
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

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

EXPRESIÓN DE Bcl-2 ANTE EL RETO OXIDATIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:
ARMANDO LUNA LÓPEZ

DIRECTORA
DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

ASESORES
DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

MÉXICO, D.F., OCTUBRE 2006

COMITÉ TUTORIAL

Directora

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Profesor Titular "C"

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Profesor Titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Investigador titular "B"

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México
azentell@ifc.unam.mx

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACyT (C/PFPN-2002-35-32).

La Maestría en Biología Experimental fue apoyada por la beca otorgada durante el periodo 2004-2005 por parte de CONACyT con el No. de registro 185567.

“Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Expresión de Bcl-2 ante el reto oxidativo, con fecha 11 de Octubre del 2006”.

JURADO DE EXAMEN

Presidente

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, por darme la oportunidad de existir, de conocer día a día las maravillas que se presentan en la vida, por la dicha que representa tener a un Padre, que es mi amigo, el que me ha enseñado a luchar y esforzarme hasta el último momento y a Mamá, que es para mi la mujer mas maravillosa del Universo, ahora se gracias a ti, que nunca es demasiado tarde para empezar una nueva aventura, gracias a ambos por haberme enseñado a decidir mi destino y por apoyarme en la realización de mis sueños...sueños que empezaron con la admiración que tengo por cada uno de mis hermanos: José, que siempre puede hacer todo...nadie para mí, es mejor que él; Alicia, la imagen de honestidad... pero no se que hubiera hecho sin la ternura y amor con la que siempre me has cuidado; Josefina, la de los negocios...sin embargo...tú eres la mas bella, la alegría de mi familia; Carmen, alguien que me enseñó que trabajando puedo hacer los sueños realidad...ahora eres una gran mamá; Polo, del que aprendí, que ningún golpe que te de la vida, es lo demasiado fuerte como para no levantarte...eres un gran guerrero; Isa, la rebeldía, la libertad...mas bien...vivir siempre por lo que se quiere, tal vez mañana no exista el momento; Javier, siempre he admirado de ti, los sueños que tienes y como siempre usas tú creatividad para luchar en este mundo tan difícil...pero sobre todo, quiero agradecerles por amarme tal como soy...!!!

Quiero agradecer a toda mi familia, que siempre está en mi corazón, son la fuerza de mi vida: Enrique, Helia, Ariel, Eddie, Ibed, Alberto mis cuñados que siempre me han dado el apoyo y el cariño para seguir adelante.

A mis sobrinos: Tere, Pepi, Quique, Fer, Mine, Jorgito, Alice, Gaby, Axelman, Tavito, Arielito, Toñito, Miguelito, Alondrita, Dana, Virgi y Daniela, porque siempre he aprendido de algo de cada uno de ustedes, y porque saben que los amo y que siempre seré su amigo.

A mis sobrinos nietos: José Carlos, Christian, Rafita y Dieguito...por existir...los amo bebés...!!!

A Mina, porque durante su estancia en su laboratorio, me ha hecho parte de su familia, me ha enseñado a crecer en mi vida estudiantil a trabajar en equipo y con armonía, que todo esfuerzo en la vida al final tiene una recompensa, que no importa que tan grande sea Goliat, al final, David siempre saldrá victorioso...!!! Muchas gracias por confiar en mí y en apoyarme en cumplir mis sueños. Gracias por ayudarme a ser una mejor persona y porque hace hasta lo imposible por entenderme, es usted, un ejemplo a seguir...!!!

Al Dr. Pablo, por su confianza, apoyo, sus consejos y sobre todo por su amistad, que me ha brindado desde que lo conocí, a usted le debo, el gran amor que tengo a mi carrera y a todos los Biólogos Experimentales, gracias por acompañarme en la lucha por ser siempre mejor...!!!

Al Dr. Alejandro porque siempre tiene un momento para escuchar mis proyectos, porque siempre me brinda su apoyo para cumplir mis metas y porque sus consejos siempre han ayudado en mi desarrollo académico...sobre todo, por confiar en mí.

A la Dra. Conchita porque siempre me ha apoyado en todo momento, siempre tiene usted un momento para escucharme y darme consejos, porque su apoyo ha sido fundamental en el desarrollo de este trabajo, gracias por confiar en mí.

A Norma, Cristina, Paola, Viridiana, Nashely, Alejandro, Hugo y Cristóbal, mis compañeros de Laboratorio, por su apoyo, confianza y sobre todo, porque gracias a ustedes, he aprendido a ser una mejor persona y con ustedes he vivido momentos inolvidables.

A Lety que me siempre me apoya, escucha y comparte mis alegrías y tristezas...eres una gran amiga.

A mis amigas Inés, Varenka, Ángeles, Elsa, Tania y Gabriel, por compartir grandes momentos en mi vida, su apoyo y confianza son importantes en mi vida...!!!

A Xochil y Alex, porque siempre me han escuchado y apoyado, se que siempre puedo contar con ustedes...!!!

A mis amigos Gabriel, Araceli, Miguel, Luis Antonio, Guillermo y Ramiro, por vivir siempre conmigo momentos inolvidables, por su apoyo y confianza y sobre todo, porque a pesar del tiempo y la distancia me quieren tal como soy...!!!

A Kika, Alice, Argelia, Erick, Carlos, Eloir, Javier y Ricardo por los grandes momentos que siempre pasamos juntos...!!!

A mi amigo Ricardo, porque desde que te conocí me has brindado tu apoyo, confianza, me has enseñado la lealtad y que no hay nada en la vida mas importante que ayudar a las personas, y sobre todo, que siempre hay una solución para cada problema, eres una persona que admiro por su gran calidad humana, gracias por los grandes momentos que hemos pasado juntos...!!!

A Adriana, porque desde que llegaste a mi vida, la has llenado de luz y amor, porque tú compañía me ha dado fuerzas para hacer realidad mis sueños, porque con tú compañía el trabajo es mas sencillo, porque compartes conmigo los triunfos y las derrotas, porque ríes y sufres a mi lado, eres mi apoyo y mi seguridad, gracias amor por ser mi compañera, no ha nadie que me comprenda como tú, por eso y por muchas cosas mas, te dedico mi vida y mi esfuerzo de cada día...mi AMOR POR TI, ES LO QUE ME HACE EXISTIR...!!!

“La vida esta llena de sueños, pero con trabajo y esfuerzo, podemos hacerlos realidad...”

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Especies reactivas de oxígeno.....	7
1.2 ROS y senescencia replicativa.....	9
1.3 La proteína Bcl-2.....	13
1.4 Funciones de Bcl-2.....	14
1.5 La proteína BAX.....	19
2. ANTECEDENTES.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVO.....	26
4.1 Objetivos particulares.....	26
5. HIPÓTESIS.....	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
6.1 Modelo biológico.....	28
6.2 Cultivo celular.....	28
6.3 Determinación del tiempo máximo de expresión del ARNm que codifica para Bcl-2.....	29
6.3.1 Extracción de ARN total.....	29
6.3.2 Integridad de ARN total.....	31
6.3.3 Reacción de retrotranscripción.....	31
6.3.4 Reacción de PCR.....	32

6.3.5 Electroforesis.....	33
6.3.6 Expresión de Bcl-2.....	33
6.4 Determinación de la cinética de la expresión de Bcl-2 y Bax ante diferentes retos oxidativos.....	34
6.5 Morfología celular.....	34
6.6 Viabilidad celular.....	35
6.7 Determinación de la funcionalidad mitocondrial (ensayo MTT).....	35
6.8 análisis estadístico.....	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1 Determinación de la cinética de la expresión de Bcl-2 a diferentes tiempos frente a un mismo reto oxidativo.....	37
7.1.1 Morfología de los cultivos en presencia de H ₂ O ₂	37
7.1.2 Viabilidad y funcionalidad de los cultivos en presencia de H ₂ O ₂	38
7.1.3 Tiempo de máxima expresión de Bcl-2.....	39
7.2 Determinación de la cinética de la expresión de Bcl-2 ante diferentes retos oxidativos.....	39
7.2.1 Morfología de los cultivos en presencia de diferentes dosis de H ₂ O ₂	40
7.2.2 Viabilidad y funcionalidad de los cultivos en presencia de diferentes dosis de H ₂ O ₂	41
7.2.3 Expresión de Bcl-2 en presencia de diferentes dosis de H ₂ O ₂	42
7.3 Determinación de la cinética de la expresión de Bax ante diferentes retos oxidativos.....	43
7.4 Índice de expresión Bcl-2/Bax.....	44
8. DISCUSIÓN.....	47

9. CONCLUSIÓN.....	52
10. PERSPECTIVAS.....	54
11. REFERENCIAS.....	55

RESUMEN

El envejecimiento es un fenómeno biológico complejo e inevitable que se caracteriza por la pérdida o decaimiento de varias funciones bioquímicas estructurales y fisiológicas de los organismos a lo largo de su vida. La teoría del envejecimiento de Harman sugiere que este proceso se da por la acumulación de daños generados por los radicales sobre las macromoléculas celulares. Actualmente, el consenso general en cuanto a los mecanismos que inducen el envejecimiento, es que se lleva a cabo por procesos multifactoriales y que las especies reactivas de oxígeno son un factor que contribuye en alto grado.

La proteína Bcl-2 tiene una función de supervivencia celular tanto por su papel antiapoptótico como por su regulación del ciclo celular vía p130 y p27, así como el aumento en la actividad de los sistemas reparadores de daño al ADN. Sin embargo, una de sus funciones más importantes es su participación en la respuesta antioxidante, en donde al sobre-expresarse se ve aumentada la actividad de las enzimas antioxidantes y con ello se modifica el balance en el estado redox celular. Es por eso relevante establecer la relación de Bcl-2 con otros fenómenos biológicos que también están asociados con un estado de estrés oxidativo, y que conllevan a diferentes respuestas celulares, como lo son la apoptosis, el cáncer o la senescencia replicativa.

El objetivo de este trabajo fue el determinar el efecto de la inducción de un estado de estrés oxidativo mediante diversas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre la expresión de la proteína Bcl-2, así como la obtención del índice de

supervivencia celular de acuerdo a la expresión Bcl-2/Bax en la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L-929.

Para ello se cuantificó la expresión del ARN mensajero (ARNm) que codifica para Bcl-2 por medio RT-PCR semicuantitativo en fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 sometidas a concentraciones de 50, 100, 150 y 200 μM de H_2O_2 durante 9 horas. De manera interesante se encontró un incremento estadísticamente significativo en la expresión del ARNm de Bcl-2 con el tratamiento de 50 μM de H_2O_2 , no así en los demás tratamientos. Así mismo se determinaron los parámetros de viabilidad y funcionalidad celular por medio de las técnicas de exclusión de azul tripano y MTT respectivamente, encontrándose una disminución significativa en ambos parámetros únicamente en el tratamiento con 200 μM de H_2O_2 .

Estos resultados muestran que el aumento en la expresión de Bcl-2 se da a bajas concentraciones de H_2O_2 . Una posible explicación es que la regulación de la expresión de Bcl-2 podría estar determinada por el daño oxidativo al ADN.

Al evaluarse los niveles de expresión de la proteína proapoptótica Bax se encontró un ligero aumento bajo las mismas condiciones de tratamiento, y el índice de expresión Bcl-2/Bax obtuvo un valor menor a 1.0 en los tratamientos de 100, 150 y 200 μM . Los resultados sugieren que las células no pueden manejar el reto oxidativo, que posiblemente genere daños que modifiquen la respuesta celular, y que por tanto, la llevan a la muerte.

ABSTRACT

Aging is a complex and inevitable biological phenomenon that is characterized by the loss of several biochemical, structural and physiological functions in the organisms throughout their lifespan. Harman's aging theory suggests that this process is the result of the overall accumulated damage on cellular macromolecules generated by free radicals. Now a days, it is thought that aging is induced by a multifactorial process in which oxygen reactive species play an important role.

Bcl-2 is a survival protein due to its antiapoptotic task, as well as its role in cell cycle regulation through p130 and p27. Bcl-2 also increases DNA repair systems. However, one of Bcl-2 most important functions is its participation in antioxidant response, its over-expression has shown to increase antioxidant enzymes activity and modify cellular oxidative state. For these reasons is relevant to establish the relation between Bcl-2 and other biological phenomenon associated with oxidative stress that can lead to different cellular responses like apoptosis, cancer or Replicative senescence.

In this work the effect of oxidative stress on Bcl-2 expression was determined as well as the cellular survival index (Bcl-2/Bax ratio). All the experiments were done in the L-929 mice lung fibroblasts cell line. Cells were subjected to 50, 100,150 y 200 μ M H₂O₂ for 9h. Bcl-2 messenger RNA (RNAm) was determined by semiquantitative RT-PCR

Interestingly, a statistical difference in the increment of Bcl-2 RNAm was only found in 50 μ M H₂O₂ treatment and not in the other treatments. Viability and functionality parameters were also quantified using trypan blue and MTT assays respectively.

The results indicated a statistical decrease in both parameters only in 200 μ M treatment.

Our results show an increase in Bcl-2 expression at low oxidative concentrations. One possible explanation is that Bcl-2 regulation might be related to DNA oxidative damage. When the expression of the anti-apoptotic protein Bax was performed in the same treatment conditions, a low increase was found. The ratio Bcl-2/Bax was lower than 1.0 in the treatments with 100, 150 and 200 μ M, suggesting that the cell might not be able to handle high oxidative stress. This oxidative stress might induce damages that modify cellular response and provoke cellular death.

1. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un fenómeno biológico complejo e inevitable que se caracteriza por la pérdida o decaimiento de varias funciones bioquímicas estructurales y fisiológicas de los organismos a lo largo de su vida. Puede añadirse a esta definición el aumento en la probabilidad de muerte en relación con el aumento en la edad del organismo, así como, la acumulación de diversos cambios adversos en la expresión génica (Harman, 1998). Las modificaciones que se presentan en los constituyentes del ADN durante el envejecimiento, se correlacionan con la disminución de los factores que se encargan del mantenimiento y la reparación de este, los cuales contribuyen a la disminución de la longevidad de un organismo. Esta acumulación de daños también repercute en la calidad de vida de los organismos, ya que existe la correlación directa entre la aparición de diversas enfermedades con el incremento de la edad (Pérez-Campo y col. 1998).

En 1956, Harman propuso la teoría del envejecimiento por radicales libres, que sugiere que este proceso se presenta por la acumulación de daños generados por moléculas químicas altamente reactivas sobre las macromoléculas celulares como lo son el ADN, los lípidos y las proteínas (Harman, 1956). El desarrollo de las técnicas que permiten el estudio mas preciso y detallado del efecto de los radicales libres, así como el avance en la biología molecular, han permitido la adquisición de nuevos datos que apoyan la teoría de Harman y confirman el papel del estrés oxidativo como uno de los principales contribuyentes en el proceso del

envejecimiento y en el origen de un gran número de enfermedades (Ames y col., 1993; Yu, 1996; Yu y Yang, 1996; Sohal y Orr, 1995).

El **estrés oxidativo** es un estado celular que se presenta cuando hay un desbalance entre las moléculas oxidantes en comparación con las moléculas antioxidantes, favoreciendo a las primeras. Las moléculas oxidantes son productos del metabolismo normal de los organismos aeróbicos (Ames y col., 1993; Yu y Yang, 1996; Ames y Shineaga, 1992).

Actualmente, el consenso general en cuanto a los mecanismos que inducen el envejecimiento, es que se lleva a cabo por procesos multifactoriales y que las especies reactivas de oxígeno (ROS, del idioma inglés *Reactive Oxygen Species*) son un factor que contribuye en alto grado; aún cuando el grado en el cual contribuye resulta todavía incierto. No obstante, resulta de gran interés buscar los factores que modulan los niveles de ROS y proponer un mecanismo para disminuir el estrés oxidativo y el daño a las macromoléculas celulares, así como el tratar de alterar el curso de este proceso o bien minimizar el deterioro asociado al envejecimiento.

Estudios en donde se sobreexpresaron genes que codifican para enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa, en el modelo de *Drosophila melanogaster* demostraron que la longevidad aumentaba un 34% con respecto a su control (Orr y Sohal, 1994); un dato importante en este estudio fue que sólo se logró este efecto cuando los niveles de expresión de la catalasa y la SOD se encontraban en un balance óptimo entre ellas. Por otra parte, utilizando otro modelo biológico de estudio como lo es *Caenorhabditis elegans*, se encontró que el nematodo aumentaba dos veces su longevidad al aumentar los

niveles de las enzimas SOD y catalasa (Vanfleteren y De Vreese, 1996), al igual que con el modelo de *Drosophila* en el cuál se sobreexpresaban la SOD y la catalasa, con lo que se observó que la disminución en las ROS aumentó la longevidad . Sin embargo, cuando se eliminaron los genes de SOD y glutathion peroxidasa en ratones, estos animales no envejecieron más rápidamente que los controles, esto probablemente se debía a que los ratones presentan otros mecanismos enzimáticos antioxidantes que sustituyen la función de estas enzimas, tal es el caso de la catalasa por la glutatión peroxidasa (Melov y col., 1998; Ho y col., 1997).

Al ser el envejecimiento un proceso multifactorial, es importante evaluar algunos otros factores biológicos relacionados con el estrés oxidativo, por lo que resulta importante evaluar a los distintos marcadores biológicos generados posteriormente al aumento de las moléculas oxidantes en comparación con las moléculas antioxidantes, entre estos marcadores destacan los generados por el daño oxidativo a lípidos como el malonildialdehído, la formación de carbonilos en las proteínas por oxidación y tal vez, el más importante la oxidación del ADN, que repercutirá directamente en la expresión génica (Markesbery, 1997).

1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Los radicales libres son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1994). La principal fuente generadora de radicales libres en las células es el metabolismo del oxígeno, ya que al recibir un electrón éste da origen al radical superóxido (O_2^{\bullet}), el cual se forma como resultado

de diferentes procesos fisiológicos. Entre esos procesos destacan la biotransformación de fármacos por la familia de citocromos p450 (Hasler y col., 1999), el metabolismo catalítico de los ácidos nucleicos mediante la xantina oxidasa y principalmente la cadena respiratoria mitocondrial, en donde el complejo III es el principal productor, ya que durante la transferencia de electrones la semiquinona puede ceder un electrón al oxígeno para formar la quinona y al radical superóxido (Turnes y col., 1985).

El radical O_2^{\bullet} puede aceptar un electrón más y formar el anión peróxido (O_2^{-2}), que no es un radical libre por no tener electrones libres desapareados. Esta molécula, en condiciones fisiológicas se protona dando lugar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mediante una reacción que ocurre de manera natural en las células y es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), como un mecanismo de defensa antioxidante. Sin embargo, el H_2O_2 puede llegar a tener un rompimiento homolítico del enlace O-O, lo que da origen al anión hidroxilo (OH^-) y al radical libre hidroxilo (OH^{\bullet}), reacción que es catalizada por metales de transición interna como el fierro y el cobre y es conocida como reacción de Fenton. Por lo anterior, podemos denominar a los radicales libres generados en el metabolismo aeróbico y a sus productos generadores de radicales libres como especies reactivas de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Existe una gran cantidad de evidencias que indican que las ROS generadas durante el metabolismo celular son una fuente endógena de daño a las biomoléculas en todos los tipos celulares. Las modificaciones oxidativas que se acumulan a lo largo de la vida se han implicado en procesos carcinogénicos,

enfermedades degenerativas y envejecimiento (Beal, 2002). En particular, el daño generado en el ADN por las ROS es uno de los más importantes a considerar, ya que al dañar esta biomolécula se puede contribuir a cambios que potencialmente son mutagénicos y que pueden contribuir al desarrollo del cáncer y otras enfermedades (Halliwell y Gutteridge, 1984). El daño al ADN puede manifestarse como rompimientos de cadena sencilla (SSB, del idioma inglés *single strain break*), rompimientos de cadena doble (DSB, del idioma inglés *double strain break*) y modificaciones químicas en los grupos funcionales de las bases nitrogenadas del ADN, conocidas como aductos. El radical OH^\bullet puede atacar directamente al ADN oxidando las bases y generando aductos como la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Una consecuencia de este tipo de daño al ADN es que puede provocar cambios en la secuencia genómica al sustituir una base púrica, como la guanina, por una base pirimidica, como la timina; a este tipo de mutación se le conoce como transversión (Spencer y col., 1996). Por otra parte, el daño al ADN, además de jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica, también se ha relacionado con otro fenómeno relacionado al envejecimiento como lo es la senescencia replicativa.

1.2 ROS Y SENESCENCIA REPLICATIVA

Las células somáticas normales no proliferan indefinidamente, por lo que al punto en donde se llega al límite de las divisiones se le conoce como límite de Hayflick; este hecho fue descrito por primera vez en fibroblastos normales de tejidos humanos en los años 60's (Hayflick, 1965).

Típicamente, los fibroblastos derivados de embriones humanos detienen su crecimiento después de tener entre 50 y 80 duplicaciones poblacionales (PD, del idioma inglés *Population Doublings*, que es una unidad para representar el número de divisiones celulares). Por otra parte, se ha reportado que los fibroblastos provenientes de organismos viejos tienen menos PD que los fibroblastos provenientes de organismos jóvenes (Cristofalo y col., 1998). Basado en estas observaciones, Hayflick postuló que este fenómeno reflejaba el proceso de envejecimiento *in vivo* y lo llamó senescencia celular, donde las células senescentes se mantienen vivas y tienen un metabolismo activo, pero no responden a estímulos mitogénicos (Gaffinkel y col., 1996).

Asimismo, se sabe que la senescencia tiene un fenotipo dominante, ya que se ha observado que la fusión entre células jóvenes en crecimiento y células viejas senescentes tiene como resultado la inhibición en la síntesis de ADN de las células híbrido (Norwood y col., 1974; Yanishevsky y Stein, 1980). Por otra parte, el citoplasma enucleado de las células senescentes mostró efectos inhibitorios en la proliferación celular llevados a cabo en experimentos en donde se fusionaron con células jóvenes (Burner y col., 1983; Drescher-Lincoln y Smith, 1983).

Estos resultados indican que la senescencia no es un fenómeno pasivo, semejante a la acumulación de errores catastróficos, ya que existe una gran evidencia que sugiere que los mecanismos que determinan la senescencia pudieran estar relacionados a una respuesta celular al estrés. Cuando dos líneas celulares de fibroblastos inmortales se fusionan, en algunos pero no en todos los casos, las células resultantes se convierten en mortales y presentan fenotipos senescentes (Pereira-Smith y Smith, 1983). Usando este modelo, las líneas celulares de

fibroblastos inmortales humanos podrían ser clasificadas dentro de diferentes grupos de complementación en términos de su habilidad para inducir senescencia sobre las células fusionadas. Estos resultados sugieren que el fenotipo senescente es dominante al de la inmortalidad; que éste podría ser más activo, que existe más de un mecanismo independiente en las células somáticas normales para inducir senescencia.

Las células senescentes presentan generalmente un número de características fenotípicas muy particulares, incluyendo las de la apariencia grande y aplanada, la detención del ciclo celular en la fase G1, la expresión alterada de genes y diferentes marcadores (Sherwood y col., 1988). Estas células se encuentran metabólicamente activas, pero pierden la capacidad de responder a estímulos mitogénicos y de iniciación de la síntesis de ADN. La incapacidad en la progresión del ciclo celular a la fase S no les impide expresar diferentes genes que se encuentran activos en esta fase como lo son c-myc, c-Ha-ras, ornitina descarboxilasa y timidina cinasas (Rittling y col., 1986 y Seshadri y Campisi, 1990), pero de manera interesante, las células senescentes disminuyen notablemente la expresión de los componentes del factor de transcripción AP-1, c-fos y c-jun, por lo que la actividad de AP-1 se encuentra disminuida (Riabowol y col., 1992). Otra característica de las células senescentes es el aumento en la actividad de la enzima β -galactosidasa, que aunque aún no se sabe su significado biológico, pero que se ha utilizado como marcador de senescencia en el ensayo SA- β -gal (Dimri y col., 1995).

La senescencia puede ser inducida de diferentes maneras, pero todavía no se ha determinado el mecanismo que la propicia, sin embargo, existen varias propuestas

para adquirir este fenotipo. La primera sugiere un acortamiento en la longitud de los telómeros, lo cual desarregla la estructura telomérica, que activa múltiples mecanismos que llevan a la detención del ciclo celular. Los telómeros son la parte terminal de los cromosomas y su función es la de mantener la estabilidad de éstos, su protección ante la degradación y evitar la fusión con otros cromosomas; los telómeros consisten de secuencias repetidas de TTAGGG, las cuales se van acortando progresivamente con cada replicación del ADN. No obstante, está no es la única forma de inducir la senescencia, ya que ante un estado de estrés oxidativo que genera daño al ADN, se puede lograr la detención irreversible en el ciclo celular y la manifestación fenotípica de las características de la senescencia, sin el acortamiento de los telómeros, fenómeno que se ha llamado senescencia prematura inducida por estrés (SIPS, del idioma inglés *Senescence Induced Premature Stress*) (Lundberg y col., 2000). Se ha logrado inducir SIPS por tratamientos con radiaciones ultravioleta (UV) y Gamma, por estrés oxidativo usando H₂O₂ o hiperoxia oxidante (Chen, 2000), utilizando inhibidores de desacetilasas de histonas o la sobreexpresión de genes como *ras* y *raf* (Pantoja y Serrano, 1999). Sin embargo, existe controversia con respecto al mecanismo por el cual las células entran en senescencia, ya que se ha encontrado que en algunas ocasiones, se ha logrado inducir SIPS en células inmortalizadas que sobreexpresan la retrotranscriptasa reversa telomérica humana (hTERT del idioma inglés, *human Telomerase Reverse Transcriptase*) que es la subunidad catalítica de la enzima telomerasa, encargada de alargar los telómeros en células germinales, tallo y tumorales, sugiriendo que en estos casos la presencia de la telomerasa no protegió a las células de SIPS. En esos experimentos se observó

que las células que sobreexpresan hTERT fueron más resistentes a la apoptosis y la necrosis inducida por estrés, sugiriendo un mecanismo de reparación en el que se podría encontrar involucrada la telomerasa (Gorbunova y col., 2002).

Se ha sugerido que, durante el envejecimiento la disminución en las funciones biológicas está determinada por la acumulación de las células senescentes, a las cuales se les ha dado la función biológica de supresión de tumores (Campisi, 2001). De este modo, resulta interesante entender la participación de las proteínas que están asociadas con la detención del ciclo celular, la preservación de la integridad del genoma, así como aquellas que participan en la respuesta antioxidante. Entre estas proteínas destaca la proteína Bcl-2 que, además de su función antiapoptótica, participa en la regulación del ciclo celular y en la defensa contra el estrés oxidativo.

1.3 LA PROTEÍNA Bcl-2

La proteína Bcl-2 pertenece a una familia de al menos 20 miembros relacionados con el fenómeno de apoptosis. Esta familia se divide en dos grandes grupos: el primero, de las proteínas proapoptóticas que incluye a Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid, Bad, Hrk, entre otras. En el segundo grupo se ubican las proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, A1, mcl-1. Se sabe que los miembros de esta familia tienen 4 dominios conservados llamados *dominios homólogos* de Bcl-2 conocidos como BH1, BH2, BH3 y BH4. Una característica distintiva entre los grupos es que las proteínas antiapoptóticas presentan generalmente los cuatro dominios, mientras que las proapoptóticas pueden tener de 1 a 3 dominios (Adams y Cory, 1998).

