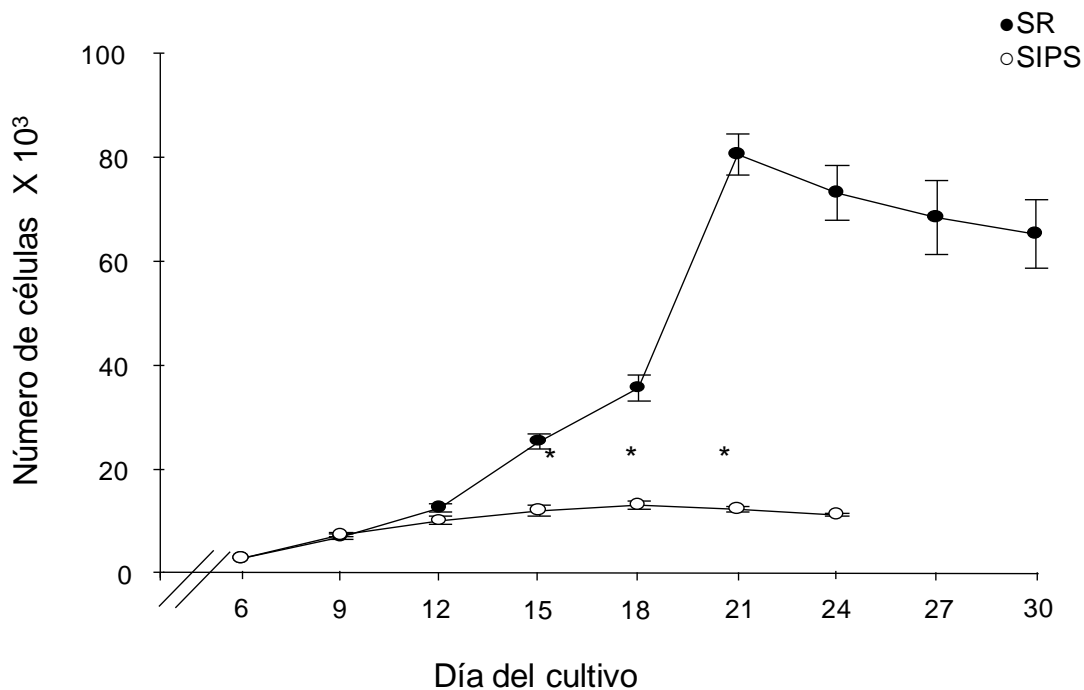


Figura 1. Proliferación celular. La proliferación celular se evaluó mediante el conteo de células en los cultivos para ambos modelos. Los puntos blancos representan a las células con SIPS mientras que los puntos negros representan a SR. En la gráfica se muestran el número de células (Y) vs el día del cultivo. Los experimentos fueron realizados 3 veces por triplicado (* $p < 0.05$).

En la figura 2 se ilustran los resultados obtenidos de la incorporación de timidina [H^3]. Como ya se mencionó anteriormente la incorporación de timidina es un indicador de la síntesis de ADN. Los resultados muestran que la síntesis de ADN se incrementó de manera constante hasta el día 21 para las células con SR ($p < 0.05$). A partir del día 24 se registro un decremento estadísticamente significativo. Para SIPS encontramos un aumento que se prolongo hasta el día 12 y fue significativo ($p < 0.05$) seguido con un decremento para el día 15 y posteriores. Para comparar el comportamiento entre SIPS y SR analizamos los datos comparando ambos modelos utilizando la prueba t de Student ($p < 0.05$) y al igual que en los datos de proliferación encontramos diferencias estadísticas a partir del día 15 de cultivo.

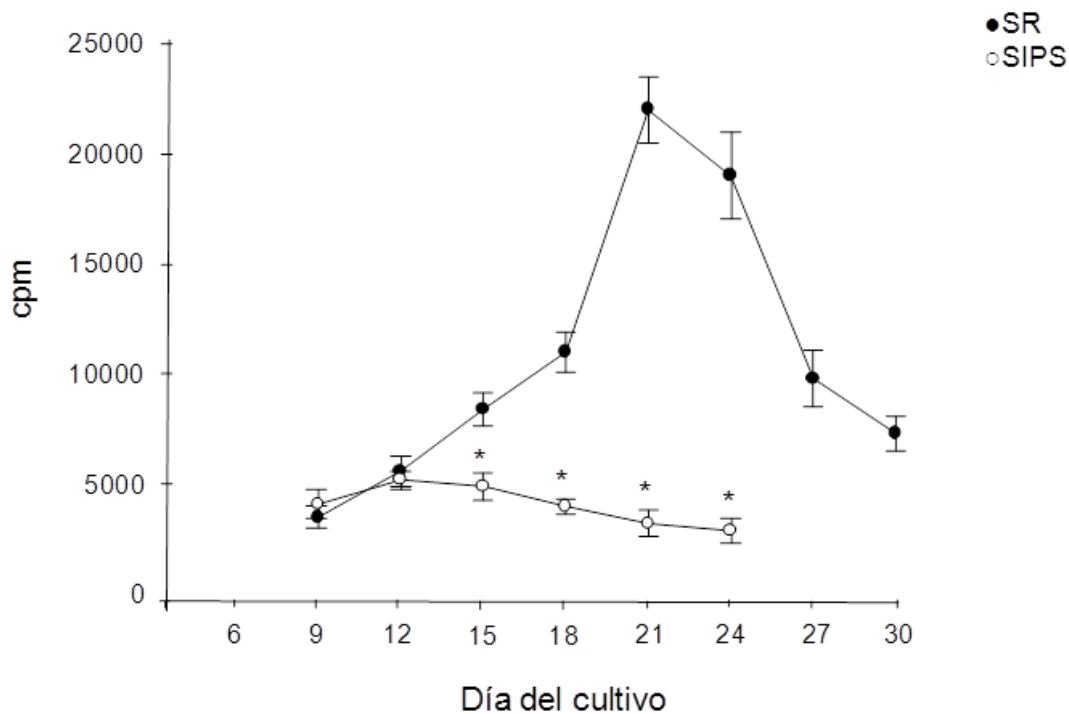


Figura 2. Síntesis de ADN. La síntesis de ADN se evaluó mediante la cantidad de timidina [H^3] incorporada por las células en los cultivos para ambos modelos. Los puntos blancos representan a las células con SIPS mientras que los puntos negros representan a SR. En la gráfica se muestran las cuentas por minuto (cpm) (Y) vs el día del cultivo. Los experimentos fueron realizados 3 veces por triplicado ($p < 0.05$).*

Para terminar de evaluar ambos modelos y determinar el momento en que se produce la senescencia en ambos modelos llevamos a cabo un ensayo para determinar la actividad de β -galactosidasa (figura 3), ya que la presencia de esta enzima es un indicador de que la célula ha entrado en senescencia. En la figura 3 se muestra el porcentaje de células positivas a β -gal. En los cultivos SR durante los primeros días el incremento que se observó fue muy reducido, comparándolo con respecto al control (día 9). Solo hasta el día 24 se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) con un 39% de células positivas. Después de ese día, el aumento del porcentaje de células positivas a β -gal se fue incrementando rápidamente con cada medición. En el último día de medición (día 30) se alcanzó un poco más del 70% de células positivas a β -gal. Con respecto a SIPS encontramos un comportamiento similar, a partir del día 15 hallamos una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control (día 9). A partir del día 15 el aumento fue más marcado con cada medición y para el día 21 el porcentaje rebasó el 80%. Cabe señalar que es muy difícil alcanzar un 100% de células positivas dentro de un cultivo. Por lo que se considera que un cultivo ha entrado en senescencia a partir de que se consigue un 70-80% de células positivas a β -gal. Para comparar el comportamiento entre ambos modelos llevamos a cabo un análisis de los datos mediante una prueba de t de Student ($p < 0.05$). Encontramos diferencias estadísticas ya en el día 12 del cultivo. Cabe señalar

que estos datos concuerdan con los resultados obtenidos para síntesis de ADN y proliferación en ambos modelos (figuras 1 y 2).

