

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

SENESCENCIA PREMATURA INDUCIDA POR ESTRÉS (SIPS) DE CÉLULAS
EPITELIALES DE PRÓSTATA HUMANA Y CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO
SECRETOR SENESCENTE (SASP)

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Verónica Salas Venegas

Comité tutorial:

Directora: Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero

Asesora Interna: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

Asesora Externa: Dra. Rebeca López Marure

12/2018

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y en el Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 458430

Este trabajo estuvo financiado por el proyecto CONACyT 255591 a cargo de la Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero.

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) de células epiteliales de próstata humana y caracterización del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)" que presentó **Verónica Salas Venegas** el día 07 de diciembre del año 2018.

Presidente: Dra. Mina Königsberg Fainstein
Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa




Secretaria: Dra. Rebeca López Marure
Departamento de Fisiología
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Vocal: Dra. Erika Olivia Gómez González
Academia de Biología
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ERIKA O. GÓMEZ

Vocal: Dra. Fela Mendlovic Pasol
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM



Comité Tutorial:

Directora de Tesis: Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero

Profesora titular C, Dpto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

norm@xanum.uam.mx

+(5255) 5804 4732

Asesora Interna: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

Profesora titular C, Dpto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma

Metropolitana Unidad Iztapalapa

mcgr@xanum.uam.mx

+(5255) 5804 4730

Asesora Externa: Dra. Rebeca López Marure

Investigador en Ciencias Médicas, Departamento de Fisiología. Instituto Nacional
de Cardiología “Ignacio Chávez”

rlmarure@yahoo.com

55732 9211 Ext. 25401

Agradecimientos:

Quiero agradecer a mi familia por el apoyo brindado durante este tiempo ante el trabajo que esto implico. Gracias mamá por tu cariño y comprensión, gracias hermano por tus consejos, pero sobre todo a ti papá por brindarme tu ayuda en todo lo que está a tu alcance.

A la Dra. Norma y la Dra. Mina por su ayuda, por el tiempo invertido y por la confianza.

A la Dra. Conchita por el tiempo y observaciones realizadas al proyecto, por siempre recibirme tan amablemente en su laboratorio.

Gracias especiales a la Dra. Rebeca por haberme abierto las puertas de su laboratorio en momentos difíciles, por su amabilidad, interés y aportaciones tan importantes a este proyecto. Gracias a la Dra. Eri por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Quiero agradecer a mis amigos y compañeros de generación de la maestría Angie, Roberto, Nayarit y Omar por todos los momentos tan agradables, las risas y esas pláticas interminables.

Gracias Susi por los consejos, por tener siempre una palabra para animarme y por esas charlas que duraban horas en el teléfono.

A mis compañeros de laboratorio de bioenergética por hacer mi estancia en el laboratorio más amena.

Gracias a ti Jesús por estar conmigo en todo momento y darme la victoria en cada prueba que me das como misión realizar, en ti todo es posible.

Resumen:

La senescencia celular (SC) es un fenómeno en el que las células detienen su proliferación después de un número limitado de duplicaciones o como respuesta ante el estrés. En la SC hay cambios en la expresión génica, nula respuesta ante estímulos apoptóticos o mitogénicos, y el desarrollo de un secretoma denominado “Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia” (SASP). La senescencia puede establecerse en distintos tipos celulares, sin embargo, el modelo más estudiado es el de fibroblasto. Las diferencias que existen entre los diversos tipos celulares, hacen suponer que las células epiteliales senescentes pudieran tener un comportamiento distinto a lo descrito en los fibroblastos.

Se ha observado una asociación entre las patologías en próstata, el estrés oxidante y la presencia de células epiteliales senescentes, sin embargo se desconoce de qué manera la senescencia contribuye al establecimiento y desarrollo de esas patologías.

El objetivo de esta investigación fue evaluar los parámetros de senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) y los componentes del SASP de células epiteliales de próstata humana (HPEC) senescentes, así como los efectos de este secretoma sobre la proliferación celular. Para lo cual se indujo SIPS en las HPEC con 12 μM de H_2O_2 , concentración menor a lo reportado en fibroblastos de pulmón de ratón y humano (75 μM). La respuesta a estímulos mitogénicos dada por el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) a HPEC senescentes fue nula. El análisis del SASP del día 4 después de SIPS, mostró incrementos en la expresión de las citocinas IL-6, IL-8, de las quimiocinas $\text{GRO}\alpha/\beta/\gamma$ (CXCL1/CXCL2/CXCL3) y del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF); sin embargo, para el día 9, la concentración de estos componentes disminuyó y no promovió la proliferación en un cultivo HPEC sometido a este SASP. Por lo tanto la respuesta al estrés para la inducción de SIPS en las HPEC es diferente de los fibroblastos, sin embargo, la expresión de marcadores del estado senescente p16, p21, p53 y β -gal, el comportamiento dinámico en los componentes del SASP y la respuesta nula ante estímulos mitogénicos es similar a lo reportado en fibroblastos.