En particular, Bcl-2 es una proteína de 26KDa anclada a la membrana externa mitocondrial, característica que se ha relacionado con su propiedad antiapoptótica, ya que controla la permeabilidad mitocondrial, evita la liberación del citocromo c por el canal de aniones dependiente de voltaje (VADC, del idioma inglés *Voltage Anion Dependent Channel*), previniendo la unión con el factor activador de la apoptosis (APAF-1, del idioma inglés *Apoptosis Activator Factor-1*). De esta manera no se activa la procaspasa-9 ni tampoco la caspasa-3, evitando la muerte por apoptosis (Baliga y Kumar, 2002).

1.4 FUNCIONES DE Bcl-2

Se ha demostrado que Bcl-2 también tiene la posibilidad de activar mecanismos antioxidantes ya que induce el aumento en la síntesis de glutatión reducido (GSH), el cual contrarresta los niveles de ROS y disminuye la lipoperoxidación (Hockenbery y col., 1993). Se ha sugerido que parte de esta capacidad antioxidante de Bcl-2 se debe a que, bajo ciertas condiciones, induce el aumento moderado de ROS lo cual estimula una respuesta antioxidante eficiente por parte de las células (Steinman, 1995). Así mismo, se ha relacionado a Bcl-2 con el aumento en los sistemas de reparación del ADN, que pueden ayudar a contrarrestar los daños generados por las ROS (Deng y col., 1999). Las propiedades de supervivencia celular de Bcl-2 y de algunos de los miembros de su familia han sido extensamente estudiadas (Adams y Cory, 1998) y están relacionadas con sus efectos fisiológicos (Lee y col., 2001, a, b) y su capacidad de regular el ciclo celular (Vairo y col., 2000), por lo que Bcl-2 pudiera tener un papel fundamental en los mecanismos de supervivencia celular.

Como se ha señalado, la proteína Bcl-2 está estrechamente relacionada con los eventos de estrés oxidativo, los cuales se caracterizan por la disminución en los niveles de antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, así como por cambios en los mecanismos de reparación de biomoléculas. Así, la expresión de esta proteína debe estar bajo el control de ciertos factores de transcripción que respondan a cambios en el estado redox celular o del estrés oxidativo. A su vez, la regulación de esos factores de transcripción específicos debe ocurrir posteriormente al evento oxidativo, para iniciar o retardar el evento apoptótico o, de otra manera, estimular los procesos de reparación celular. Es posible que estos procesos sean dirigidos por los niveles de ROS presentes durante el evento oxidativo (Haddad, 2004a).

El estado redox celular está determinado por el cociente de los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). Cuando los niveles de GSH son mayores que los de GSSG, el estado fisiológico celular está en óptimas condiciones y, por el contrario, cuando los niveles de GSSG son superiores a los de GSH, la célula se encuentra en un estado de estrés oxidativo y responde mediante el aumento de las defensas antioxidantes. Esta respuesta puede estar mediada por la activación de distintos factores de transcripción, entre los que destacan el factor activador-1 (AP-1, del idioma inglés *Activator Protein-1*) y el factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB, del idioma inglés *Nuclear Factor κB*). Una posible explicación a esta respuesta celular antioxidante es que cuando varía el estado redox celular, los grupos funcionales más susceptibles de ser modificados son los grupos tioles ya que bajo una reacción en la que participan

radicales libres, producto del estrés oxidativo, pierden un protón propiciando la formación de grupos funcionales disulfuro, en los residuos de cisteína que son un constituyente importante en la estructura de las proteínas, estos residuos de cisteína presentan un grupo tiol y tienen la propiedad de formar puentes disulfuro con otro residuo de aminoácido cisteína que también se oxide. Este probable mecanismo, sustenta la tesis de la activación de los factores de transcripción por cambios en el estado redox, ya que ambos factores de transcripción, AP-1 y NFκB, poseen residuos de cisteína en diferentes motivos. AP-1 está constituido por dos subunidades proteicas, Jun y Fos, las cuales presentan en sus regiones de unión al ADN una cisteína y siete residuos de arginina, mientras que NFκB está constituido por dos subunidades, p65 y p50, que poseen en su región de unión al ADN una cisteína y tres residuos de arginina. Se ha demostrado que al inducir diversos estados redox celulares se modifica la activación de dichos factores, de esta manera al administrar agentes reductores como el 2-mercaptoetanol o el ditiotritol se activan, mientras que al administrar agentes oxidantes como pirrolidin ditiocarbamato (PDTC) disminuyen su activación. Por lo tanto se ha sugerido que los factores de transcripción AP-1 y NFκB responden al estrés oxidativo por la modificación de las cisteínas presentes en los motivos de unión al ADN (Galter, 1994).

Las proteínas AP-1 y NFκB son factores de transcripción de genes involucrados en la respuesta antioxidante, como las enzimas gamma glutamil sintetasa (γGCS) y superóxido dismutasa citosólica (MnSOD), de los genes que codifican a proteínas con actividad proinflamatoria, como la interleucina 1β (IL-1β), interleucina 8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α, del idioma inglés *Tumoral Necrosis*

Factor α). Se ha propuesto que el mecanismo de respuesta para cada uno de estos factores de transcripción durante un estado de estrés oxidativo se da por la modificación de la relación de los niveles de GSH/GSSG. El cambio en el estado redox hace que las cisteínas constituyentes de la cinasa de Jun (JNK) que forman los puentes disulfuro expongan los residuos de serina para que puedan ser fosforilados y, de esta manera, activar esta cinasa la cual puede fosforilar a su sustrato c-jun y activar el factor de transcripción AP-1, el cual induce la transcripción de genes que codifican a proteínas con actividad antioxidante como MnSOD y γ GCS. Con respecto a NF κ B, la modificación de los residuos de cisteína de la subunidad p65 expondrá los residuos de serina que serán fosforilados con mayor facilidad y se interrumpirá su interacción con la subunidad inhibitoria de la subunidad κ B (I κ B), la cual será degradada por el proteosoma y permitirá la migración del complejo NF κ B hacia el núcleo, por lo que se podrán transcribir los genes involucrados en la respuesta antioxidante, entre los que se conoce a la IL-1 β y a otra proteína de suma importancia en la supervivencia celular, como lo es Bcl-2, que además está involucrada en la respuesta antioxidante (Haddad, 2004 ; Rhman, 2005).

La regulación de la expresión de Bcl-2, por el factor de transcripción NF κ B se ha demostrado en la línea celular de feocromocitoma PC12, transfectada para sobreexpresar Bcl-2 y resistir a la muerte celular por apoptosis inducida con peróxido de hidrógeno. En estas células se registró una alta frecuencia de unión del factor de transcripción NF κ B al ADN, en especial se observó mayor concentración nuclear de la subunidad p65, la cual posee la propiedad de unirse al ADN. Con esto se confirmó que la subunidad p65 responde al estado de estrés oxidativo y que

juega un papel importante en la regulación de Bcl-2 en respuesta al estado de estrés oxidativo en esta línea celular (Jang, 2004).

Por otra parte, se ha visto que la expresión de Bcl-2 no sólo se ve modificada por las moléculas involucradas directamente con el estado de estrés oxidativo. Existen otras proteínas que inducen la expresión de Bcl-2 y, entre las más importantes, se puede mencionar al TNF- α , el cual presenta la siguiente vía de transducción de señales: Al unirse el TNF- α a su receptor membranal se modifica su estructura y su relación con la proteína asociada al dominio de muerte del receptor TNF- α (TRADD, del idioma inglés TNF Receptor Associated Death Domain) ésta, por su parte modifica su interacción con la proteína factor asociado al receptor TNF tipo 2 (TRAF-2, del idioma inglés TNF Receptor Associated Factors) y genera dos respuestas: la primera tiene que ver con el estado de estrés oxidativo, el cual activa la vía JNK, antes descrita, que culmina con la activación del factor de transcripción AP-1 y la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante. Por otra parte, TRAF-2 activa a la cinasa del factor nuclear κ B (NIK), se fosforila la cinasa que actúa sobre I κ B (IKK) que, a su vez, fosforila al inhibidor NF κ B, el cual se nomina I κ B, que de esta manera puede migrar al núcleo y culminar con la expresión de genes involucrados en la supervivencia celular, entre los que destaca el aumento en la expresión de Bcl-2, ya que este es un gen constitutivo (Amit, 2002).

Con base en lo anterior, se puede concluir que la expresión de Bcl-2 está regulada por diversos factores que participan en diferentes señalizaciones, intracelulares o extracelulares, que esta regulación está determinada como respuesta a un tipo diferente de proceso celular y que en su papel puede haber un contexto de

supervivencia o de estrés oxidativo, en el cual se ve involucrada Bcl-2 como un factor determinante en la culminación de estos procesos.

1.5 LA PROTEÍNA BAX

La identificación de un gran número de proteínas homologas a Bcl-2, sugiere que la función de la proteína Bcl-2 depende en parte de interacciones proteína-proteína con ella misma y con otros miembros de su familia. La primera de estas proteínas en ser descrita fue la proteína X asociada a Bcl-2, (Bax, del idioma inglés Bcl-2-Associated X Protein), está fue identificada por inmunoprecipitación con la proteína Bcl-2. Bax es una proteína de 21kD que presenta homología con Bcl-2, principalmente en los dominios, BH1 y BH2. Se ha encontrado evidencia de que existe un exon conservado que codifica para los aminoácidos que permiten la unión con otras proteínas en el dominio BH2. Bax se heterodimeriza con Bcl-2 y homodimeriza consigo misma (Oltvai y col., 1993). Mutaciones sitio dirigidas de los dominios BH1 y BH2 en la proteína Bcl-2 mostraron que estos dos dominios resultaron importantes para permitir la unión a Bax. Cuando la unión fue interrumpida, el efecto protector de Bcl-2 fue también eliminado, sugiriendo que la interacción entre Bcl-2 y Bax es necesaria para que se lleve a cabo la función antiapoptótica. Trabajos más recientes en donde se ha sustituido un residuo de aminoácido, por ejemplo, la glicina145 de el dominio BH1 por una alanina o ácido glutámico y el triptofano188 del dominio BH2 por una alanina, mostraron la interrupción total de la unión a Bax y con ello se eliminó totalmente el efecto supresor de la muerte celular por Bcl-2 (Yin y col., 1994). Cuando Bax fue sobreexpresada en cultivos de fibroblastos, la muerte por apoptosis en respuesta a señales apoptóticas fue acelerada, con lo que se le designó como una proteína

promotora de la muerte celular. Sin embargo, cuando se sobreexpresó Bcl-2 en este mismo tipo celular, se confirmó que se presentaban heterodimerizaciones entre está y Bax, teniendo como consecuencia la supresión de la muerte celular (Oltvai y col., 1993). De esta manera, es importante destacar que el cociente entre Bcl-2 y Bax, es importante para determinar la cantidad de heterodímeros Bcl-2/Bax que están presentes, así como, la cantidad de homodímeros Bax/Bax, con la finalidad de determinar el estado de supervivencia o muerte celular. Bax es una proteína que se expresa en niveles elevados en tejidos, principalmente en aquellos que presentan una gran cantidad de muerte celular durante el desarrollo normal o la maduración (Oltvai y col., 1993; Krajewsky y col., 1994).

La proteína Bax se localiza en grandes concentraciones en el citosol de células no estresadas (Degli y Dive, 2003; Scorrano y Korsmeyer, 2003). La activación de la proteína Bax, depende de cambios conformacionales, que le permiten formar homodímeros y este nuevo complejo formado, puede insertarse en la membrana externa mitocondrial, induciendo la permeabilización de la membrana, permitiendo la liberación del citocromo c y la activación de la apoptosis vía caspasa 3 (Degli y Dive, 2003). Durante está activación de Bax se observó que la proteína p53 citosólica, puede activar directamente a Bax e inducir la muerte por apoptosis en respuesta al daño al ADN (Chipuk y col., 2004; Schuler y Green, 2005). Por otra parte, la activación de Bax cuando se utiliza radiaciones UV como inductor de la apoptosis, mostró que es un mecanismo estrictamente dependiente de p53 en fibroblastos de pulmón de ratón y que este mecanismo es independiente de la transcripción del mARN que codifica para la proteína Bax (Speidel y col., 2006).

El papel de Bax en la regulación de la apoptosis, también está relacionada con eventos de estrés oxidativo, ya que como se ha mencionado anteriormente este produce daños al ADN y que activaran p53 que como se ha mencionado anteriormente activará a Bax y con ello la muerte celular por apoptosis, este mecanismo se observó en células endoteliales aórticas de bovino (BAVEC del idioma inglés bovine aortic vascular endothelial cells) que fueron tratadas con H₂O₂, en donde se observó el incremento en la muerte por apoptosis de este tipo celular, así como, el aumento en la expresión de p53 y Bax que como consecuencia tuvo la modificación del cociente Bcl-2/Bax, es importante destacar que en este experimento se observó que la apoptosis se presentaba bajo un mecanismo dependiente de Ca²⁺ y que las señales de supervivencia fueron dependientes del estado redox vías PI3K/Akt en las células BAVEC (Niwa y col., 2003).

De esta manera, cabe destacar la importancia de evaluar la expresión de Bax en eventos donde se encuentra implicado el estrés oxidativo y las repuestas celulares en respuesta a éste.

2. ANTECEDENTES

Resultados recientes obtenidos en el Laboratorio de Envejecimiento Celular, de la UAM-Iztapalapa, muestran una protección en la proliferación de cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón que han sido transfectados para que sobreexpresen la proteína Bcl-2, cuando se someten a estrés oxidativo. Aunado a la protección, se encontró que Bcl-2 induce aumento en el número de células senescentes, lo que sugiere que las células transfectadas con Bcl-2 activan mecanismos antioxidantes y de reparación, los cuales no han sido determinados hasta el momento (López Díaz-Guerrero, 2005).