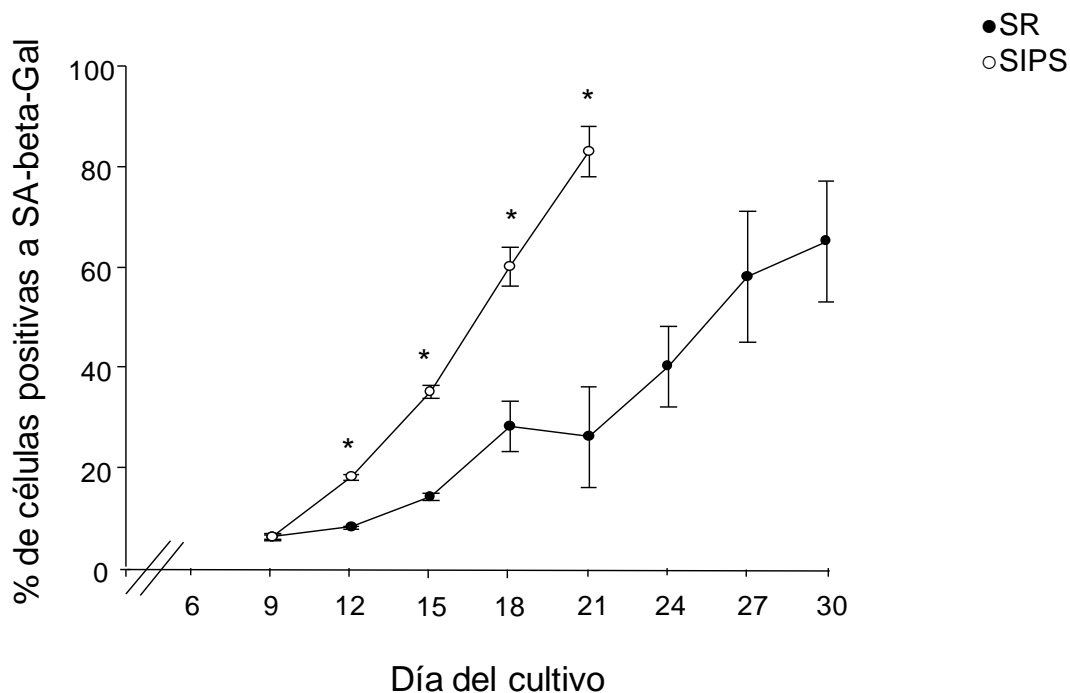


Figura 3. Porcentaje (%) de células positivas a β -galactosidasa. Un indicador de senescencia celular es el aumento en la actividad de β -galactosidasa dentro de las células. Por lo que el porcentaje de células positivas a β -gal es un indicador fiable de senescencia dentro de un cultivo.

Los puntos blancos representan a las células con SIPS mientras que los puntos negros representan a SR. En la gráfica se muestra el % de células positivas a β -gal (Y) vs el día del cultivo. Los experimentos fueron realizados 3 veces por triplicado ($p < 0.05$).*

Una vez evaluado el modelo y después de conocer la dinámica de crecimiento de ambos modelos, así como el tiempo en que los cultivos entran en senescencia, se escogieron los días que consideramos más relevantes para probar nuestra hipótesis de las dos etapas subsecuentes necesarias para adquirir el fenotipo senescente completo. El siguiente planteamiento experimental (figura 4) fue seguido para probar nuestra hipótesis de trabajo. Los días elegidos como representativos para la primera y segunda etapa respectivamente fueron los días 15 y 20 para SIPS y 25 y 30 para SR.

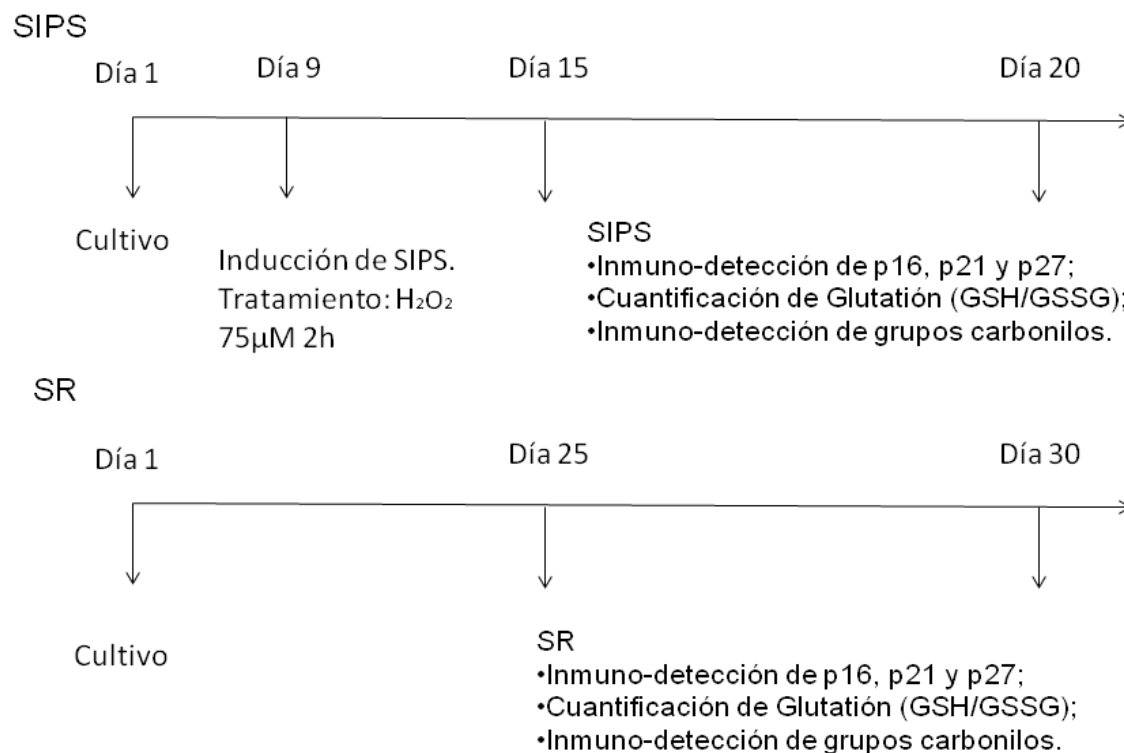


Figura 4. Diseño experimental para la evaluación de ambos puntos temporales que elegimos para los dos modelos de senescencia utilizados, representativos de pre senescencia y senescencia (día 25 y 30 para senescencia replicativa, y 15 y 20 para SIPS). En los tiempos elegidos se evaluarán la acción de los reguladores finales de crecimiento (p21, p16 y p27), así como el estado redox

evaluando los niveles de glutatión (GSH/GSSG). Para ligar ambos resultados evaluaremos el nivel de oxidación del proteoma detectando grupos carbonilos utilizando un kit (oxyblot).

8.2 Evaluación de los reguladores negativos del ciclo celular durante senescencia y pre senescencia.

Como ya se mencionó en la introducción, la senescencia se caracteriza por un paro en la proliferación. Este cese en la proliferación es el resultado de la activación de proteínas específicas dirigidas a controlar el freno del ciclo celular evitando las siguientes duplicaciones. Este mecanismo antiproliferativo durante la senescencia se ha asociado con la activación de eventos tanto de estrés fisiológico (activación de oncogenes, erosión telomérica) como con estrés oxidante (daño al ADN) y se considera la primera barrera que tiene la célula para evitar eventos tumorigénicos. Es por ello que evaluamos los niveles de expresión de tres reguladores negativos del ciclo celular: p16, p21 y p27 en ambos puntos elegidos y en ambos modelos. En la figura 5 se muestra un inmunoblot representativo, así como su análisis densitométrico de tres experimentos independientes. La figura muestra que los niveles de los tres inhibidores del ciclo celular fueron significativamente altos, en ambos estados (senescencia y pre senescencia) así como en ambos tiempos, excepto p21 durante SR en el día 30. Todo se comparó con respecto al control ($p < 0.05$). Un análisis más detallado mostró que p21 incrementó sus niveles 1.5 veces en SIPS y 1.2 en SR ambos durante el estado pre senescente comparado contra el control ($p < 0.05$). Sin embargo después del establecimiento del fenotipo completo disminuyó a niveles muy cercanos a los basales tanto para SIPS como para SR. Comparamos también el nivel de cada proteína durante el estado pre-senescente y el senescente. Encontramos una disminución significativa en los niveles de p21, tanto en SIPS como en SR en el estado senescente respecto al estado pre-senescente.

El mismo comportamiento fue observado para p16, un incremento marcado durante el estado pre-senescente con respecto al control, 1.6 veces más para SIPS y 1.4 veces más para SR ($p < 0.05$). Este aumento fue seguido por un decremento de p16 durante el estado senescente. De manera similar los niveles de p27 también se ven aumentados de manera significativa ($p < 0.05$), 1.2 veces para SIPS y 1.3 veces para SR. De manera interesante, los niveles de p27 permanecieron altos en el estado senescente, 0.8 veces más para SIPS y 1 vez para SR. No hubo cambios significativos entre ambos estados para ambos modelos ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que una vez establecido el fenotipo senescente completo las células no necesitan hacer un esfuerzo extra para detener el ciclo celular (p21, p16), si no solo por mantener la fase de arresto a través de la acción de p27.