Abstract

Cellular senescence (CS) is a process where cells stop proliferating after a limited number of duplications, or a response to stress. In CS, there are changes in gene expression, no response to apoptotic or mitogenic stimuli, and the expression of a secretome called "The Senescence-Associated Secretory Phenotype" (SASP). CS can be established in different cell types; however, the most studied model is the fibroblast. The differences between the cell types suggest that the senescent epithelial cells could behave differently from those classical senescent parameters described in fibroblasts.

Has been observed an association between prostatic diseases, oxidative stress and the presence of senescent epithelial cells, but is not clear how senescence contributes to the establishment and development of these pathologies.

The objective of this research was to evaluate senescence parameters and SASP components of senescent human prostate epithelial cells (HPEC), as well as the effects of this secretome on cell proliferation. SIPS was induced in HPEC with 12 μM of H_2O_2 , a lower concentration than the reported in mouse and human lung fibroblasts (75 μM). The response to mitogenic stimuli by the Epidermal Growth Factor (EGF) to senescent HPEC was null. The SASP analysis of day 4 after SIPS, increases in the expression of the cytokines IL-6, IL-8, chemokines GRO7 α / β / γ chemokines (CXCL1/CXCL2/CXCL3) and colony stimulating factor of granulocytes/macrophages (GM-CSF) were found; however, by day 9, the concentration of these components decreased and did not promote proliferation in a non-senescent HPEC culture subjected to this SASP. Therefore the stress response for the induction of SIPS in the HPEC is different from the fibroblasts, however, the expression of senescent markers p16, p21, p53 and β -gal, the dynamic behavior in the components of the SASP and the null response to mitogenic stimuli is similar to that reported in fibroblasts.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Envejecimiento	1
1.1.1 Características del envejecimiento	1
1.2 Senescencia celular (SC)	2
1.2.1 Mecanismo de establecimiento y mantenimiento de la senescencia	5
1.2.2 Actividad de la β-Galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-Gal)	7
1.3 Fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)	8
1.3.1 Funciones del SASP	9
1.4 Senescencia en células epiteliales	9
1.5 Cáncer de próstata (PCa)	12
1.6 Fisiología de la próstata	14
1.6.1. Células NE	16
1.6.2 Células basales	16
1.6.3 Células luminales	16
1.6.4 Células intermedias	17
1.7 Estrés oxidante en cáncer de próstata como inductor de senescencia en la próstata	17
1.8 Senescencia Prematura Inducida por Estrés (SIPS) como modelo de estudio	19
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVO GENERAL	25
7. OBJETIVOS PARTICULARES	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS	25
8.1 Cultivos primarios de células epiteliales de próstata	25
8.2 Inducción de senescencia prematura por estrés (SIPS)	26
8.3 Parámetros de senescencia celular	26
8.3.1 Proliferación celular	26
8.3.2 Ensayo SA- β-Galactosidasa	27
8.4 Expresión de marcadores del establecimiento de la senescencia	27
8.5 Análisis del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)	28
.....	29

8.6 Respuesta a estímulos mitogénicos	30
8.7 Efecto del SASP en la proliferación de células no senescentes	31
8.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	32
9. RESULTADOS	33
9.1 Proliferación celular después de SIPS.....	33
9.3 Evaluación de parámetros de senescencia	36
9.4 Análisis del SASP.....	38
9.5 Evaluación de la respuesta proliferativa ante estímulos mitogénicos de células senescentes.....	42
9.6 Evaluación del efecto del SASP en la proliferación celular	45
10. DISCUSIÓN.....	47
11. CONCLUSIÓN.....	52
12. PERSPECTIVAS	53
13. REFERENCIAS	54

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno que se caracteriza por la pérdida progresiva de la integridad fisiológica de un organismo que conduce a un deterioro en sus funciones y que finalmente lo conduce a la muerte. Este deterioro es el principal factor de riesgo para el desarrollo de algunas patologías humanas, incluyendo cáncer, diabetes, trastornos cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas entre otras (López-Otín *et al.*, 2013).