Nuestro grupo de trabajo también demostró que la concentración de Bcl-2 determinada en homogeneizados de pulmón, hígado, riñones y bazo de ratón, aumenta gradualmente en función directamente proporcional con la edad del organismo, desde recién nacidos y hasta 24 meses de edad (López-Araiza y col., 2006). Sin embargo, si se obtienen cultivos primarios de fibroblastos de pulmón provenientes de ratones jóvenes (2 meses) y viejos (12 meses) y se les cultiva hasta llegar a la senescencia *in vitro*, el contenido de Bcl-2 no aumenta, por lo que es probable que sea necesario un estímulo para que aumente la expresión de esta proteína. Esto sugiere que el estrés oxidativo al cual se ven sometidos los organismos a lo largo de su vida es al menos en parte, el responsable del incremento en la concentración de Bcl-2 que se observó en los homogenizados de pulmones de ratones sacrificados de diferentes edades (Königsberg y col., 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la esperanza de vida de las personas ha aumentado considerablemente y con ello se ha incrementado la población de adultos mayores con un promedio de edad de alrededor de los 65 años. Así mismo, se ha observado que en este grupo de la población se han aumentado algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento como las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis, las enfermedades neurodegenerativas entre las que destaca el Alzheimer y algunas otras como la diabetes mellitus y la artritis reumatoide entre las más destacadas, sin embargo, la relación de estas enfermedades con el envejecimiento, no está del todo entendida; por lo que es necesario conocer los mecanismos bioquímicos, celulares y moleculares que se presentan durante el envejecimiento.

En el gobierno de México, se han aprobado leyes que garantizan la atención a la problemática de los adultos mayores en las que se les garantiza una mejor calidad de vida, entre ellas destaca la Ley integral para adultos mayores que en su artículo 12 dice lo siguiente: “El Estado deberá garantizar las condiciones óptimas de salud, nutrición, vivienda, desarrollo integral y seguridad social a las personas adultas mayores. Asimismo, deberá asegurar a todos los trabajadores una preparación adecuada para la jubilación”, de esta manera, resulta de gran importancia las investigaciones que se realicen para entender de los mecanismos que se presentan en el envejecimiento y aportar la mayor cantidad de información para cumplir con los objetivos sociales que tiene la ciencia con el desarrollo del país y la atención a todos sus ciudadanos.

El envejecimiento de acuerdo a la teoría de Harman, está estrechamente relacionado a fenómenos que tienen que ver con el estrés oxidativo, por lo que la investigación de la relación de este proceso con moléculas que participan en los mecanismos oxidativos es de relevante importancia para el entendimiento del envejecimiento; puesto que la proteína Bcl-2 está estrechamente relacionada con los eventos de estrés oxidativo, es posible que su expresión pudiera estar vinculada con el control de la respuesta antioxidante y con los mecanismos de reparación, así como con la regulación del ciclo celular y la senescencia, fenómenos relacionados con la inducción del envejecimiento.

Por otra parte, ahora se sabe que es imposible separar los fenómenos de apoptosis de cáncer y de senescencia, ya que muchas de las proteínas que participan en sus vías metabólicas son compartidas. Este es el caso de la proteína Bcl-2, la cual participa en los tres fenómenos, por lo que el entendimiento de la función de Bcl-2, el mecanismo por el que se induce su expresión y los puntos de su regulación, tanto de su función como de su expresión en las diferentes rutas, es muy importante para un futuro tratamiento terapéutico del cáncer y otras enfermedades asociadas al fenómeno del envejecimiento. De manera que resulta interesante investigar la relación entre la expresión de la proteína Bcl-2 en condiciones de estrés oxidativo y correlacionarla con los diversos eventos antes mencionados, por lo que este estudio permite sentar las bases para investigaciones posteriores que ayudarán a relacionar la expresión de proteínas vinculadas con varios procesos celulares relacionados al envejecimiento.

El esclarecer si el estrés oxidativo inducido con diferentes concentraciones de H_2O_2 interfiere en la síntesis de Bcl-2 y si esta respuesta, tiene que ver con la

participación de dicha proteína en la supervivencia celular, la respuesta antioxidante, el daño al ADN generado por dicho estrés y sobre todo el mecanismo de senescencia como supresor de tumores, todos ellos importantes en la comprensión del fenómeno del envejecimiento, ayudarán a dar un paso importante en la comprensión de este fenómeno y con ello, empezar el diseño de estrategias que estén dirigidas a tratar de minimizar el deterioro asociado al envejecimiento.

4. OBJETIVO

Determinar el efecto de la inducción de un estado de estrés oxidativo sobre la expresión de la proteína Bcl-2 y sobre el índice de supervivencia celular, de acuerdo a la relación Bcl-2/Bax, en la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L-929.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la morfología de la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L-929 en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂.
- Determinar la viabilidad y funcionalidad de las células de fibroblastos de pulmón de ratón L-929, sometidas a diferentes concentraciones de H₂O₂.
- Determinar el tiempo de máxima expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 ante un estado de estrés oxidativo.
- Determinar la expresión de Bcl-2 frente a diferentes concentraciones de H₂O₂.
- Determinar la expresión de Bax en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de H₂O₂.
- Determinar el índice de expresión Bcl-2/Bax a diferentes concentraciones de H₂O₂.

5. HIPÓTESIS

La proteína Bcl-2 favorece la supervivencia celular y tiene función antioxidante, de modo que al exponer a los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 a un estado de estrés oxidativo, inducido con diferentes concentraciones de H_2O_2 , se espera que la expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 aumente en forma proporcional a la concentración de H_2O_2 y, por lo tanto, se modifique el índice de expresión Bcl-2/Bax, y se induzca aumento en la supervivencia y funcionalidad celular.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MODELO BIOLÓGICO

La línea celular L-929, se obtuvo en Marzo de 1948 por K:K. Sanford, W.R. Earle y G.D. Likely a partir de la línea parenteral de la cepa L, que se obtuvo de tejido subcutáneo aerolar y adiposo normal de un cultivo de 100 días, proveniente de un ratón macho de la cepa C3H/An; la clona 929, fue la primera cepa procesada y está se estabilizó hasta el subcultivo 95 de la cepa parenteral L.

Los fibroblastos de la Línea celular L-929 crecen en monocapa, presentan un cariotipo hiperploide (61-67 cromosomas); tienen un tiempo de duplicación de alrededor de 21-24 horas, cuando se encuentran en una concentración de 4.8×10^6 células/ 25cm^2 (Sanford y col. 1948). Esta línea celular se utiliza en una gran variedad de estudios biológicos, entre los que destacan los que se refieren a TNF y a los de estrés oxidativo.

6.2 CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L-929 que se cultivó en medio Eagle modificado (MEM) suplementado con 5% de suero fetal de bovino (GIBCO, BRL), 5% de suero de ternera (GIBCO, BRL) y 1% de antibiótico-antimicótico (Antibac, GIBCO, BRL). Las células se mantuvieron en una incubadora húmeda a 37°C y 5% de CO_2 . El medio de cultivo se cambió cada tercer día y las células se cosecharon utilizando tripsina y se sembraron al llegar a confluencia. Todos los experimentos de este trabajo se realizaron de manera independiente en cultivos confluentes y en cultivos no confluentes, para determinar si la inhibición de

proliferación por contacto tenía algún efecto sobre la expresión de Bcl-2 y los parámetros de supervivencia y funcionalidad celular. En ambas condiciones de cultivo no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, por lo que se decidió que los experimentos fueran realizados en cultivos no confluentes.

6.3 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO MÁXIMO DE EXPRESIÓN DEL ARNm QUE CODIFICA PARA Bcl-2

Para establecer el tiempo en el cual se observaba la máxima expresión de Bcl-2, se indujo el estado de estrés oxidativo en la línea celular L929 mediante la adición de H₂O₂ a la concentración de 50μM durante 3, 6, 9 y 12 horas. Para determinar la expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 a los tiempos antes mencionados, se sembraron por triplicado, 2.5 X 10⁶ células en cajas Petri de 10 cm de diámetro. Después de 24 horas de sembradas, las células se duplicaron aproximadamente a 5 X10⁶ células y en ese momento se procedió a administrar la concentración de H₂O₂ para inducir el estado de estrés oxidativo; después de transcurrido el tiempo de los tratamientos, las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS del idioma inglés Phosphates buffer solution) y se procedió a la extracción del ARN total.

6.3.1 Extracción de ARN total

Se aisló el ARN total a partir de 5 X10⁶ células, adicionando 1 mL del reactivo de TRIZOL (Invitrogen) directamente sobre las placas de cultivo y despegando las células con gendarme. Se recuperó toda solución y se centrifugó a 2500 X g

posteriormente se adicionó un volumen de 0.5 mL de perlas de vidrio de 2 μm de diámetro, se homegenizaron en vortex durante 10 segundos y se colocaron en hielo durante 1 minuto. Con la finalidad de romper a las células, se repitió este paso 4 veces mas. Posteriormente se adicionaron 200 μL de cloroformo puro grado biología molecular y se agitó por inversión vigorosamente. El contenido se trasvasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y estéril, se dejó que la muestra reposará durante 5 minutos a temperatura ambiente. En este paso se observó la separación de la solución en tres fases: una color rojiza correspondiente a la fase orgánica, una interfase blanca donde se localizan principalmente las proteínas y otra incolora donde se localizan los ácidos nucleicos. Posteriormente se centrifugó a 12000 X g durante 15 minutos; se tomó la fase superior del centrifugado, teniendo precaución en no tocar la fase blanca y no mover bruscamente ya que al tocarla o mezclarla se contamina el producto deseado.

Al producto recuperado se le adicionaron 500 μL de isopropanol puro frío, grado biología molecular, con la finalidad de precipitar el ARN total, se agitó por inversión y se dejó reposar durante 24 horas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos; se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 70%(v/v) en agua con DEPC. Se agitó en vortex hasta despegar el botón y se centrifugó a 7500 X g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se secó el botón al vacío, éste se resuspendió en 20 μl de agua con DEPC y se almacenó la muestra a -80°C , para posteriormente verificar la integridad de ARN total (Chomczynski y Sacchi, 1997, Chomczynski, 1993).

6.3.2 Integridad de ARN total

La integridad del ARN total se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) en condiciones desnaturalizantes, la agarosa se disolvió en agua DEPC en 70%, formaldehído al 20% y solución amortiguadora MOPS 10X al 10%. Se tomaron 5 μ L de la muestra y se le adicionó 5 μ L de FMF (Formamida- MOPS 10X- Formaldehído), se incubaron 5 minutos a 75° C y posteriormente se adicionaron 2 μ L de LB (amortiguador de cargado, "loading buffer"), para ARN y 0.2 μ L de bromuro de etidio con una concentración de 10 mg/mL. Se depositó la muestra en el gel de agarosa y se corrió la electroforesis con un amortiguador de corrida MOPS 1X, se verificaron en el foto-documentador las 3 bandas integras de ARN y que no se presente barrido, como prueba de un ARN integro y se procedió a la reacción de retrotranscripción.

6.3.3 Reacción de retrotranscripción

Se utilizó el estuche comercial SUPERSCRIPT (Invitogen) y se emplearon como oligonucleótidos de alineamiento hexámeros al azar. Se preparó una mezcla para la reacción de retrotranscripción donde se colocaron 5 μ L de ARN total de la muestra en un tubo Eppendorf de 200 μ L, junto con 2 μ L de hexameros al azar a una concentración de 10mM, 1 μ L de la mezcla de los dNTP's 10 mM y 2 μ L de agua DEPC. La mezcla preparada se incubó a 65° C durante 5 minutos y después de transcurrir este tiempo se colocó en hielo durante 1 minuto. Posteriormente se adicionaron 2 μ L de amortiguador para RT 10X, 2 μ L de MgCl₂ 50 mM, 2 μ L de DTT 0.1M y 1 μ L de RNA_{asa}out, se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y se agregó 1 μ L de la enzima Super Script SS II. Se incubó a temperatura ambiente

durante 10 minutos y posteriormente se incubó a 42° C durante 50 minutos. Para detener la reacción se incubó a 70 °C durante 15 minutos. El producto se utilizó para la reacción de PCR.

6.3.4 Reacción de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR del idioma inglés Polimerase Chain Reaction) se realizó durante 35 ciclos, con las siguientes condiciones para cada ciclo: 94 °C como temperatura de desnaturalización, durante 30 segundos, 72 °C como temperatura de elongación durante 30 segundos y 57 °C como temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos durante 30 segundos; la temperatura final de elongación fue de 72 °C durante 3 minutos para la coamplificación de Bcl-2 y ciclofilina.

La PCR para la amplificación de Bax se realizó durante 35 ciclos, con las siguientes condiciones para cada ciclo: 94 °C como temperatura de desnaturalización, durante 30 segundos, 72 °C como temperatura de elongación durante 30 segundos y 56 °C como temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos durante 30 segundos; la temperatura final de elongación fue de 72 °C durante 3 minutos.

Las secuencias de oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación del ARNm de Bcl-2 fueron las siguientes: sentido 5'TCA TGA AGA CAG GGG CCT TTT 3'y antisentido 5' TGG AGC TGC AGA GGA TGA TTG 3' .

Para la amplificación de Bax se utilizaron las siguientes secuencias de oligos: sentido 5' GAA CAG ATC ATG AAG ACA GG3' y antisentido 5' GCA AAG TAG AAG AGG GCA AC 3'. Como control de normalización se utilizó al ARNm que

codifica para el gen constitutivo de la proteína ciclofilina y para la amplificación del ARNm que codifica para está se utilizaron los siguientes oligos: sentido 5' TTG GAC AAT GGA CTG GTT GA3' y antisentido 5' GTA GAG TGG ATG GTC AGT G 3'.