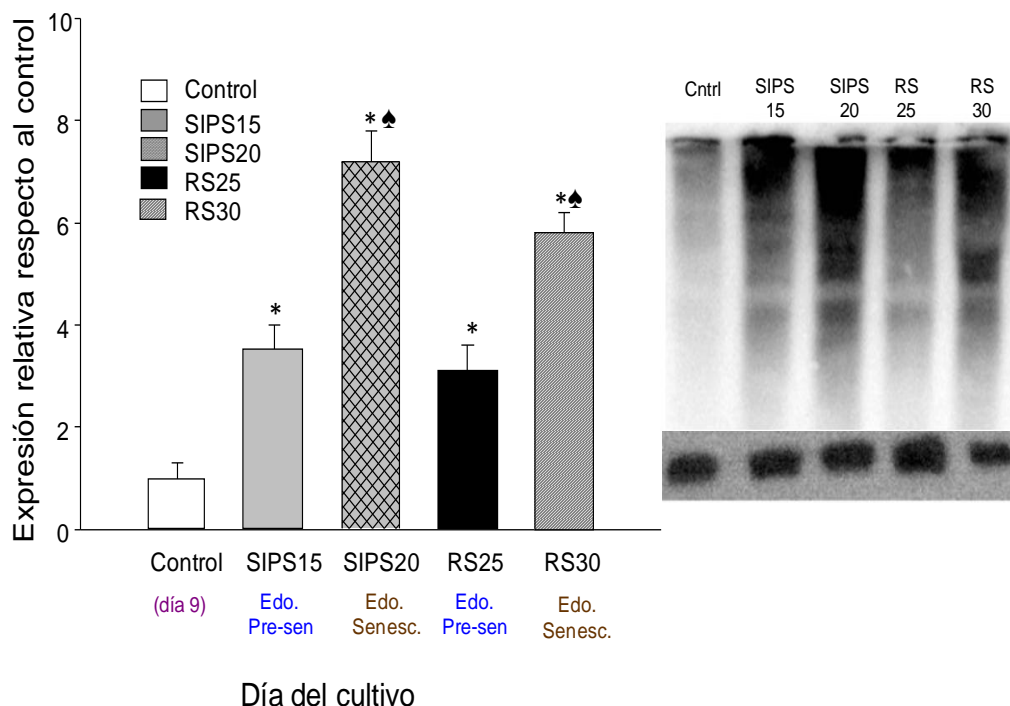


Figura 5. Reguladores negativos del ciclo celular durante senescencia y pre senescencia en ambos modelos (SIPS y SR). La figura muestra en el panel derecho la imagen de un western blot llevado a término utilizando el total de proteínas aisladas de los cultivos en ambos estados, usando los

cultivos en los días 15 y 20 para SIPS y 25 y 30 para SR. Se evaluaron los tres principales reguladores del ciclo celular, p21 (en blanco), p27 (en gris) y p16 (en negro). En el panel derecho se muestra el análisis densitométrico normalizado en base a la expresión de actina. Cada punto representa el promedio \pm D.E de tres experimentos independientes. La significancia estadística ($p < 0.05$) comparado contra el control () o contra su anterior (estado pre-senescente ♣) fue calculada con ANOVA + Tuckey-kramer (TK).*

8.3 Estado redox durante pre-senescencia y senescencia.

El estado redox, como ya se mencionó ampliamente durante la introducción, ha sido reconocido como un factor de gran importancia durante el establecimiento del fenotipo senescente. También se ha cuestionado profundamente si este es un factor iniciador o cual es su verdadera relevancia en el desarrollo del fenómeno. Para entender que es lo que puede estar sucediendo durante el establecimiento de senescencia investigamos los cambios en el estado redox durante la etapa pre-senescente y senescente mediante la medición de los niveles de glutatión, tanto reducido GSH, como oxidado GSSG. Ya que el razón GSH/GSSG es un fuerte indicador de los cambios en el estado redox al interior de la célula. La determinación se llevó a cabo en ambos modelos (figura 6). Como lo predecía la literatura revisada, encontramos un decremento de un 45% en la razón GSH/GSSG con respecto al control en el desarrollo de SIPS, lo que nos indica un ambiente celular más oxidado (día 15). Durante el estado de senescencia establecida, el ambiente volvió a cambiar volviéndose más oxidante llegando al día 20 a una reducción del 75%. Ambas reducciones fueron significativas ($p < 0.05$). De manera interesante, un comportamiento similar fue observado en el modelo de SR. En SR se observó un cambio en la razón de GSH/GSSG durante la etapa pre-senescente (día 25), una disminución del 34% con respecto al control, indicando un estado redox al interior de la célula, el cual se

volvió aun más oxidante para el día 30 (estado senescente establecido) alcanzando una disminución del 68%. Ambas mediciones fueron significativas ($p < 0.05$). Tomando juntos los resultados anteriores, vemos una clara tendencia hacia un ambiente más oxidado al interior de la célula, por lo que nos preguntamos sobre cómo afectaría esta razón a componentes específicos de la célula, considerando al proteoma el más importante debido a la naturaleza funcional de las proteínas y la posible repercusión de este en las características fenotípicas fisiológicas propias del fenómeno de senescencia, por ejemplo, la poca o nula respuesta ante estímulos pro apoptóticos y estímulos proliferativos. Como un indicativo del estado oxidante dentro de la célula y del estado del proteoma determinamos los niveles de oxidación proteica llevamos a cabo una medición de la cantidad de grupos carbonilos en la célula. En la figura 7 se muestra un oxyblot representativo con su respectivo análisis densitométrico. Los resultados nos hacen evidente que existe un impacto fisiológico asociado a la disminución de la razón GSH/GSSG. Encontramos un incremento de 2.8 veces más en las proteínas oxidadas durante el estado pre- senescente de SIPS (día 15) seguido de un incremento más de 5.9 veces durante el estado de senescencia establecida (día 20) Ambos incrementos fueron significativos con respecto al control ($p < 0.05$). De manera interesante el mismo patrón de incremento fue observado durante las mediciones de SR. Encontramos un aumento de 2.4 veces para el estado pre-senescente (día 25), seguido de un incremento aun mayor de 5 veces más para el estado senescente establecido (día 30). Ambos incrementos fueron significativos con respecto al control ($p < 0.05$).

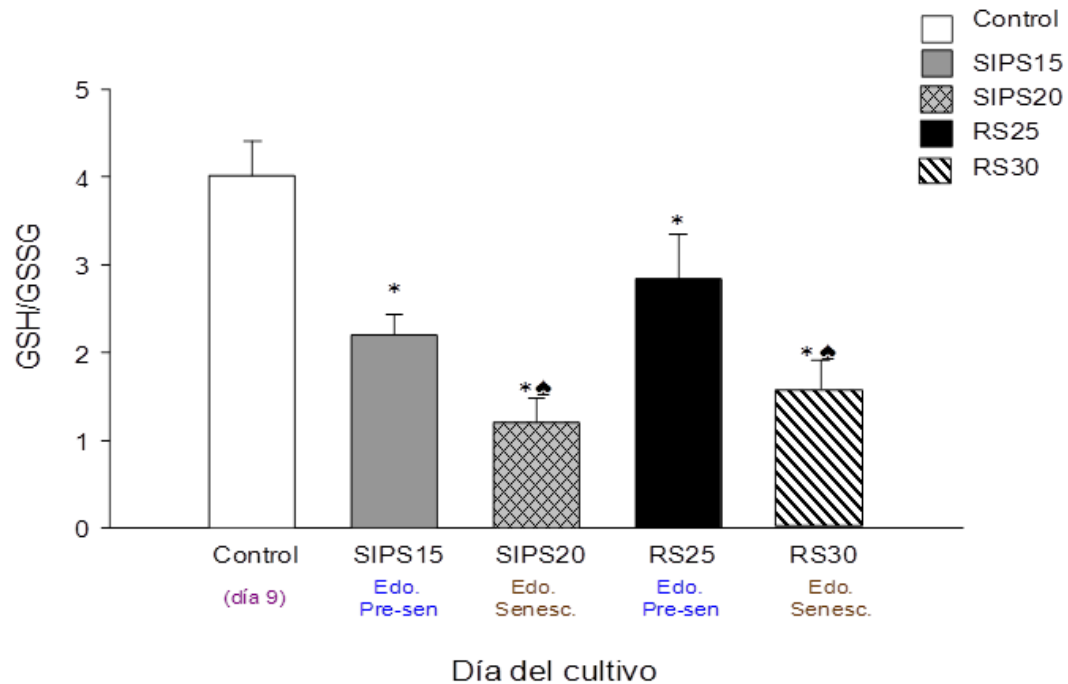


Figura 6. Estado redox durante pre-senescencia y senescencia (I). En la figura se muestran los niveles de GSH y GSSG expresados como razón GSH/GSSG. Se analizaron ambos estados pre-senescencia y senescencia para ambos modelos (SIPS y SR). Cada punto representa el promedio \pm D.E de tres determinaciones llevadas a cabo en experimentos independientes. La significancia estadística ($p < 0.05$) comparado contra el control (*) o contra su anterior (estado pre-senescente ♣) fue calculada con ANOVA + (TK).