Se han propuesto diversas teorías mediante las cuales se ha intentado explicar el proceso de envejecimiento. Estas se dividen en dos categorías principales: la primera categoría se compone de teorías que sostienen que el envejecimiento es un evento que está programado. La segunda categoría con teorías que sugieren la existencia de varias fuentes generadoras de daño siendo el envejecimiento el resultado. Cabe mencionar que estas teorías no son mutuamente excluyentes (Sergiev *et al.*, 2015).

1.1.1 Características del envejecimiento

La característica más prominente del envejecimiento es una pérdida gradual de la función o degeneración que se produce en los niveles molecular, celular, tisular y del organismo. La degeneración de uno o más tejidos es un fenotipo extremadamente común y prominente relacionado con la edad (Campisi, 2013).

Los estudios en las últimas décadas han identificado rasgos celulares y moleculares comunes asociados con el envejecimiento que se han propuesto como características distintivas y que han ayudado a comprender el proceso de envejecimiento. Estas características son: senescencia celular, inestabilidad genómica, desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, agotamiento en las células madre y comunicación celular alterada (López-Otín *et al.*, 2013). Un desafío importante es analizar la interconexión entre las características y su contribución al envejecimiento y patologías asociadas.

1.2 Senescencia celular (SC)

Este fenómeno fue descrito originalmente por Hayflick y Moorhead en los años sesenta. Después de monitorear la proliferación de fibroblastos humanos a través de varios pasajes en cultivo notaron que los fibroblastos tenían un número limitado de duplicaciones, a lo que llamaron límite de Hayflick (Fig. 1) (Hayflick y Moorhead, 1961).

La SC es un fenómeno que se caracteriza por una detención estable e irreversible de la proliferación celular en la fase G0/G1 del ciclo. Las células senescentes experimentan cambios en la morfología generalmente hacia una forma plana y agrandada (Kong *et al.*, 2011), además de una reprogramación metabólica evidenciada por la implementación de un secretoma (SASP) (Kuilman *et al.*, 2010; Salama *et al.*, 2014).

Posteriormente se determinó que la SC observada por Hayflick en cultivos celulares se debía al acortamiento de los telómeros, por lo que se denominó senescencia replicativa (SR) (Bodnar *et al.*, 1998). Sin embargo, se sabe que también otros estímulos pueden generar esta respuesta independientemente del desgaste telomérico (Tabla 1). La SC que se desencadena como respuesta a daño al ADN o por exposición a un agente capaz de generar estrés oxidante (radiación, luz UV, quimioterapias, etc.), se conoce como senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) (Childs *et al.*, 2014; López-Diazguerrero *et al.*, 2006).

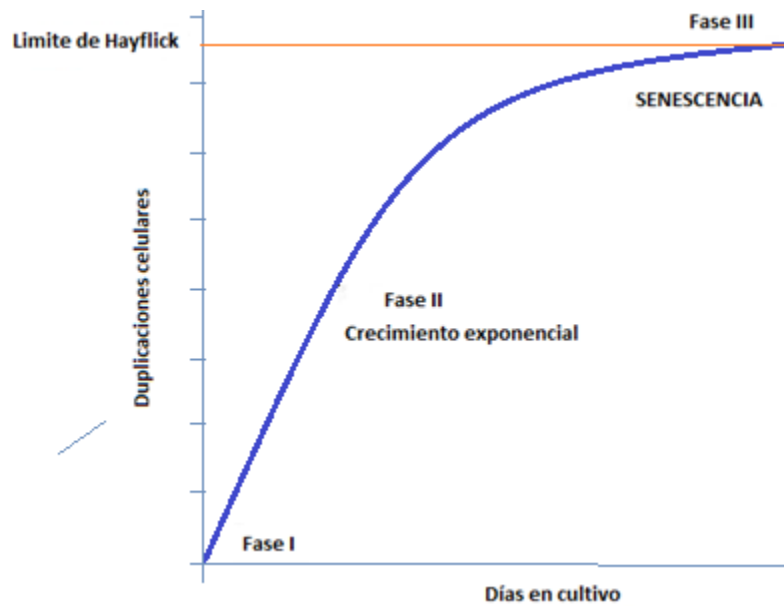


Figura 1. Las tres fases del cultivo celular de Hayflick. La fase I consiste en el establecimiento del cultivo primario, la fase II representa a las células durante el período de replicación exponencial y la fase III denominada “Senescencia” representa el período en que cesa la replicación celular pero el metabolismo continúa (Tomado y modificado de Shay *et al.*, 2000).