La reacción de PCR se preparó de la siguiente manera: para coamplificar Bcl-2 y Ciclofilina, se colocaron 5 µL de amortiguador de PCR, 1.5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de mezcla de dNTP's 10 mM, 0.3 µL de oligo-sentido para ciclofilina, 0.3 µL de oligo-antisentido para ciclofilina 20 mM, 1 µL de oligo-sentido para Bcl-2, 1 µL de oligo-antisentido para Bcl-2, 0.3 µL de la enzima Taq polimerasa, 5 µL del producto de la reacción de retrotranscripción y 34.6 µL de agua ultrapura para PCR; la reacción de PCR se llevó a cabo a las condiciones antes mencionadas.

6.3.5 Electroforesis

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con TBE 0.5X a 80 mV durante 1 hora. El gel se cargó con 10 µL del producto de PCR, 2 µL de LB para ADN y 0.2 µL de bromuro de etidio 10mg/mL.

6.3.6 Expresión de Bcl-2

El análisis de la expresión del ARNm para Bcl-2 se realizó por densitometría, utilizando el fotodocumentador Kodak IMAGEN GEL DOC, y el software Kodak 3.1 analyzer. Se seleccionaron las bandas tanto de Bcl-2 y de ciclofilina, y se corrigió el rango de lectura con la función de análisis de máxima absorción. Los valores se normalizaron tomando en consideración que el valor de expresión del ARNm para ciclofilina fue de 1.0

6.4 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 y Bax ANTE DIFERENTES RETOS OXIDATIVOS

Una vez determinado que el tiempo de máxima expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 fue de 9 horas, se procedió a determinar la expresión de Bcl-2, así como, de Bax ante diferentes concentraciones de H₂O₂. Para ello se sembraron por triplicado, 2.5 X10⁶ células en cajas petri de 10 cm. Pasadas 24 horas, cuando existen 5 X10⁶ células, se les administraron tratamientos con 0, 50, 100, 150 y 200 µM de H₂O₂ durante 9 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la células se lavaron con PBS y se procedió a aislar y cuantificar la expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 y Bax con las técnicas de TRIZOL y RT-PCR semicuantitativo antes descritas.

6.5 MORFOLOGÍA CELULAR

La morfología celular se analizó y comparó en los tratamientos antes mencionados, por medio de microscopia óptica con un microscopio invertido Carl Zeiss modelo Axiovert 25. Las muestras se observaron sin ningún tipo de tinción utilizando el objetivo de 20X y para fotografiarlas se utilizó un tubo adaptador B-52 SOLIGOR G3 para una cámara Canon PC-1049. Las fotografías se procesaron con el software REMOTE CAPTURE versión única.

6.6 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular fue evaluada en los tratamientos antes mencionados para determinar el tiempo de máxima expresión de Bcl-2, así como, en la determinación de la cinética de expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 ante diferentes retos oxidativos. Para ello se sembraron 2×10^5 células en pozos de 3cm por triplicado para cada concentración, así como para el lote control el cual no tuvo tratamiento. En los experimentos para determinar el tiempo de máxima expresión para el ARNm que codifica para Bcl-2, se adicionó una concentración de 50 y 100 μM de H_2O_2 durante 3, 6, 9 y 12 horas. Una vez pasado el tiempo de cada tratamiento, las células se despegaron con tripsina-EDTA 0.25%, posteriormente se inactivó la actividad de la enzima adicionando 1 mL del medio MEM con suero; se homogenizó la solución y se cuantificó la viabilidad celular con el equipo CELL VIABILITY ANALYZER VI CELL (BECKMAN COULTER), que utiliza el principio de exclusión de azul tripano. El mismo procedimiento se utilizó para determinar la viabilidad celular en los tratamientos para determinar la cinética de expresión de Bcl-2 ante diferentes retos oxidativos en los que se utilizaron las concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 μM de H_2O_2 durante 9 horas de exposición.

6.7 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL (ENSAYO MTT)

Esta técnica se utilizó para evaluar la actividad mitocondrial de manera indirecta (Mosman, 1983). El principio de la técnica se basa en la reducción del MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) gracias a la transferencia de

electrones que provienen del complejo succinato deshidrogenasa de la cadena de respiratoria, lo cual forma un precipitado de sal formazán de color azul el cual puede ser detectado por colorimetría.

Para realizar el ensayo se sembraron por triplicado 2×10^5 células en pozos de 3 cm, se retiró el medio para cada tratamiento y las células se lavaron con PBS. Se retiró el PBS y se adicionó 1 mL de MTT (SIGMA) (0.5mg/mL, pH= 7.5). Las células se incubaron durante 3 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se retiró el MTT y se agregaron 800 μ L de solución de extracción (HCl 0.04 M en isopropanol) a cada pozo. Las placas de cultivo se colocaron sobre un plato de agitación (Thermolyne AROS 160) durante 15 minutos a temperatura ambiente para disolver el formazán. El contenido de formazán en cada pozo se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). El valor de fondo se midió a 630 nm y ese valor se resto a la determinación. La funcionalidad mitocondrial se determinó como densidad óptica (D.O.) por número de células y los resultados se presentan normalizados.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en al menos tres eventos independientes. Los datos se analizaron por medio de ANOVA y Tuckey con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 A DIFERENTES TIEMPOS FRENTE A UN MISMO RETO OXIDATIVO.

7.1.1 Morfología de los cultivos en presencia de H₂O₂

La morfología celular de los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 se observó como “fusiforme” en los cultivos no confluentes, mientras que la forma que adoptaron en los cultivos en confluencia era de tipo irregular o “empedrada”. Ambos cultivos se sometieron a estrés oxidativo con 50 μ M de H₂O₂, y los dos presentaron cambios a partir de las 9 horas de tratamiento, con lo que se descartó la influencia de la inhibición de la proliferación por contacto en los cambios morfológicos. Los cambios más evidentes se presentaron a las 12 horas: Estos cambios consistieron en el aumento de la refringencia y una tendencia a la esferificación y vacuolarización celular en cultivos en confluencia y no confluentes como se puede apreciar en la figura 1.

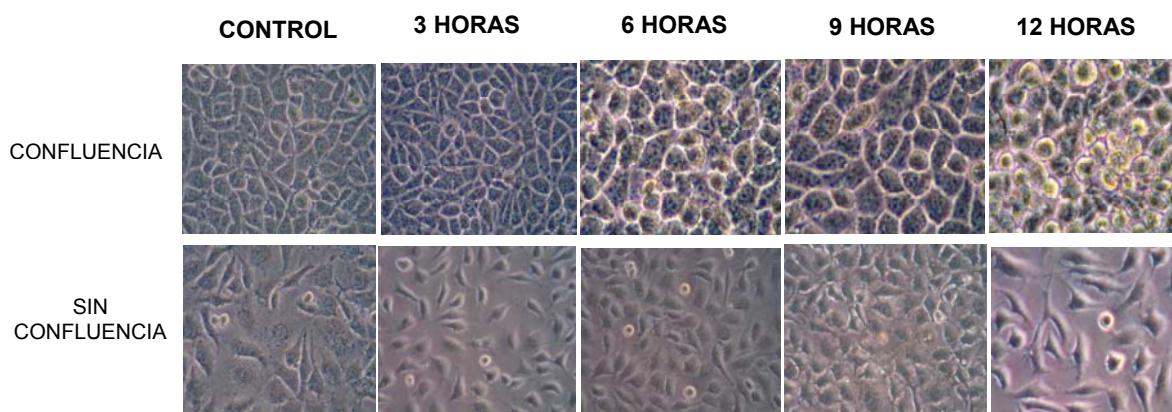


Figura 1: **MORFOLOGÍA CELULAR DE LOS FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN DE LA LÍNEA L-929**

Los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 se sometieron a estrés oxidativo con 50 μ M de H₂O₂ durante diversos intervalos de tiempo. Aumento 200X

Todos los experimentos de este trabajo se realizaron tanto en cultivos confluentes como no confluentes. Sin embargo, como en ningún caso se observó diferencia entre ellos, a partir de ahora, sólo se mencionarán los resultados obtenidos con los cultivos que no se encontraban en confluencia.

7.1.2 Viabilidad y funcionalidad de los cultivos en presencia de H₂O₂

La viabilidad celular se determinó mediante ensayos de exclusión de azul tripano y la funcionalidad mitocondrial (MTT). El número total de células contabilizadas por el método de exclusión de azul tripano no presentó diferencias estadísticamente significativas, al ser incubadas con 50 μ M de H₂O₂, entre los diferentes intervalos de tiempo como se puede apreciar en la figura 2. Sin embargo, la funcionalidad mitocondrial tuvo una disminución estadísticamente significativa del 40% a partir de las 3 horas, como se indica en la figura 3.

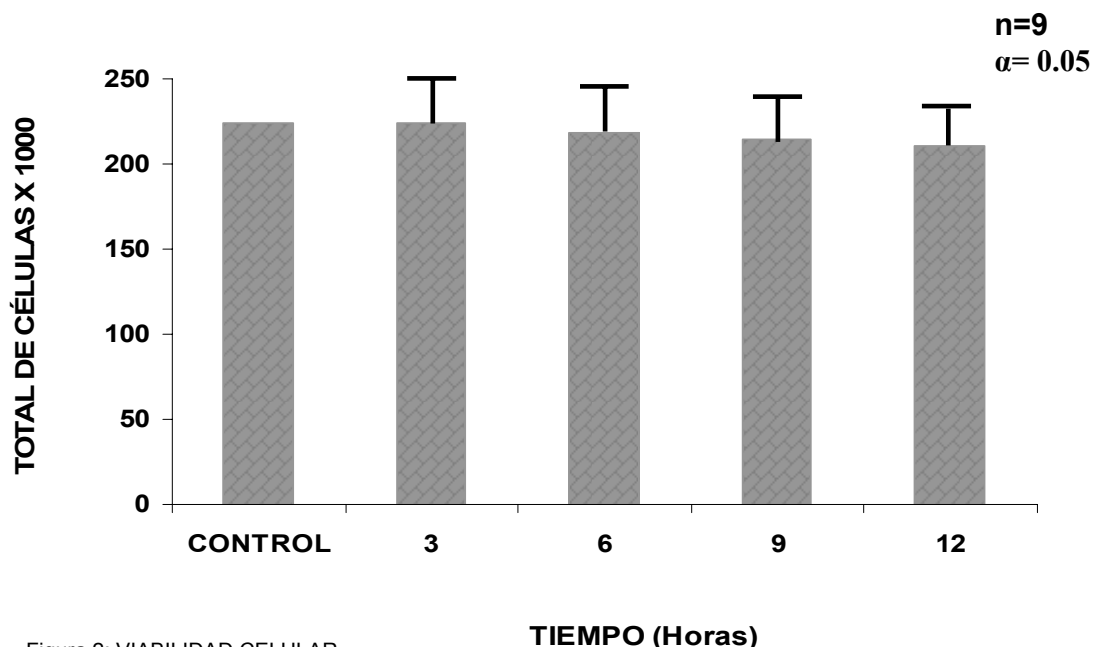


Figura 2: VIABILIDAD CELULAR

El número de células viables de cultivos no confluentes se determinó mediante la técnica de azul de tripano, como se describe en material y métodos. Los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 fueron sometidos a tratamiento con 50 μ M de H₂O₂. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, por lo que cada se representa una n = 9 y presentan un valor de $\alpha \leq 0.05$

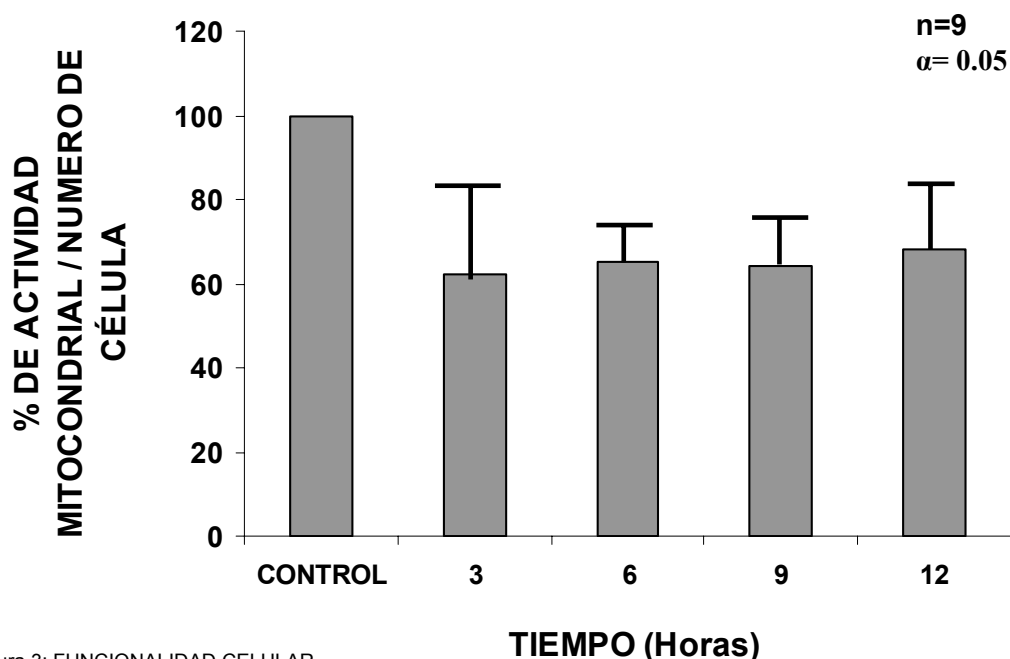


Figura 3: FUNCIONALIDAD CELULAR

La funcionalidad celular se determinó por la técnica de MTT, como se describe en material y métodos. Los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 fueron sometidos a tratamiento con 50 μM de H_2O_2 . Los resultados se encuentran normalizados en porcentaje con respecto al control. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una $n = 9$. Los * indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

7.1.3 Tiempo de máxima expresión de Bcl-2

El tiempo de máxima expresión de Bcl-2 fue determinada por la técnica de RT-PCR semicuantitativo en donde se coamplificó junto con ciclofilina como gen de normalización, los resultados indican un aumento del 32% en la expresión con respecto al lote control con una $\alpha \leq 0.05$ a las 9 horas de tratamiento 50 μM de H_2O_2 como se observa en la figura 4.