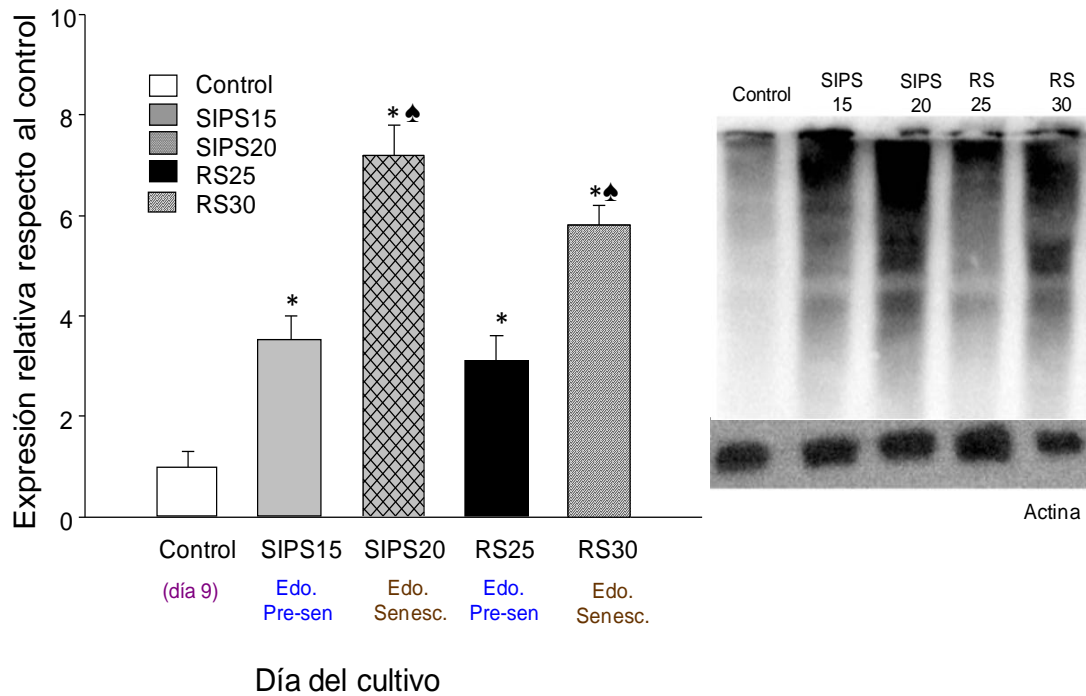


Figura 7. Estado redox durante pre-senescencia y senescencia (II). En el panel derecho se muestra un oxyblot representativo realizado con las proteínas totales aisladas de ambos estados (pre senescencia y senescencia) para ambos modelos (SIPS y SR). En el panel izquierdo se muestra el análisis densitométrico normalizado utilizando a actina como control. Cada punto representa el promedio \pm D.E de tres determinaciones llevadas a cabo en experimentos independientes. La significancia estadística ($p < 0.05$) comparado contra el control (*) o contra su anterior (estado pre-senescente ♠) fue calculada con ANOVA + (TK).

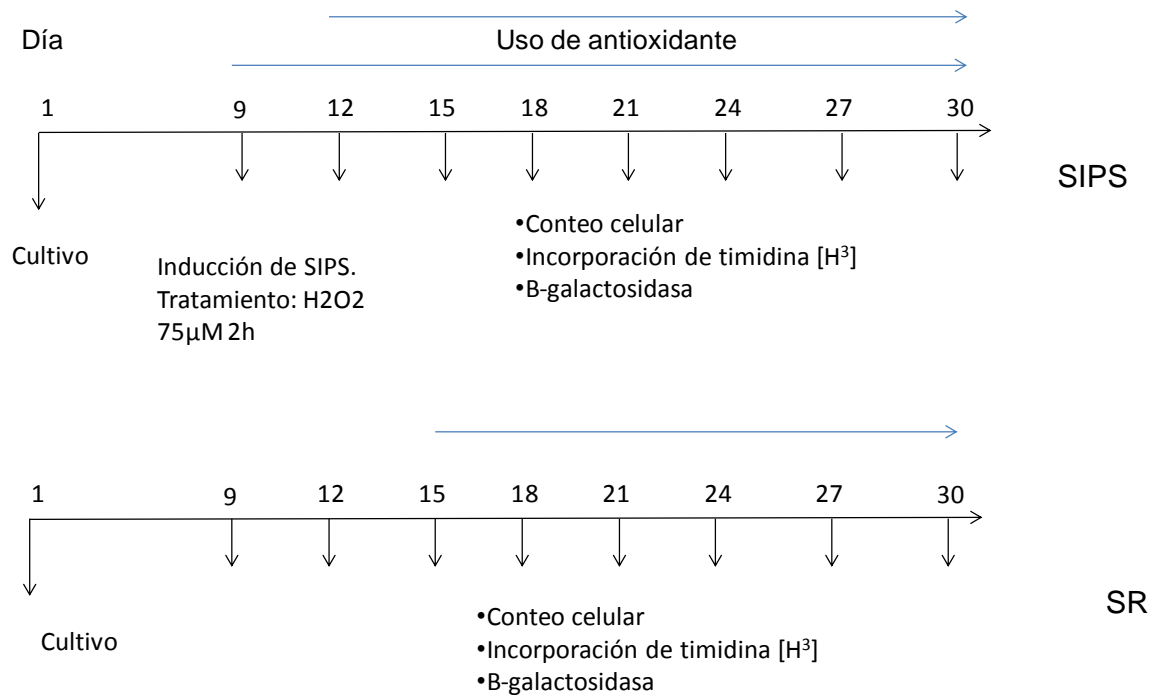


Figura 9. Diseño experimental (3). Para evaluar el efecto del estado redox sobre el desarrollo del fenómeno de senescencia desarrollamos un experimento utilizando un antioxidante (trolox) para prevenir el ingreso a senescencia. El efecto del trolox fue medido basándonos en el perfil proliferativo de ambos modelos.

8.4 Efecto del tratamiento antioxidante sobre la inducción de senescencia.

Para determinar la importancia del estado redox durante la inducción de senescencia, utilizamos un tratamiento con el antioxidante trolox en los cultivos, en ambos modelos. El uso de trolox se decidió por su característica de regular el estado redox atrapando especies reactivas sin modificar la fisiología celular. Para SR, el trolox se agregó a partir del día 12 en el medio de cultivo. En la figura 10 se muestra las células tratadas con el antioxidante aunque el cultivo tiene un alto nivel de proliferación no es estadísticamente significativo. Este dato se correlaciona con lo que se muestra en la figura 11, donde la

síntesis de ADN no tuvo un cambio significativo con respecto a las células no tratadas. Para el porcentaje de células senescentes positivas a β -galactosidasa (figura 12) las células tratadas con el Antioxidante (AOX) fue la única medición en el cual encontramos diferencias significativas con respecto a las no tratadas del día 15 al día 24 ($p < 0.05$), esto sugiere que el tratamiento retrasa brevemente la aparición de senescencia. Pasando este día no encontramos diferencias significativas.

Para el modelo de SIPS el tratamiento con el AOX llevó a las células a proliferar más allá del día 21 cuando el antioxidante se comenzó a utilizar tres días después de la inducción de SIPS (tratamiento 1) y hasta el día 24 cuando el AOX se agregó inmediatamente de la inducción de SIPS. Encontramos diferencias significativas en la síntesis de ADN en las mediciones del día 27 y día 30. De manera interesante el porcentaje de células positivas a β -galactosidasa registradas durante el tratamiento 1 disminuyó en un 50% con respecto a las células no tratadas. En el cultivo con el tratamiento 2 no encontramos diferencias significativas con respecto a las células no tratadas. Un hecho interesante fue que las células tratadas con el antioxidante conservan su morfología celular normal y la apariencia general de un fibroblasto típico en ambos modelos. Incluso en los días finales del cultivo (figura 13).