<p>Senescencia Replicativa SR</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Las células normales tienen una vida de replicación finita. El proceso que limita el potencial proliferativo de las células se ha denominado replicativa y ocurre en después de varias divisiones celulares en respuesta al acortamiento de los telómeros (Campisi, 1997).
<p>Senescencia Prematura Inducida por Estrés SIPS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sucede después de la exposición de las células diploides humanas al factores que generan estrés oxidante y con ello un potencial daño al ADN (radiación UV, quimioterapias, peróxido de hidrogeno) (Toussaint, <i>et al.</i>, 2000).
<p>Senescencia Prematura Inducida por Inhibición del Proteosoma SPIIP</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Una función disminuida del proteosoma dada por el tratamiento con un inhibidor específico del proteosoma como epoxomicina induce un fenotipo senescente (Chondrogianni y Gonos 2004).
<p>Senescencia Inducida por Oncogenes OIS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta provocada por la señalización oncogénica resultante de una mutación activadora de un oncogén o la inactivación de un gen supresor de tumores. (Chandek y Mooi, 2010).

Tabla 1. Distintos tipos de inducción de senescencia. Se muestra como distintos estímulos pueden inducir la respuesta senescente.

La SC no es exclusiva de los tejidos de organismos envejecidos, es también un mecanismo poderoso de supresión tumoral (Collado *et al.*, 2007) mediante el cual se impone un límite en la proliferación. Debido a la detención irreversible en la proliferación que presentan las células senescentes, se propuso a la SC como una barrera para células potencialmente disfuncionales, transformadas o envejecidas. Estudios recientes han mostrado que la SC también tiene roles fisiológicos en la morfogénesis embrionaria y en procesos de reparación y regeneración celular (Muñoz-Espín *et al.*, 2013).

1.2.1 Mecanismo de establecimiento y mantenimiento de la senescencia

Como se describió previamente las células senescentes se detienen irreversiblemente en la fase G0/G1 del ciclo y ya no pueden replicarse. Durante la SR hay una pérdida gradual de ADN en los extremos cromosómicos ya que en la fase S del ciclo celular las ADN polimerasas no sintetizan la porción de ADN que funciona como cebador y solamente sintetizan la cadena de manera unidireccional, generando un fenómeno conocido como desgaste de telómeros. De esta manera, se genera una respuesta persistente de daño al ADN (DDR: *DNA damage response*) que evita la progresión del ciclo celular (Campisi, 1997). La DDR puede ser iniciada por cinasas como la ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) o la ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*). La ATM es reclutada y activada por proteínas que se unen a sitios del ADN donde se ha roto la doble cadena (DSBs *proteins, Double-Strand Breaks*), mientras que la ATR es reclutada y activada por la proteína RPA (*Replication Protein A*). Una vez activas, la ATM y la ATR activan a sus blancos CHK2 y CHK1, respectivamente, que pueden activar a la proteína p53 que a su vez regula procesos como la reparación del ADN, la detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis (Riley *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2009). Un gen blanco de la p53 es el inhibidor del ciclo celular p21 que inhibe los complejos CDK2/Ciclina E y CDK4/6/Ciclina D que son importantes para la progresión del ciclo celular (Coqueret 2003; Chiu *et al.*, 2012), induciendo así la detención de la proliferación.

En el caso de la SIPS el daño generado por estrés oxidante puede activar también la vía de DDR y p53, o bien activar la vía de pRB (Retinoblastoma Protein)/p16 (Muller, 2009). La proteína p16 es un inhibidor del ciclo celular particular de la fase

G1, ya que actúa inhibiendo los complejos CDK4/6/Ciclina D impidiendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma pRb, evitando así la liberación de E2F y la progresión del ciclo celular (Muller, 2009) (Fig. 2). Cabe resaltar que la presencia de estas proteínas es utilizada para validar el establecimiento de la senescencia.

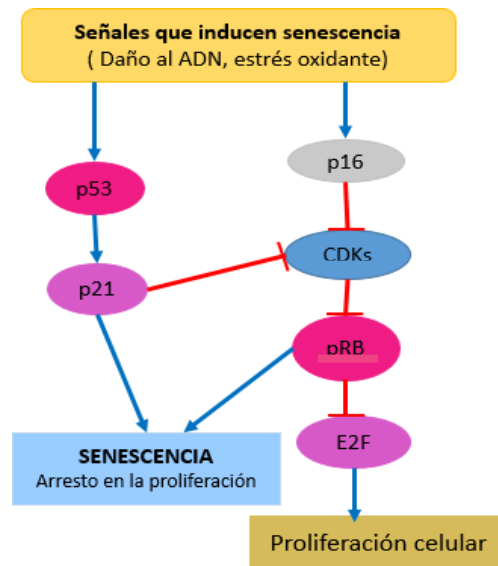


Figura 2. Mecanismo de establecimiento y mantenimiento de la senescencia (Tomado y modificado de Campisi y d' Adda di Fagagna, 2007)