7.2 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE Bcl-2 ANTE DIFERENTES RETOS OXIDATIVOS

Una vez conocido el tiempo de expresión máxima del ARNm que codifica para la proteína Bcl-2, se procedió a realizar los mismos experimentos sometiendo a las

células a diferentes retos de estrés oxidativo: 0, 50, 100, 150 y 200 μM de H_2O_2 durante 9 horas.

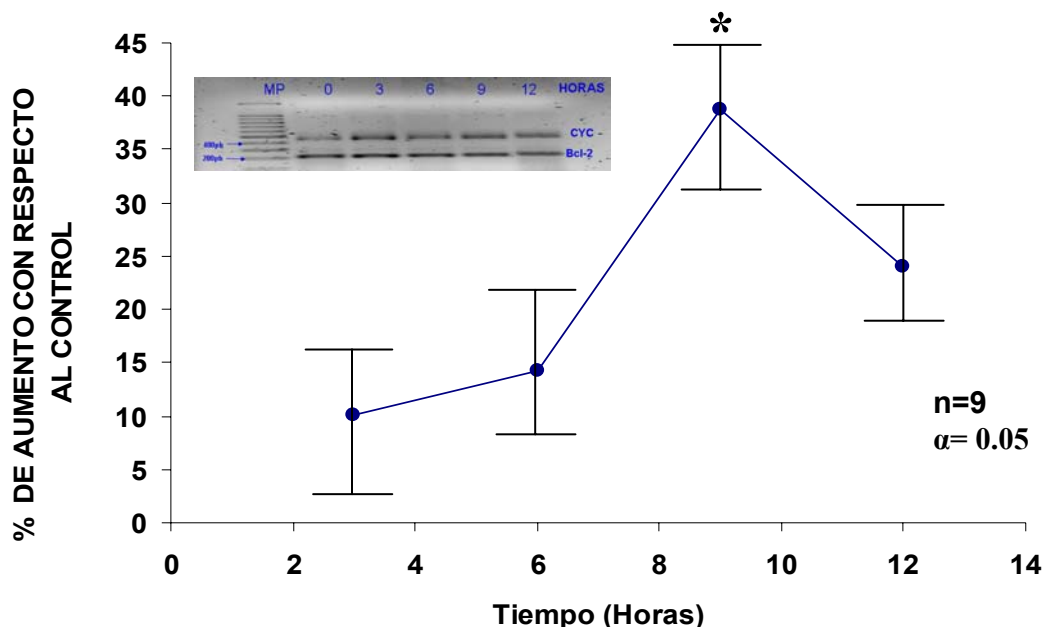


Figura 4. TIEMPO DE MÁXIMA EXPRESIÓN DEL ARNm QUE CODIFICA PARA Bcl-2

Las células de fibroblastos de pulmón de ratón L-929 en cultivos no confluentes se trataron con $50\mu\text{M}$ de H_2O_2 a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados son valores normalizados con respecto al control y son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una $n = 9$. El asterisco * indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

7.2.1 Morfología de los cultivos en presencia de diferentes dosis de H_2O_2

Los fibroblastos L929 sometidos a diferentes concentraciones de H_2O_2 presentan cambios morfológicos consistentes en el aumento de células esféricas, vacuolarizadas y con mayor refringencia, como indicio de daño en todos los tratamientos durante 9 horas, sin embargo, la mayoría de los cambios se presentan en los tratamientos con 150 y $200\mu\text{M}$ de H_2O_2 en cultivos no confluentes, como se puede observar en la figura 5.

Estos experimentos también se realizaron tanto en cultivos confluentes como no confluentes. No obstante, en este caso tampoco se observó diferencia entre ellos,

por lo que sólo se mencionarán los resultados obtenidos con los cultivos que no se encontraban en confluencia.

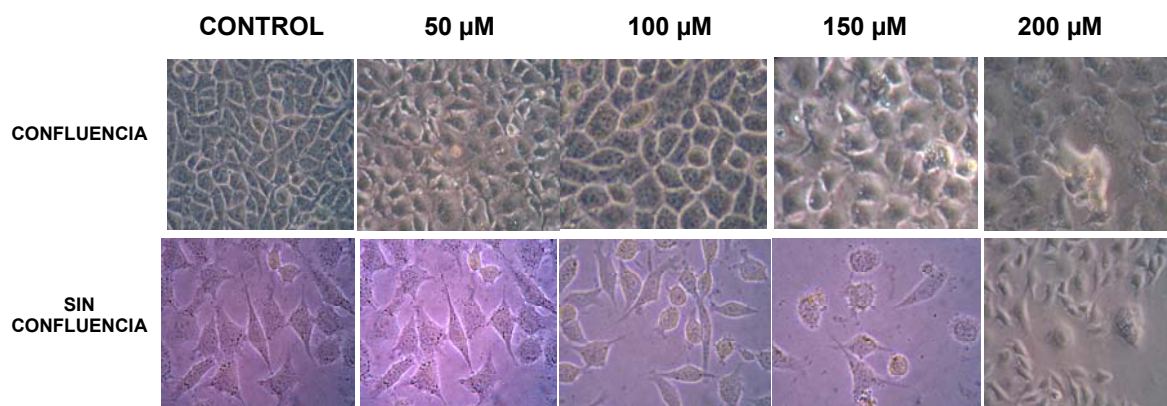


Figura 5: **MORFOLOGÍA DE LOS FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE LA LÍNEA L-929 INCUBADOS CON CONCENTRACIONES CRECIENTES DE H₂O₂**

Los Fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 se sometieron a estrés oxidativo por 9 horas a diferentes concentraciones de H₂O₂.
Aumento 200X

7.2.2 Viabilidad y funcionalidad de los cultivos en presencia de diferentes dosis de H₂O₂

La viabilidad celular determinada para las células sometidas a las diferentes concentraciones de H₂O₂ muestra una disminución estadísticamente significativa en los tratamientos con 200 μM de H₂O₂ con una $\alpha \leq 0.05$, como se indica en la figura 6. Mientras que la funcionalidad mitocondrial se disminuyó en un 40% en todos los tratamientos con una $\alpha \leq 0.05$, como se puede observar en la figura 7.

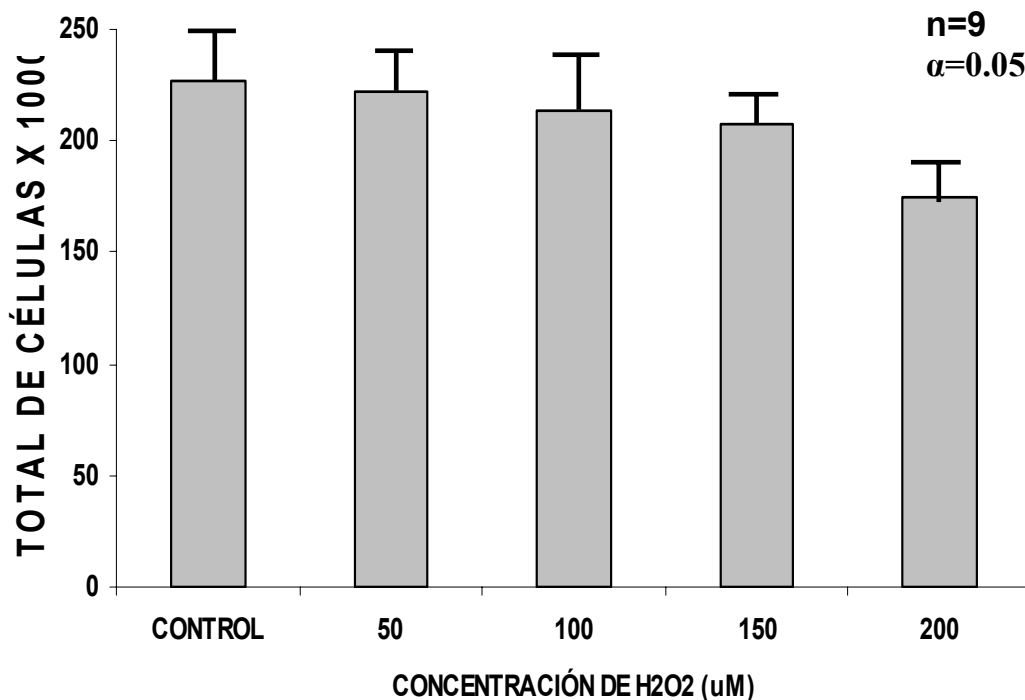


Figura 6: VIABILIDAD CELULAR A DIFERENTES DOSIS DE H₂O₂

El número de células viables se determinó mediante la técnica de azul de tripano, como se describe en material y métodos. Los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea L-929 fueron sometidos a tratamientos con diferentes concentraciones de H₂O₂ por 9 horas. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una n = 9. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

7.2.3 Expresión de Bcl-2 en presencia de diferentes dosis de H₂O₂

Los niveles de expresión del ARNm de Bcl-2 normalizados por coamplificación con ciclofilina indican que la máxima expresión estadísticamente significativa se encontró cuando los fibroblastos de pulmón de ratón de la línea celular L-929 fueron sometidos a un tratamiento con 50µM de H₂O₂ durante 9 horas con una $p \leq 0.05$ con respecto al control. Mientras que los niveles de expresión del ARNm que codifica para Bcl-2 no presentaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión en los tratamientos con 100, 150 y 200µM de H₂O₂. Aunque se puede observar un ligero aumento que va desde el 5 al 15%, esta variación no representa una diferencia estadística significativa como se puede apreciar en la figura 8.

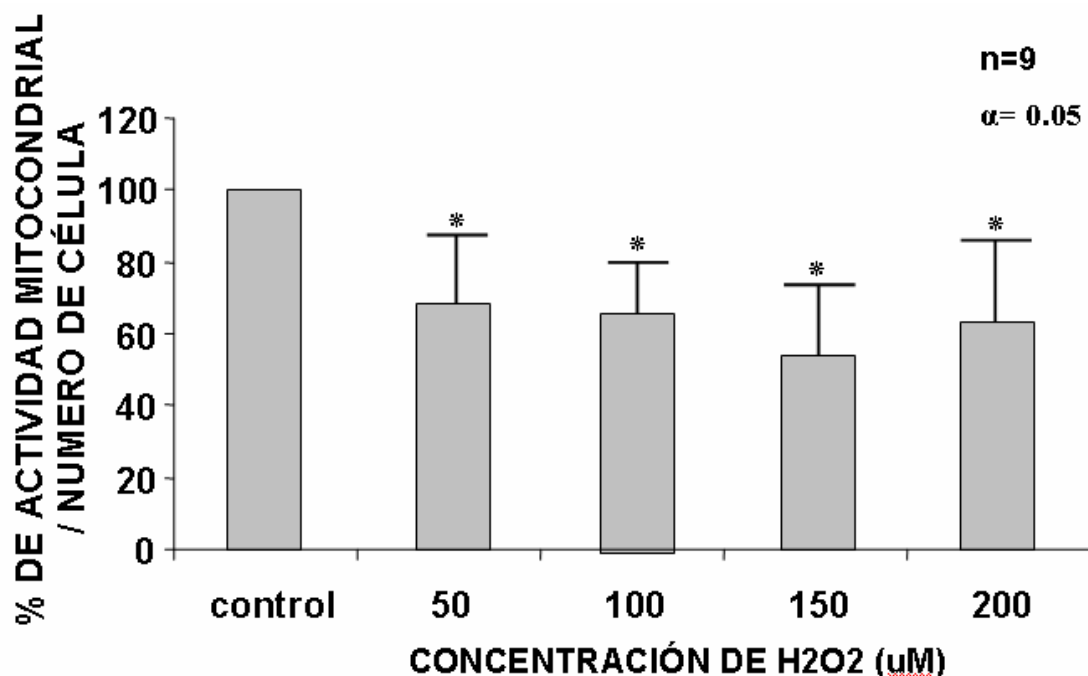


Figura 7: FUNCIONALIDAD CELULAR FRENTE A DIFERENTES DOSIS DE H₂O₂

La funcionalidad celular se determinó mediante la técnica de MTT, como se describe en material y métodos. Los fibroblastos de la línea L-929 fueron sometidos a los diversos tratamientos con de H₂O₂ por 9 horas. Los resultados se encuentran normalizados en porcentaje con respecto al control y son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una n = 9. Los * indican diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control con un valor de $p \leq 0.05$.

7.3 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE Bax ANTE DIFERENTES RETOS OXIDATIVOS

Los niveles de expresión del ARNm que codifica para la proteína proapoptótica Bax fueron determinados por RT-PCR semicuantitativo, utilizando al ARNm que codifica para la proteína Ciclofilina como gen de normalización. Los niveles de expresión del ARNm para Bax disminuyen en los tratamientos con 50 y 100 μM de H₂O₂. Mientras que en los tratamientos con 200 μM aumentan de manera estadísticamente significativa, como se puede observar en la figura 9.