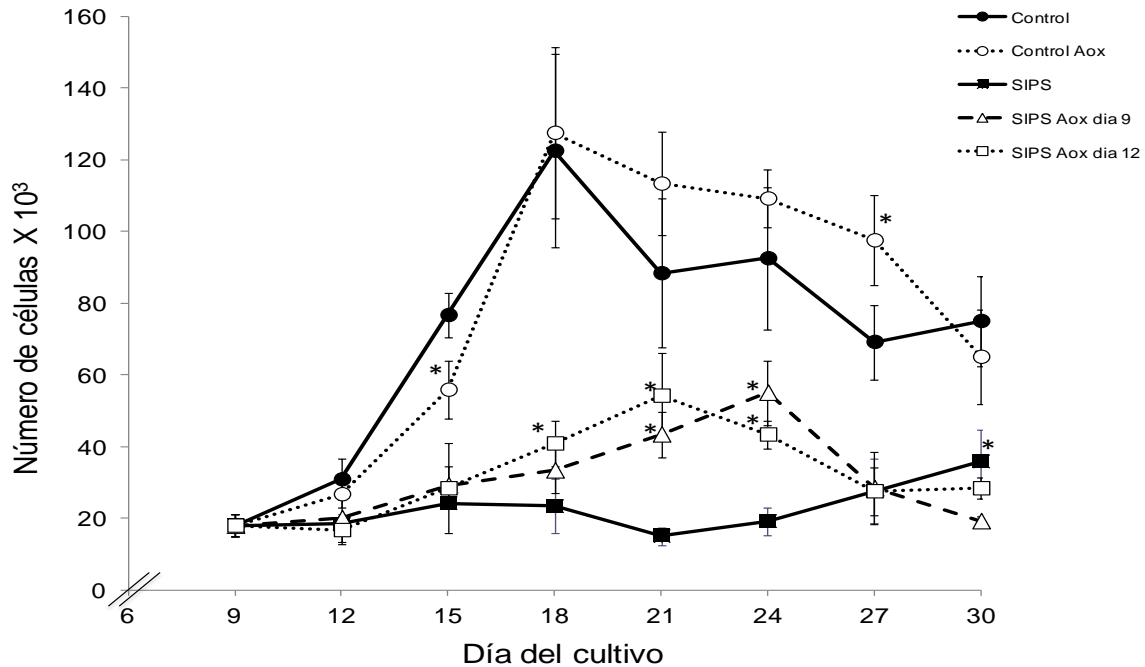


Figura 10. Efecto del antioxidante en la proliferación celular. El número de células fue obtenido por conteo directo utilizando azul tripano y una cámara de Neubauer. Las células fueron tratadas con el antioxidante trolox (0.05 M). Para SIPS el antioxidante se agregó al medio del cultivo inmediatamente de la inducción de SIPS (triángulos blancos), o después de tres días de la inducción de SIPS en el día 12 (cuadrados blancos). Para SR trolox fue añadido comenzando en el día 12 (círculos blancos). SR (círculos negros) y SIPS (cuadros negros) sin tratamiento fueron utilizados como control. Cada medición representa el promedio \pm D.E de 6 mediciones en 2 experimentos independientes (*) ($p < 0.05$). La significancia estadística comparado contra el control (*) calculada con ANOVA + (TK).

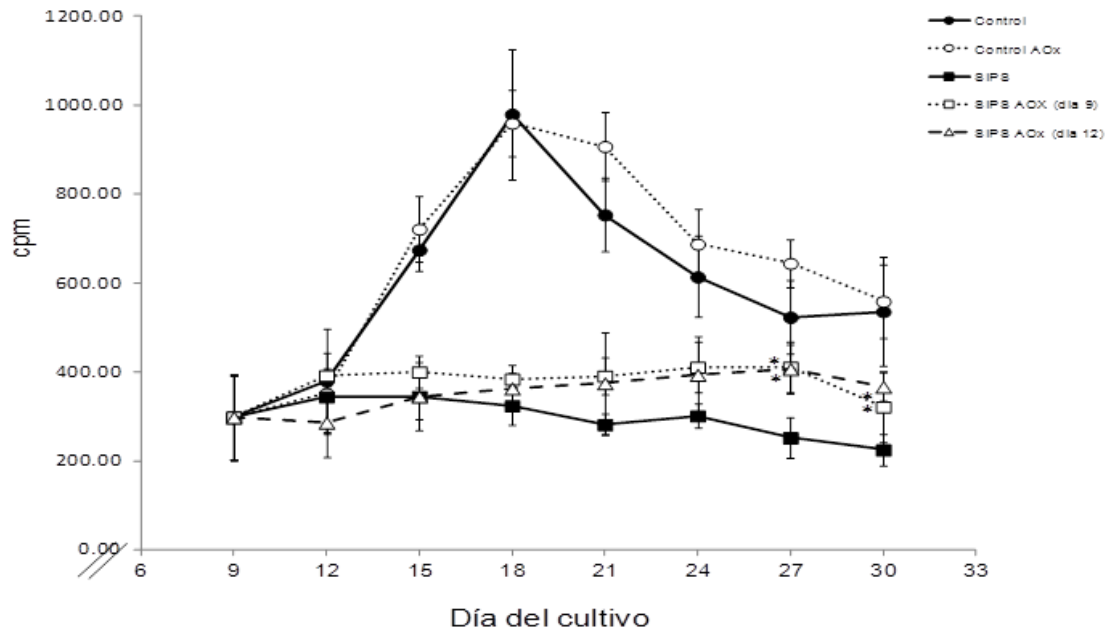


Figura 10. Efecto del antioxidante sobre la síntesis de ADN. Las células fueron tratadas con el antioxidante trolox (0.05 M). La imagen muestra la incorporación de la timidina tritiada. La medición se realizó en un contador de centelleo, los resultados se expresan en cuentas por minuto. Para SIPS el antioxidante se agregó al medio del cultivo inmediatamente de la inducción de SIPS (triángulos blancos), o después de tres días de la inducción de SIPS en el día 12 (cuadrados blancos). Para SR trolox fue añadido comenzando en el día 12 (círculos blancos). SR (círculos negros) y SIPS (cuadros negros) sin tratamiento fueron utilizados como control. Cada medición representa el promedio \pm D.E de 6 mediciones en 2 experimentos independientes ($p < 0.05$). La significancia estadística comparado contra el control (*) calculada con ANOVA + (TK).

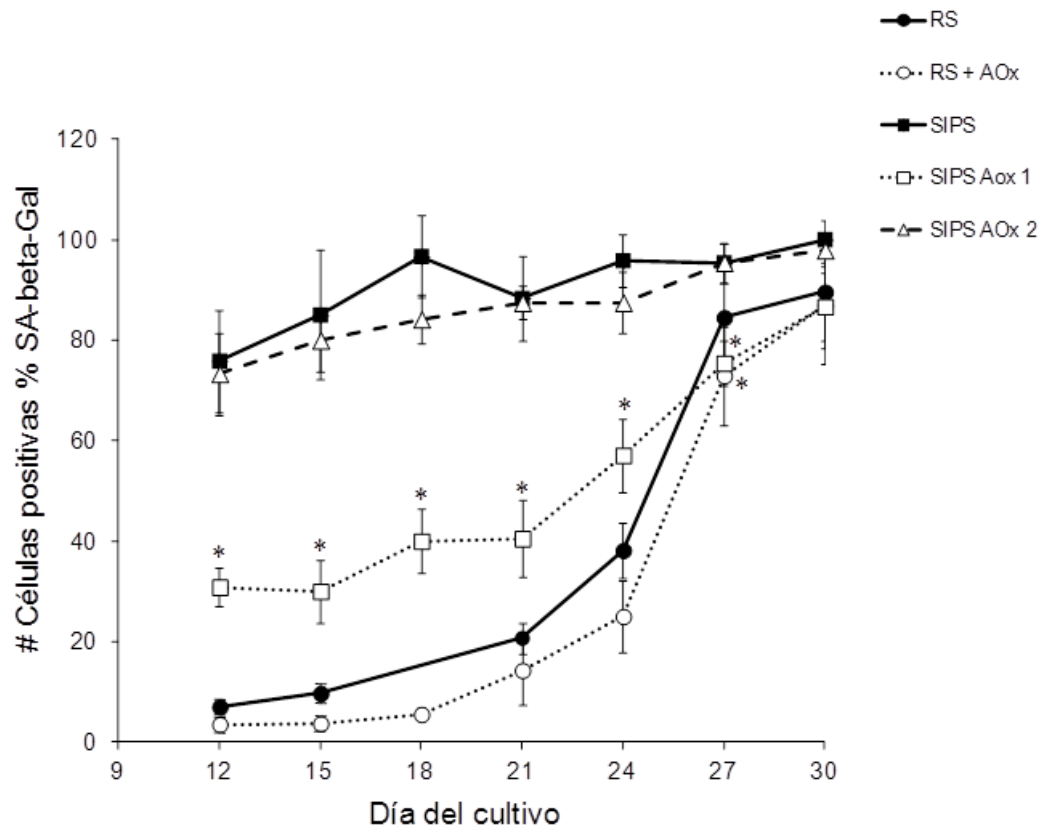


Figura 10. Efecto del antioxidante en la inducción de senescencia. Las células fueron tratadas con el antioxidante trolox (0.05 M). Para SIPS el antioxidante se agregó al medio del cultivo inmediatamente de la inducción de SIPS (triangulos blancos), o después de tres días de la inducción de SIPS en el día 12 (cuadros blancos). Para SR trolox fue añadido comenzando en el día 12 (círculos blancos). SR (círculos negros) y SIPS (cuadros negros) sin tratamiento fueron utilizados como control. Cada medición representa el promedio \pm D.E de 6 mediciones en 2 experimentos independientes ($p < 0.05$). La significancia estadística ($p < 0.05$) comparado contra el control (*) fue calculada con ANOVA + (TK).

9. Discusión

La senescencia celular es un fenómeno complejo que incluye la participación de varios factores y estímulos para lograr tanto su inducción como su establecimiento y mantenimiento. Las características principales de este fenómeno básicamente se asocian al paro del ciclo celular y la detención de la proliferación, así como a una serie de funciones fisiológicas alteradas. Por estas dos características se ha propuesto como un mecanismo dirigido a detener procesos tumorigénicos (mecanismo supresor de tumores), así como un promotor del deterioro asociado al envejecimiento [56].

A la fecha se ha demostrado la existencia de varias vías de señalización que pueden inducir el fenómeno de senescencia bajo condiciones específicas. Sin embargo la mayoría de estas investigaciones se enfocan en un solo componente de la vía, por lo que muchas veces se prefiere ignorar un panorama más amplio. Aunado a esto tenemos lo que parece ser la existencia de más de un solo tipo de fenotipo senescente con características tanto compartidas como propias, casi siempre dependientes del estímulo utilizado para tal objetivo. Además, encontramos que muchas vías de señalización son redundantes, ya que poseen nodos de comunicación cruzada y nodos que se traslapan entre sí [57, 50, 54, 21, 58]. El único factor que se mantiene constante en todos los tipos de senescencia parece depender, en mayor o menor medida, de un cambio en el estado redox que vuelve más oxidante el ambiente celular interno y externo [59]. Esta modificación del estado redox se ha considerado esencial para iniciar el fenómeno al activar señalizadores específicos asociados a la detención del ciclo celular [3, 4, 60].

Como ya se mencionó, la mayoría de las vías de señalización van dirigidas a detener la proliferación mediante la activación de uno o más reguladores negativos del ciclo celular, que serán los encargados de detener las subsecuentes divisiones celulares. Sin embargo, la activación de estos reguladores negativos parece ser insuficiente para preservar a la

célula en el estado G0 o no-proliferativo, ya que su desaparición puede ser suficiente para que las células reingresen a G1 para llevar a cabo nuevos ciclos de proliferación [60]. Por esto proponemos que más que un iniciador, un estado redox oxidante sostenido, sería el factor promotor que terminaría por establecer el fenotipo senescente completo, frenando el ciclo celular y volviendo a la célula incapaz de responder ante estímulos fisiológicos. Como ya se mencionó, p21, p16 y p27 representan el arquetipo de los reguladores negativos del ciclo celular, actuando tanto en la fase G1 (p16), como en todo el ciclo celular (p21 y p27). Por lo que en este trabajo evaluamos sus niveles durante el establecimiento de senescencia y el estado senescente completo [62, 63, 64].

Como se esperaba, los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en los tres reguladores medidos justo en los días planteados para la etapa que denominamos pre-senescencia, y que es la fase en la cual actúan los sistemas que promueven la suspensión de la proliferación (representado en día 15 para nuestro modelo SIPS y y el día 25 para el modelo de SR). En el estado de senescencia completa (día 20 para SIPS y día 30 para SR), aún y cuando el contenido de p21 y p16 siguió siendo mayor que en las células control ($p < 0.05$), encontramos un decremento en estas proteínas en comparación con el de pre-senescencia. Este comportamiento sugiere que los inhibidores del ciclo celular actúan durante la primera fase o fase de establecimiento, que es donde se inicia el programa de senescencia; pero una vez detenido el ciclo celular, otros mecanismos actúan para alcanzar y mantener el fenotipo senescente con sus características completas. Estos resultados pueden explicar porque en algunos estudios anteriores no se ha encontrado a p16 aumentado durante el estado de senescencia completa. Aún más, también pueden ofrecer una explicación para otros estudios donde se induce senescencia por la expresión ectópica de p16INK4a y que carecen del característico fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) [65]. De manera interesante, los niveles de p27 permanecieron elevados durante el estado pre-senescente y senescente completo. Esto

va de acuerdo con datos de otros grupos de investigación donde se ha reportado que existen altos niveles de p27 durante la transición de G1-G0, reportándose elevado tanto en senescencia como en quiescencia [64, 66].

Para probar la importancia del estado redox durante el establecimiento del estado de senescencia y su conservación, evaluamos el cociente de glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG). Durante el estado pre-senescente (SIPS día 15 y SR día 25) el estado redox cambió, se volvió más oxidante con respecto al control de una manera significativa ($p < 0.05$), para continuar volviéndose más oxidante cada vez, esto reflejado en la disminución de GSH/GSSG hasta alcanzar un nivel de oxidación muy elevado al llegar al estado de senescencia completa para ambos modelos (SIPS día 20 y SR día 30). Este cambio progresivo en el ambiente hacia un estado más oxidante nos habla de la importancia en el establecimiento del fenómeno. Existen numerosas referencias sobre el posible origen de las especies oxidantes (estrés oxidante mitocondrial, estrés oxidante oncogénico, etc) [67, 59], esto nos hace pensar en que todos estos sistemas pro-oxidantes pudieran estar sincronizados y trabajar a favor de elevar el nivel oxidante dentro de las células.

Un aspecto importante a considerar cuando se estudia un microambiente oxidante es la integridad funcional del proteoma o proteostasis. Las proteínas, por sus múltiples funciones y características son las principales encargadas de dirigir y definir el destino celular [6, 64]. Una alteración funcional del proteoma debido a un estado de estrés oxidante podría ser la responsable de algunas características compartidas observadas en células que presentan los diferentes modelos de senescencia. La oxidación proteínica ha sido asociada a la formación de agregados de proteínas insolubles y difíciles de degradar relacionados con enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento y senescencia [68, 69, 70]. Para abordar este tema, llevamos a cabo una determinación de proteínas

oxidadas en ambos estados y ambos modelos. Y de acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del cociente GSH/GSSG encontramos un nivel alto y significativo de proteínas oxidadas durante el estado de pre-senescencia en ambos modelos con respecto al control ($p < 0.05$). Un mayor incremento fue observado durante el estado de senescencia establecida para ambos modelos. Este aumento fue significativo con respecto al estado de pre-senescencia ($p < 0.05$). Así mismo, se ha probado que el uso de antioxidantes puede retrasar la entrada a senescencia [71, 72]. Por lo tanto, para comprobar la importancia del estado redox pro-oxidante durante el establecimiento de la senescencia, las células fueron tratadas con el antioxidante trolox. Los resultados obtenidos muestran solo una pequeña diferencia en el establecimiento de la SR, mientras que la inducción de SIPS se retrasó casi un 50% cuando las células fueron tratadas con trolox inmediatamente después del tratamiento con peróxido de hidrogeno ($75 \mu\text{M}$), pero no tuvo ningún efecto tan dramático cuando se agregó tres días después. Esto confirma la importancia de un ambiente oxidante para la inducción de SIPS. El retraso en la aparición del fenotipo senescente era esperado para SIPS pero no necesariamente para SR, modelo para el cual se propone sucede por el desgaste de las zonas teloméricas [73], confirmando con estos resultados que un cambio hacia un estado redox más oxidante puede retrasar el establecimiento del fenotipo senescente completo, sobre todo si el estímulo inicial es un estado de estrés oxidante [74].

Se ha sugerido que la senescencia *in vivo* se logra como una respuesta fisiológica ante una amplia variedad de factores estresantes [9,13, 14, 17]. Por lo tanto, el cambio en el estado redox puede ser llevado a cabo por muchas vías diferentes y no relacionadas, que eventualmente iniciaran la misma respuesta celular. Existen múltiples tipos de deterioro fisiológico que la célula puede sufrir y que pueden llevarla al desarrollo de enfermedades, por lo que es necesario detener los posibles fallos o la eliminación de la célula, esto mediante la detención del ciclo celular y la proliferación. Por esto el cambio en el estado

redox puede ser un elemento unificador y de mayor relevancia que los demás. Sin embargo, mientras el medio celular interno y externo se vuelve más oxidante, otras vías de señalización pueden activarse, generando nuevas características, como es el caso del SAPS, el cual se va modificando conforme avanza el tiempo del cultivo [9], el cual por sus características puede afectar a las células vecinas induciendo procesos cancerígenos y de envejecimiento.