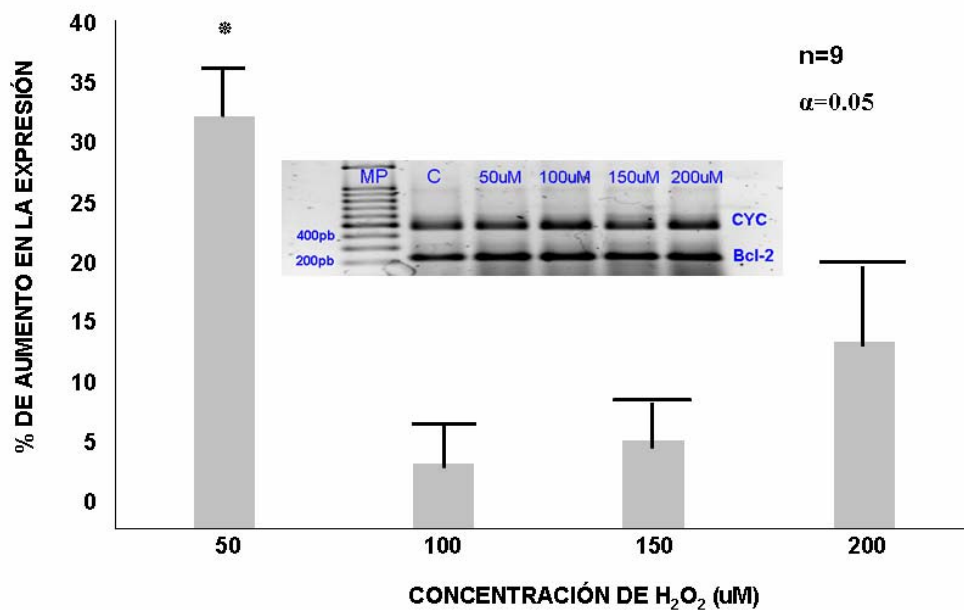


Figura 8. EXPRESIÓN DEL ARNm QUE CODIFICA PARA Bcl-2 A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE H₂O₂

La línea celular L-929 se trató con diversas concentraciones de H₂O₂ por 9 horas. El ARN total se aisló por la técnica de trizol y se realizó un RT-PCR como se describe en material y métodos. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una n = 9. El asterisco * indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

7.4 ÍNDICE DE EXPRESIÓN Bcl-2/Bax

Los niveles de expresión del ARNm que codifica para la proteína antiapoptótica Bcl-2, comparados con los niveles de expresión del ARNm que codifica para la proteína proapoptótica Bax, con la finalidad de determinar el estado fisiológico en la que se encontraban los fibroblastos L-929 después de ser sometidos a los diferentes tratamientos con H₂O₂ durante 9 horas.

Para obtener el índice Bcl-2/Bax se realizó un cociente con los valores obtenidos por densitometría para el ARNm de cada uno de ellos. Un valor menor a 1.0 se asoció a un estadio apoptótico, mientras que un índice mayor a 1.0 se asoció con un estadio de supervivencia celular. Los valores del índice Bcl-2/Bax para los tratamientos con 50 y 100 μ M de H₂O₂ durante 9 horas presentan un valor mayor a

1.0 (3.1021 y 1.0274 respectivamente) lo que sugiere un estadio de supervivencia celular; el tratamiento con 150 μM tuvo un valor de 0.9615, lo que indica un estado de equilibrio celular, mientras que el tratamiento con 200 μM de H_2O_2 , presenta un valor de 0.6146, lo que apunta hacia un estado de muerte celular. Los resultados se presentan en la tabla 1.

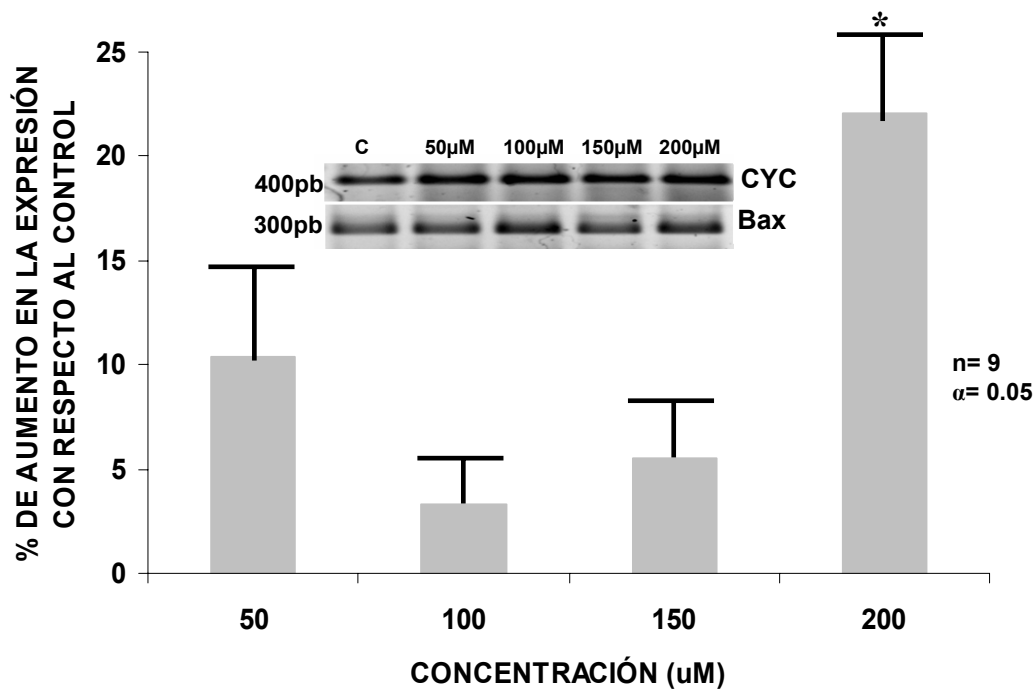


Figura 9. EXPRESIÓN DEL ARNm QUE CODIFICA PARA Bax A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE H_2O_2 . La línea celular L-929 se trató con diversas concentraciones de H_2O_2 por 9 horas. El ARN total se aisló por la técnica de trizol y se realizó un RT-PCR como se describe en material y métodos. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado, por lo que cada dato representa una $n = 9$. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

*

TRATAMIENTO	ÍNDICE Bcl-2 / BAX
50 μM	3.1021\pm 0.42
100 μM	1.0274\pm 0.28
150 μM	0.9615\pm 0.26
200 μM	0.6146\pm 0.29

Tabla 1. ÍNDICE DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE Bcl-2/ Bax A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE H₂O₂
Se realizó un cociente de los resultados obtenidos por densitometría para las expresiones de Bcl-2 y Bax, los valores presentados fueron con normalizados con respecto al control, los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes por triplicado, representando una n=9 y con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

8. DISCUSIÓN

El envejecimiento es un fenómeno que se asocia al estrés oxidativo (Harman 1956; Ames y col. 1993; Yu 1996; Yu y Yang 1996; Sohal y Orr 1995), por lo que el análisis del mecanismo celular de la respuesta antioxidante cuando se induce un estado de estrés oxidativo, representa un alcance en el entendimiento del fenómeno del envejecimiento. Se sabe que la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 puede proteger a las células de la muerte celular por apoptosis mediada por ROS (López Díaz-Guerrero, 2005). Sin embargo, el mecanismo por el cual Bcl-2 lleva a cabo dicha protección es todavía desconocido. Por si misma, la proteína Bcl-2 no posee una actividad antioxidante (Hockenbery y col. 1993); pero indirectamente ayuda a incrementar o activar los mecanismos endógenos de respuesta antioxidante, en donde destacan el aumento en los niveles de GSH y de la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) (Hildeman y col. 2003). En el presente trabajo se encontró que el tiempo de máxima expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 se presenta a las 9 horas de tratamiento con una concentración de 50 μ M de H₂O₂. Durante este estado de estrés oxidativo, no se presentan cambios en la morfología y viabilidad celular, mientras que la funcionalidad celular se ve disminuida en un 40% en todos los tiempos y concentraciones de incubación con H₂O₂. Por lo que surge la idea de que regulación de la expresión del ARNm que codifica para la proteína Bcl-2 pudiera ser un evento que responde a la modificación del estado redox celular, y por tanto, pudiera estar regulados por el factor nuclear de transcripción NF- κ B, el

cual responde a estímulos oxidantes que modifican el estado redox celular y que además se sabe que es uno de los factores de transcripción que amplifican la expresión de Bcl-2 (Jang, 2004). La respuesta antioxidante a dichos eventos culminaría con el aumento en la expresión de la proteína Bcl-2 como mecanismo de supervivencia. Simultáneamente a este evento se expresarían otras proteínas que regulan el estado redox celular entre las que destacan la enzima SOD citosólica, la enzima γ GCS y la enzima hemoxigenasa 1 (Haddad, 2004; Rhman, 2005). Los anterior mediante la vía de señalización transduccional JNK, que activa la respuesta mediada por el factor de transcripción AP-1, el cual tiene como blanco de expresión los genes de las proteínas antes mencionadas en respuesta a cambios el estado redox celular (Galter, 1994).

No obstante, al incrementar la concentración de H_2O_2 (200 μ M durante 9 horas), se observaron cambios morfológicos en las células L-929, así como una disminución en la viabilidad y funcionalidad celular. Así mismo, se encontró que al aumentar el reto oxidativo, la expresión de la proteína Bcl-2 regresó a los niveles basales. De modo que al parecer, esta regulación no funciona de la misma manera cuando el estado redox celular se modifica de manera drástica.

Al evaluarse los niveles de expresión de la proteína proapoptótica Bax se encontró un ligero aumento de alrededor el 20% bajo las mismas condiciones de tratamiento, y el índice de expresión Bcl-2/Bax obtuvo un valor de 0.61 lo que sugiere que las células no pueden manejar el reto oxidativo, que posiblemente genere daños que modifiquen la respuesta celular, y que por tanto, la llevan a la muerte.

Todo lo anterior sugiere que los eventos que inducen la expresión de la proteína Bcl-2 y logran promover la supervivencia celular, puede estar modulados por cambios “sutiles” o fisiológicos del estado redox, pero que son inútiles cuando el estrés oxidativo es intenso.

Sin embargo, hay algunos puntos que no son fáciles de explicar en cuanto a la expresión del ARNm que codifica para la proteína Bcl-2, principalmente el que los niveles de expresión son iguales en los tratamientos con 100, 150 y 200 μM de H_2O_2 a los que se presentan en el lote control. Aunque es evidente que la morfología, la viabilidad y la funcionalidad celular son diferentes en el tratamiento con 200 μM , los niveles de expresión de Bcl-2 son los mismos que en el control. De igual manera, el índice Bcl-2/Bax no proporciona un valor como para determinar que los niveles de Bax anulen en su totalidad a los de Bcl-2, y de esta forma la respuesta celular sea la de seguir una vía de muerte celular.

Para tratar de explicar esto, existen varias posibilidades, una de ellas es que la población celular sea heterogénea, y que las células no se encuentren en la misma etapa del ciclo celular y por ello su respuesta al estrés sea diferente, y con ello la expresión de Bcl-2. Para contrarrestar el resultado observado en un cultivo celular heterogéneo, la solución podría ser sincronizar el cultivo celular, disminuyendo la cantidad de suero fetal de bovino, con lo que se disminuiría la tasa de proliferación y las células estuvieran en la misma etapa del ciclo. Por otra parte, es probable que los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 se vean sometidos no solo a la regulación de su expresión, sino que también a su localización en las diferentes membranas biológicas. Esto explicaría los diversos papeles que juega Bcl-2 en los diferentes procesos celulares en los que se ve involucrada. Se ha reportado que

cuando se induce apoptosis vía TNF- α , la concentración de la proteína Bcl-2 en la membrana nuclear aumenta, favoreciendo la vacuolarización y la formación de cuerpos apoptóticos (Hoetelmans, y col. 2000). En otros reportes se ha demostrado que el aumento de Bcl-2 en la membrana externa mitocondrial favorece la preservación del potencial electroquímico, evitando la liberación del citocromo c e inhibiendo la vía de señalización de apoptosis mitocondrial (Baliga y Kumar, 2002). En cuanto a los reportes descritos con respecto a su función en el retículo endoplásmico, son controversiales, ya que en algunos se piensa que al aumentar Bcl-2 en esta membrana, se promueve la señalización para el proceso celular de apoptosis, sin embargo, en otros reportes se sugiere que el aumento en las concentraciones de Bcl-2 trae consigo un aumento en la actividad o presencia de las enzimas del sistema de respuesta antioxidante endógenas, en el que Bcl-2 juega un papel importante en la transducción de señales, principalmente vía IP3 (Distelhorst y Shore, 2004)

Por otro lado, se sabe que el estrés oxidativo puede generar daños oxidativos en el ADN, lo cual puede activar los mecanismos de respuesta celular de reparación del ADN o bien la muerte celular. Durante estos fenómenos están involucradas diversas proteínas. Una de las más importantes es la proteína p53, la cual además de registrar el daño al ADN, puede modular la muerte celular (Liu y col., 1996). Este mecanismo celular es activado cuando la proteína ATM, la cual es un sensor de daño al ADN que fosforila a p53 (Savitsky y col. 1995), que de esta manera actúa inhibiendo la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2, lo que trae como consecuencia un desbalance en el cociente Bcl-2/Bax, favoreciendo a la proteína

proapoptótica e induciendo la muerte celular, tal como se observa en el tratamiento con 200 μM de H_2O_2 . Lo anterior nos lleva a pensar que el hecho de que se inhiba el evento de inducción de la expresión del ARNm para Bcl-2 en estado de estrés oxidativo elevado, pudiera ser por el daño sobre ADN y el efecto de la proteína p53, y no únicamente por cambios en el estado redox.

Sin embargo, para probar esta hipótesis es necesario realizar otros experimentos que esclarezcan estos posibles mecanismos, para ver si influyen en la expresión de Bcl-2.

9. CONCLUSIÓN

La línea celular de fibroblastos de pulmón de ratón L-929, presenta cambios morfológicos a las 12 horas de haberse inducido un estado de estrés oxidativo, con 50 μM de H_2O_2 , así como, a las 9 horas de tratamiento con concentraciones de 150 y 200 μM de H_2O_2 ; en tanto que, la viabilidad celular de los fibroblastos de pulmón de ratón L-929, disminuye significativamente con respecto al control, en un estado de estrés oxidativo inducido durante 9 horas con 200 μM de H_2O_2 ; por otra parte, la funcionalidad celular se ve disminuida en todos los tratamientos con diferentes concentraciones con H_2O_2 y en todos los tiempos evaluados durante la inducción de un estado de estrés oxidativo en la línea celular L-929.

El tiempo de máxima expresión del ARNm que codifica para la proteína Bcl-2, es de 9 horas, cuando se induce un estado de estrés oxidativo, con 50 μM de H_2O_2 en la línea celular L-929; en este mismo tratamiento, se presenta la máxima expresión del ARNm de Bcl-2, en comparación con todos los estados de estrés oxidativo inducidos con las concentraciones 100,150 y 200 μM de H_2O_2 los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

El ARNm que codifica para la proteína Bax, tiene un máximo de expresión a las 9 horas de haberse inducido un estado de estrés oxidativo con 200 μM de H_2O_2 y no presenta diferencias estadísticamente significativas en tratamientos con 50, 100 y 150 μM de H_2O_2 durante el mismo lapso de tiempo, en la línea celular L-929.

El cociente de expresi3n Bcl-2/Bax, indica que en la inducci3n de un estado de estr3s oxidativo con 50µM de H₂O₂ durante 9 horas, la l3nea L-929 presenta un estado de supervivencia celular, mientras que, con una inducci3n de 200 H₂O₂ durante 9 horas, la l3nea celular de fibroblastos de pulm3n de rat3n, presenta una tendencia a la muerte celular.

10. PERSPECTIVAS

Como se mencionó en la discusión, sería muy interesante realizar experimentos en los cuales se evalúe el estado redox en el cual se encuentran las células al someterlas a las mismas condiciones de estrés oxidativo que se usaron en este trabajo. Por ejemplo, determinando el cociente GSH/GSSG. Así mismo, cuantificar el daño al ADN en esas condiciones y la posible participación de p53.

El determinar los mecanismos de regulación de la expresión de Bcl-2 es otro de los puntos a esclarecer, por lo que es importante determinar la vía de transducción de señales que se da en los diferentes estadios de estrés oxidativo a los que se ven sometidas las células de la línea celular L-929. Sería conveniente evaluar al factor de transcripción nuclear NF- κ B, a las proteínas p53, ATM y JNK, con la finalidad de determinar los mecanismos de regulación de la expresión de Bcl-2 ante diferentes retos oxidativos y con ello dar un paso importante en el entendimiento del papel de Bcl-2 en los diferentes procesos fisiológicos en los que participa.

Sería también de gran importancia el determinar el mecanismo celular que rige el destino de la proteína Bcl-2 en las diversas membranas celulares en respuesta al estado de estrés oxidativo. Con todos estos experimentos se daría un avance en el entendimiento de los mecanismos celulares relacionados a Bcl-2 y principalmente al del envejecimiento.

11. REFERENCIAS

- Adams J.M., Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 281:1322-1326.
- Ames B.N., Shigenaga M.K. (1992) Oxidants are a major contributor to aging. *Ann N.Y. Acad. Sci* 663:85-96.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proct.Natl.Acad.Sci.USA* 90:7915-7922.
- Amit G.K., Bharat B., Aggarwal B. (2002) Reactive oxygen intermediates in TNF signalling. *Mol. Immun.* 39: 509-517.
- Baliga B.C., Kumar S. (2002) Role of Bcl-2 family of proteins in malignancy. *Hematol. Oncol.* 20: 663-674.
- Beal M.F. (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Rad. Biol. Med.* 32: 791-803.
- Burner G.C., Motulsky H., Zeigler C.J., Norwood T.H. (1983) Inhibition of DNA synthesis in young cycling human diploid fibroblast-like cells upon fusion to enucleate cytoplasts from senescent cells. *Exp.Cell.Res.* 145:79-84.
- Campisi J. (1998) The role of cellular senescence in skin aging. *Cell Senescence* 3:1-5.
- Campisi J. (2001) Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biol.* 11(11): s27-s31.
- Chen Q.M., Liu J., Merrett J.B. (2000) Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *Biochem.J.* 347:543-551.

- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M., Green D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-1014.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium, thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Chomczynski P., (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 15:532-534, 536-537.
- Cristofalo V.T., Allens R.G., Pingnolo R.J., Martin B.G., Beck J.C. (1998) Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95:10614-10619.
- Degli E.M., Dive C. (2003) Mitochondrial membrane permeabilization by Bax/Bak. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:455-461.
- Deng G., Su J., Ivins K., Van Houten B., Cotman C. (1999) Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage alter oxidative stress. *Exp. Neurol.* 159: 309-318.
- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott D., Roskelley C. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:9363-9367.
- Distelhorst C.W., Shore C.G. (2004) Bcl-2 and calcium: controversy beneath the surface. *Oncogene* 23: 2875-2880.

- Drescher-Lincoln C.K., Smith J.R. (1983) Inhibition of DNA synthesis in proliferating human diploid fibroblast by fusion with senescent cytoplasm. *Exp. Cell Res.* 144: 455-462.
- Gaffinkel S., Hu X., Prudowsky I.A., McMahon G.A., Kapnik E.M., McDowell S.D. (1996) FGF-1-dependent proliferative and migratory responses are impaired in senescent human umbilical vein endothelial cells and correlate with the inability to signal tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 substrates. *J. Cell. Biol.* 134: 783-791.
- Galter S., Mihm S., Dröge W. (1994). Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors kB and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem.* 221: 639-648.
- Gorvunova V., Seluanov A., Pereira-Smith O.M. (2002) Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J. Biol. Chem.* 277: 38540-38549.
- Haddad J.J. (2004). On the antioxidant mechanisms of Bcl-2: a retrospective of NFkB signalling and oxidative stress. *Biochem. Biophys Comm.* 322: 355-363.
- Halliwell B., Gutteridge M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-14.
- Harman D. (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontology* 11:298-300.

- Harman D. (1998) Aging: Phenomena and theories. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 854:1-7
- Hasler J., Estabrook R., Murray M. Pikuleva, I., Waterman N., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck R., Farrell G., Kaminsky L., Spivac S., Boitier E., Beaune P. (1999) Human cytochromes P450. *Mol. Aspects, Med.* 20:1-137.
- Hayflick L. (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains *Exp Cell Res.* 37:614-36.
- Hildeman D.A., Mitchell T., Aronov B., Wojciechowsky S., Kappler J., Marrack P. (2003) Control of Bcl-2 Expression by reactive oxygen species. *Proct. Nat. Aspects.* 100: 15035-15040.
- Ho Y.S., Magnenat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M., Funk C.D. (1997) Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* 272: 16644-16651.
- Hockenbery D.M., Oltavi Z., Ying X., Milliman C., Korsmeyer S. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 75: 241-251.
- Hoetelmans, R.W., Slooten, H.J., Keijzer, J., Erkeland, S., Van de Velde, C.D., and J.H. van Dierendonck (2000) Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death and Dif.* 7: 384 – 392.
- Jang J.H., Surh Y.J. (2004). Bcl-2 attenuation of oxidative cell death is associated with up-regulation of γ -glutamylcysteine ligase via constitutive NF κ B activation. *J. Biol. Chem.* 279: 38779-38786.

-
- Krajewsky S., Krajewsky M., Shabaik A., Miyashita T., Wang H.G., Reed J.C. (1994) Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am. J. Pathol.* 145:1323-1344.
 - Königsberg M., López-Díaz Guerrero N.E., Aguilar M.C. Ventura J.L., Gutiérrez-Ruiz M.C. Zentella A. (2004). Senescent phenotype achieved *in vitro* is indistinguishable, with the exception of Bcl-2 content, from that attained during the *in vivo* aging process. *Cell. Biol. Int.* 28:641-651.
 - Lee M.H., Hyun D.H., Marshall K.A., Ellerby L.M., Bredesen, D.E., Jenner P. (2001a). Effect of overexpression of Bcl-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defences and the proteasome. *Free Rad. Biol. Med.* 31:1550-1559.
 - Lee Y.J., Chen J.C., Amoscato A.A., Bennouna J., Spitz D.R., Suntharalingam M., (2001b). Protective role of Bcl-2 in metabolic oxidative stress-induced cell death. *J. Cell Sci.* 114: 677-684.
 - Liu Z.G., Baskaran R., Lea-Chou E.T., Wood L.D., Chen Y., Karin M., Wang J.Y. (1996) Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress. *Nature* 384: 273–276.
 - López-Araiza H., Ventura J.L., López-Díazguerrero N.E., González-Marquez H., Gutiérrez-Ruiz MC. Zentella A. Königsberg M. 2006. Organ- and tissue-specific alterations in the anti-apoptotic protein Bcl-2 in CD1 female mice of different ages. *Biogerontology*.7: 63-67.
 - López-Díazguerrero N.E., López-Araiza H., Conde-Pérezprina J.C., Buzio L., Cárdenas Aguayo M.C., Ventura J.L., Covarrubias L., Gutiérrez-Ruiz M.C.,
-

-
- Zentella A., Konigsberg M. (2005) Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Rad Biol Med.* 40: 1161-1169.
- Lundberg A.S., Hahn W.C., Gupta P., Weinberg R.A. (2000) Genes involved in senescence and immortalization. *Cell Multiplication* 12: 705-709.
 - Markesbery W.R. (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.* 23: 134-147
 - Melov S., Schneider J.A., Day B.J., Hinerfeld D., Coskun P., Mirra S.S., Crapo J.D., Wallace D.C. (1998) A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 18:159-163.
 - Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65:55-63.
 - Niwa K, Inanami O, Yamamori T, Ohta T, Hamasu T, Kuwabara M. (2003) Redox regulation of PI3K/Akt and p53 in bovine aortic endothelial cells exposed to hydrogen peroxide. *Antioxid Redox Signal* 5 (6):713-722.
 - Norwood T.H., Pendergrass W.R., Sprague C.A., Martin G.M. (1974) Dominance of the senescent phenotype in heterokaryons between replicative and post-replicative human fibroblast-like cells. *Proc. Natl .Acad .Sci. USA* 71:2231-2235.
 - Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609
-

-
- Orr W.C., Sohal R.S. (1994) Extension of life span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1120-1130.
 - Pantoja C., Serrano M. (1999) Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18: 4974-4982.
 - Pereira-Smith O.M., Smith J.R. (1983) Evidence for the recessive nature of cellular immortality. *Science* 221:964-966.
 - Pérez-Campo R., López-Torres M., Cadenas S., Rojas C., Barja G. (1998). The rate of free radical production as a determinant of the rate aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B.* 168:149-158.
 - Rhman I., Saibal K. B., Jimenez L.A., Torres M., Forman H.J. (2005). Glutathione, Stress Responses, and Redox signalling in lung inflammation. *Antiox. Redox Signaling.* 7: 42-58.
 - Riabowol K., Schiff L., Gilman M.Z. (1992) Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 89:157-161.
 - Rittling S.R., Brooks K.M., Cristofalo V.J., Baserga R. (1986) Expression of cell cycle-dependent genes in young and senescent WI-38 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3316-3320.
 - Sanford K.K., Earle W.R. , Likely G.D. (1948) *J. Natl. Cancer Inst.* 9:229-246.
-

-
- Savitsky, K. Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaite L., Tagle D.A., Smith S., Uziel T., Sfez S. (1995) A single Ataxia Telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749–1753.
 - Schuler M., Green D.R. (2005) Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet.* 21:182-187
 - Scorrano L., Korsmeyer S.J. (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304: 437-444.
 - Seshadri T., Campisi J. (1990) Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 247: 205-209.
 - Sherwood S.W., Rush D., Ellsworth J.L., Schimke R.T. (1988) Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Natl .Acad .Sci. USA.* 85: 9086-9090.
 - Sohal R.S., Orr W.C. (1995) Is oxidative stress a causal factor in aging? In: Esser K., Martin G.M. Eds. *Molecular aspects of aging.* Chichester: John Wiley and Sons, pp. 109-127.
 - Speidel D., Helmbold H., Deppert W. (2006) Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene.* 25(6):940-953.
 - Spencer J., Jenner A., Okezie I., Cross C., Wu R., Halliwell B. (1996) Oxidative DNA in human respiratory tract epithelial cells. Time course in
-

-
- relation to DNA strand breakage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224 (1):17-22.
- Steinman H.M. (1995) The Bcl-2 Oncoprotein functions as a prooxidant. *J. Biol. Chem.* 270: 3487-3490.
 - Turnes J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. (1995) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237:408-414.
 - Vairo G., Soos T., Upton T.M. Zalvide J., Decaprio J.A., Ewen M.E. (2000) Bcl-2 retards cell cycle entry I,through p27kip , pRb relative p130 and altered E2FR regulation. *Mol. Cell biol.* 20:4745-4753.
 - Vanfleteren J.R., De Vreese A. (1996) Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp .Zool.* 274:93-100.
 - Yanishevsky R.M., Stein G.M. (1980) Ongoing DNA synthesis continues in young human diploid cells (HDC) fused to senescent HDC, but entry into S phase is inhibited. *Exp .Cell. Res.* 126: 469-472.
 - Yin X.M., Oltvai Z.N., Kormeyer S.J. (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321.
 - Yu B.P. (1996) Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free.Rad.Biol.Med.* 21:651-668.
 - Yu B.P., Yang R. (1996) Critical evaluation of the free radical theory of aging: A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 786:1-11.
-

“Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: Expresión de Bcl-2 ante el reto oxidativo, con fecha 11 de Octubre del 2006”.


JURADO DE EXAMEN



Presidente

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

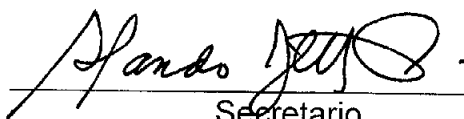
Departamento de Biología de la Reproducción
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Secretario

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México