10. Conclusiones

Es claro con la investigación realizada hasta ahora que existen 2 grandes factores para el establecimiento de la senescencia, uno incluye a la activación de diferentes mecanismos supresores de tumores y antiproliferativos, y el segundo un estado pro-oxidante constante tanto en el exterior como al interior de la célula. Si bien se han descrito los mecanismos de acción de cada factor, aun quedan algunas interrogantes a responder. Entre estas existen algunas que sería muy importante responder como son ¿Uno depende del otro para funcionar? O ¿Pueden trabajar por separado para llegar al mismo resultado? ¿Siguen un orden específico o suceden a la par? De responder estas preguntas experimentalmente, podremos acceder a tener un conocimiento más profundo del fenómeno de senescencia. Por mi parte me inclino a que uno funciona después del otro, siendo la activación de los mecanismos supresores de tumores o anti-proliferativos el primer suceso que inicia el fenómeno y el estrés oxidante el factor que vendrá a completar el fenotipo senescente. Si esto sucede así podríamos proponer la existencia de dos etapas durante el fenómeno de senescencia celular.

En base a nuestro modelo experimental y a los resultados obtenidos, podemos aceptar como posible la existencia de dos etapas diferentes durante el fenómeno de senescencia celular. La primera etapa está caracterizada por la acción anti-proliferativa de genes

supresores de tumores dirigida a detener la progresión del ciclo celular. La segunda se caracteriza por un estado pro-oxidante exacerbado dirigido a reforzar el fenotipo senescente completo. Debido a sus características, p16 y p21 son la respuesta inicial en detener el ciclo celular durante la primera etapa, mientras que p27 parece ser más importante en cerrar la progresión del ciclo celular durante la segunda etapa. Así mismo el tratamiento con un antioxidante (trolox en nuestro caso) retrasa efectivamente la entrada a senescencia, siendo SIPS más susceptible al tratamiento. Esto nos indica que el estímulo que inicia la senescencia es determinante para el establecimiento del fenómeno.

11. Perspectivas

Evaluar el efecto del estrés oxidante sobre la fisiología de la célula durante senescencia:

- Evaluar el efecto del estrés oxidante sobre la formación de agregados de proteína durante senescencia.
- Evaluar la localización y cantidad de lipofuscina en la célula senescente.
- Evaluar la respuesta de la célula senescente ante estímulos proliferativos y pro-apoptóticos.
- Probar que la lipofuscina influencia la fisiología de la célula senescente al evitar que la célula pueda responder ante los estímulos proliferativos y pro-apoptóticos.

12. Referencias

1. Hayflick, L. 1965. The limited in vitro time of human diploid cell strains, *Exp Cell Res*, 37: 614-636.
2. Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298–300.
3. Chen Q.; Fischer A.; Reagan J.; Yan L-J.; Ames B. 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4337–4341.
4. Fripiat C, Chen QM, Remacle J, Toussaint O. 2000. Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp Gerontol* 35: 733–745.
5. Lopez-Diazguerrero N, Lopez-Araiza H, Conde-Perezprina J, Bucio L, Ventura J, Covarrubias L, Gutierrez-Ruiz M, Zentella A, Konigsberg M. 2006. Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Rad Biol & Med*; 40,1161 – 1169.
6. Fridman A & Tainsky M. 2008. Review. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene* 1–13.
7. Benz C & Yau C. 2008. Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nat Rev Cancer*; 8(11): 875–879.
8. Benz C. 2008. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*; 66(1): 65–74.
9. Rodier F & Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192:547–556. doi:10.1083/jcb.201009094.

10. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen S Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22:4212–4222. doi:10.1093/emboj/cdg417.
11. Dimri G P, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E, Linskens M, Rubeli I, Pereira-Smith O, Peacocke M & Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in ageing skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 9363-9367.
12. Le, O.N., F. Rodier, F. Fontaine, J.P. Coppe, J. Campisi, J. DeGregori, C. Laverdière, V. Kokta, E. Haddad, & C.M. Beauséjour. 2010. Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell.* 9:398–409. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00567.x
13. Rodier, F., D.P. Muñoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J.P. Coppé, E. Campeau, C.M. Beauséjour, S.H. Kim, et al. 2011. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* 124:68–81. doi:10.1242/jcs.071340.
14. Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113:703–716. doi:10.1016/S0092-8674(03)00401-X
15. Liu, Y., H.K. Sanoff, H. Cho, C.E. Burd, C. Torrice, J.G. Ibrahim, N.E. Thomas, and N.E. Sharpless. 2009. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human.
16. Acosta, J.C., A. O’Loghlen, A. Banito, M.V. Gujjarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, & N. Popov. 2008. Chemokine signaling via the

- CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 133:1006–1018. doi:10.1016/j.cell.2008.03.038.
17. Coppé J, Patil C, Rodier F, Krtolica A, Beauséjour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PY & Campisi J. 2010. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*. 5:e9188. doi:10.1371/journal.pone.0009188.
 18. Nakamura AJ, Chiang Y, Hathcock KS, Horikawa I, Sedelnikova OA, Hodes RJ & Bonner W. 2008. Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin*. 1:6. doi:10.1186/1756-8935-1-6.
 19. Drayton S & Peters G: Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev* 2002, 12:98-104.
 20. Chandler H, Peters G. 2013. Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Curr Opin Cell Biol*. 2013 Dec;25(6):765-71. doi: 10.1016/j.ceb.2013.07.005.
 21. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP & Jackson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 426:194–198. doi:10.1038/nature02118.
 22. Rai P, Onder TT, Young JJ, McFaline JL, Pang B, Dedon PC & Weinberg RA. 2009. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106:169-174.
 23. Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z: IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'Bystander senescence'. *Aging (Albany NY)* 2012, 4:932-951.

24. Gargic S, Brookes S, Anderton E, Rowe J, Peters G: Contrasting behavior of the p18INK4c and p16INK4a tumor suppressors in both replicative and oncogene-induced senescence. *Cancer Res* 2012, 72:165-175.
25. Ohtani, N., K. Yamakoshi, A. Takahashi, & E. Hara. 2004. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* 51:146–153. doi:10.2152/jmi.51.146.
26. Swanson EC, Manning B, Zhang H, & Lawrence JB. 2013. Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *J Cell Biol.* Dec 2013.
27. Sanders YY, Liu H, Zhang X, Hecker L, Bernard K, Desai L, Liu G & Thannickal VJ. Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol.* 2013 Jan 31;1(1):8-16. doi: 10.1016/j.redox.2012.11.004.
28. Jenkins NC, Liu T, Cassidy P, Leachman SA, Boucher KM, Goodson AG, Samadashwily G & Grossman D. 2011. The p16(INK4A) tumor suppressor regulates cellular oxidative stress. *Oncogene* 30:265–274.
29. Rocco JW & Sidransky D. 2001. "p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression". *Exp. Cell Res.* 264 (1): 42–55.
30. Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez J-L, Beausejour C, Jacobs J, van Lohuizen M, Band V & Campisi J. 84 Dimri GP. 2003. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 23: 389–401.
31. Lynette Moore.; Xiongbing Lu.; Nader Ghebranious.; Stuart Tyner. & Lawrence A. Donehower. 2007. Aging-Associated Truncated Form of p53 Interacts with Wild-Type p53 and Alters p53 Stability, Localization, and Activity. *Mech Ageing Dev.* 128(11-12): 717–730.

32. Zongaro S.; de Stanchina E.; Colombo T.; D'Incalci M.; Giulotto E. & Mondello C. 2006. Stepwise neoplastic transformation of a telomerase immortalized fibroblast cell line *Cancer Res*; 65:11411–11418.
33. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, & Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817–825.
34. Yang Z, Perkins N, Ohno T, Nabel EG, & Nabel GJ. 1995. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nat Med* 1: 1052–1056.
35. Alt J, Gladden AB & Diehl JA. 2002. p21Cip1 promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J. Biol. Chem.* 277, 8517–8523.
36. Tanaka H, Yamashita T, Asada M, Mizutani S, Yoshikawa H & Tohyama M. 2002. Cytoplasmic p21Cip1/WAF1 regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J. Cell Biol.* 158, 321–329.
37. LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A & Harlow E. 1997. New functional activities for the p21 family of Cdk inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847–862.
38. Ghanem L & Steinman R. 2005. A proapoptotic function of p21 in differentiating granulocytes. *Leuk. Res.* 29, 1315–1323.
39. Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee S W & Aaronson SA. 2002. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* 21:2180–2188.
40. Sherr CJ. & Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999, 13: 1501–1512.
41. Spirin K, Simpson J, Takeuchi S, Kawamata N, Miller C, & Koeffler H. 1996. p27/Kip1 mutation found in breast cancer. *Cancer Res*, 56:2400–2404.

42. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta G, Jessup J, Pagano M. 1997. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med*, 3:231–234.
43. Pizzolo G, Magidson J, Montagnoli A, Pagano M, Maes B, De Wolf-Peeters C, Inghirami G. 2000. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 2000, 95:619–626.
44. Zeng J, Ge Z, Wang L, Li Q, Wang N, Björkholm M, Jia J, Xu D. 2009. The histone demethylase RBP2 is over-expressed in gastric cancer and its inhibition triggers senescence of cancer cells. doi:10.1053/j.gastro.2009.10.004
45. Byrne A, McLaren RP, Mason P, Chai L, Dufault MR, Huang Y, Liang B, Gans JD, Zhang M, Carter K, Gladysheva TB, Teicher BA, Biemann HP, Booker M, Goldberg MA, Klinger KW, Lillie J, Madden SL, Jiang Y. Knockdown of human deubiquitinase PSMD14 induces cell cycle arrest and senescence. 2009. *Exp Cell Res*. 316, 2, 258-271.
46. Wu PC, Wang Q, Grobman L, Chu E, Wu DY. 2012. Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy *Exp Oncol*. 2012 Oct;34(3):298-305.
47. Vairo G, Soos T, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen M, Koff A, Adams J. 2000. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27(Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol Cell Biol*.;20, 13: 4745-53.
48. Banerji L, Glassford J, Lea NC, Thomas NS, Klaus GG, Lam E. 2001. BCR signals target p27(Kip1) and cyclin D2 via the PI3-K signalling pathway to mediate cell cycle arrest and apoptosis of WEHI 231 B cells. *Oncogene*. 1; 20, 50:7352-67.
49. Toussaint O.; Medrano E. & Von Zeglinicki T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35: 927-945.

50. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, & Campisi J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741–747.
51. Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, & Saretzki G. 2003. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 278: 6824–6830.
52. Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeyer P & Mann K. 1995. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol* 15: 3892–3903.
53. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, & Erusalimsky JD. (2004). Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 117: 2417–2426.
54. Probin V, Wang Y, and Zhou D. 2007. Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway. *Free Radic Biol Med* 42: 1858–1865.
55. El envejecimiento de la población en México. Estimaciones del CONAPO con base en el XII Censo General de Población y Vivienda, 2000.
56. Judith Campisi J, Andersen J, Kapahi P & Melova S. 2011. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. Dec 2011; 21(6): 354–359. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.09.001.
57. Blazer S, Khankin E, Segev Y, Ofir R, Yalon-Hacohen M, Kra-Oz Z, Gottfried Y, Larisch S, Skorecki KL. 2002. High glucose-induced replicative senescence: point of no return and effect of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun*. 296:93–101.
58. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Orntoft T, Lukas J,

- Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, & Gorgoulis G. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444:633–637. doi:1038/nature05268.
59. Muller M. 2009. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antiox Redox Signal* 11:60–98. doi:10.1089/ars.2008.2104.
60. Baraibar MA, Ladouce R, Friguet B. 2013. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *J Proteomics*. S1874–3919(13):00249-2. doi:10.1016/j.jprot.2013.05.008.
61. Demidenko Z & Blagosklonny M. 2009. Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential. *Aging* 1:1008–1016. doi:10.4161/cc.7.21.6919.
62. Feng-Hou G, Xiao-Hui , Wei L, Hua L, Yan-Jie Z, Zhu-Ying G, Mang-Hua X, Shi-Ting W, Bin J, Feng L, Ying-Zheng Z, Yong F, Fang-Yuan C & Ying-Li W. 2010. Oridonin induces apoptosis and senescence in colorectal cancer cells by increasing histone hyperacetylation and regulation of p16, p21, p27 and c-myc. *BMC Cancer* 10:610. doi:10.1186/1471-2407-10-610.
63. Fang Y, Yu S & Braley-Mullen H. 2012. TGF- β promotes proliferation of thyroid epithelial cells in IFN- γ -mice by down-regulation of p21 and p27 via AKT pathway. *Am J Pathol* 180:650–660. doi:10.1016/j.ajpath.2011.10.009.
64. Burhans W & Heintz N (2009) The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Rad Bio Med* 47:1282–1293. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.026.
65. Coppe´ JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beausejour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PI & Campisi J. 2010. A human-like senescence-associated

- secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* 5(2):e9188. doi:10.1371/journal.pone.0009188.
66. Nakayama K, Hatakeyama S & Nakayama K. 2001. Regulation of the cell cycle at the G1–S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 282:853–860. doi:10.1006/bbrc2001.4627.
67. Meierjohann S. 2013. Oxidative stress in melanocyte senescence and melanoma transformation. *Eur J Cell Biol.* 2013 Nov 23. pii: S0171-9335(13)00084-8. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.11.005.
68. Ahmed EK, Rogowska-Wrzesinska A, Roepstorff P, Bulteau AL & Friguet B. 2010. Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Aging Cell* 9:252–272. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00555.x.
69. Gidalevitz T, Kikis EA & Morimoto RI. 2010. A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr Opin Struc Biol* 20:23–32. doi:10.1016/j.sbi.2009.11.001.
70. Dillin A & Cohen E. 2011. Ageing and protein aggregation mediated disorders: from invertebrates to mammals. *Phil Trans R Soc B* 366:94–98. doi:10.1098/rstb.2010.0271.
71. Richter T & von Zglinicki T. 2007. A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* 42:1039–1042. doi:10.1016/j.exger.2007.08.005.
72. Atamna H, Paler-Martinez A & Ames BN. 2000. N-t-Butylhydroxylamine, a hydrolysis product of -phenyl-N-t-butyl nitron, is more potent in delaying senescence in human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 275:6741–6748. doi:10.1074/jbc.275.10.6741.
73. Harley CB, Futcher AB & Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458–460.

74. Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ & Lee SW, Aaronson SA. 2002. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* 21:2180–2188. doi:10.1093/emboj/21.9.2180.
75. Rayess H, Wang M & Srivatsan ES. 2012. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*. Apr 15, 2012; 130(8): 1715–1725. doi: 10.1002/ijc.27316
76. Zhifeng Gu, Jinxia Jiang, Wei Tan, Yunfei Xia, Haixia Cao, Yan Meng, Zhanyun Da, Hong Liu & Chun Cheng. 2013. p53/p21 Pathway Involved in Mediating Cellular Senescence of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells from Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 134243. doi: 10.1155/2013/134243
77. Passos JF, Nelson G, Wang C, Torsten Richter, Simillion C, Carole J Proctor, Satomi Miwa, Olijslagers S, Hallinan J, Anil Wipat, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood T & von Zglinickia T. 2010. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol*. 2010; 6: 347. doi: 10.1038/msb.2010.5
78. Suzuki A, Tsutomi Y, Miura M, Akahane K. 1999. Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene* 1999; 18: 1239–44.
79. Lotan T, Hickson J, Souris J, Dezheng-Huo, Taylor J, Terry-Li, Otto K, Yamada SK, Macleod K, Rinker-Schaeffer CW. 2008. Protein Kinase Kinase 4–Mediated Inhibition of SKOV3ip.1 Ovarian Cancer Metastasis Involves Growth Arrest and p21 Up-regulation. *Cancer Res*; 68(7): 2166–2175. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1568
80. Wu PC, Wang Q, Grobman L, Chu E & Wu DY. 2012. Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy. *Exp Oncol*. 34(3): 298-305.

81. Chu IM, Hengst L & Slingerland JM. 2008. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 253–67.
82. García-Fernández RA, García-Palencia P, Suarez C, Sánchez MA, Gil-Gómez G, Sánchez B, Rollán E, Martín-Caballero J, Flores JM. 2014. Cooperative role between p21cip1/waf1 and p27kip1 in premature senescence in glandular proliferative lesions in mice. *Histol Histopathol*. 2014 Mar;29(3):397-406.
83. Blagosklonny MV. 2011. Cell cycle arrest is not senescence. *Aging*; 3(2).
84. Blagosklonny MV. 2012. Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging. *Aging* 4(3).
85. Galvan-Arzate S, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Vazquez-Roman B, Rios C, Santamaria A. 2005. Delayed effects of thallium in the rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food Chem Toxicol* 43:1037–1045. doi:10.1016/j.fct.2005.02.006