La detención de la senescencia se considera irreversible porque ningún estímulo fisiológico conocido puede estimular a las células senescentes para que vuelvan a entrar en el ciclo celular. Sin embargo, las manipulaciones biológicas moleculares, por ejemplo, la inactivación secuencial de ciertos genes supresores de tumores, pueden hacer que las células senescentes proliferen e incluso se plantea la existencia de circunstancias fisiológicas hasta ahora no reconocidas donde las

la detención en la proliferación de la senescencia podría ser reversible (Campisi, 2013)

1.2.2 Actividad de la β -Galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -Gal)

Uno de los marcadores para identificar a las células senescentes es la tinción β -galactosidasa (SA- β -Gal). Esta actividad deriva de la β -galactosidasa lisosómica ácida en células senescentes y que es detectable a un pH casi neutro (pH6) porque está sobreexpresada a diferencia de la actividad de la enzima a pH 4 que normalmente se encuentra en las células. La β -Galactosidasa (β -Gal) es una enzima lisosomal que rompe el enlace O-glucosídico de la lactosa para obtener como producto glucosa y galactosa .La actividad de la β -galactosidasa en un cultivo senescente se determina por el ensayo desarrollado por Dimri y cols. en 1995, y que consiste en la incubación de células con el reactivo X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indolil β -D-galactosidasa) para que sea escindido por la β –galactosidasa celular dando como resultado un producto de coloración azul (Fig. 3B). Las células negativas para la actividad de la β -galactosidasa suelen ser pequeñas y delgadas, lo que indica que no son senescentes en lo que respecta a la morfología (Fig.3A) (Cho y Hwang, 2011).

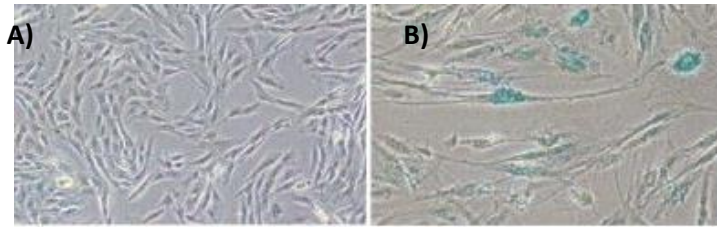


Figura 3. A) Fibroblastos de pulmón humano Wi-38 proliferantes. B) Wi-38 senescentes positivos al ensayo SA- β -Gal (Cheng *et al.*, 2005)

1.3 Fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)

El SASP incluye una variedad de factores entre los que destacan factores de crecimiento, interleucinas, quimiocinas y metaloproteasas. Estos factores pueden afectar a las células circundantes mediante la activación de receptores de la superficie celular y vías de transducción de señales (Coppé, 2010; Bianchi-Frias *et al.*, 2010).

La secreción del SASP ocurre días después de que las células comienzan a expresar los marcadores de senescencia (como p16, p21, p53 y β -gal) (Rodier, *et al.*, 2011) por lo que, primordialmente, el SASP es considerado como una respuesta retardada al daño genómico (Rodier *et al.* 2009; Rodier *et al.*, 2011).

El SASP presenta cierta plasticidad, es decir, las moléculas que se incluyen en el SASP varían entre los tipos de células y, en cierta medida, con el estímulo que indujo la respuesta de senescencia (SR, SIPS; OIS o SPIIP) Sin embargo, existe una superposición sustancial entre los componentes del SASP: las citocinas proinflamatorias son la característica más conservada (Campisi, 2013).

1.3.1 Funciones del SASP

La combinación específica de factores secretados dependerá del tipo de célula y del inductor senescente, es por esto que las actividades biológicas del SASP son innumerables. El SASP puede estimular la proliferación celular, debido a proteínas como la quimiocina GRO α , osteopontina y anfiregulina, así como estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos, debido a proteínas como el VEGF. Además, algunos factores del SASP inducen una transición epitelio-mesénquima en células susceptibles. Otros como SFRP1, GRO α e IL-6 pueden alterar la proliferación (McHugh y Gil, 2017; Campisi, 2012).

Muchos componentes del SASP promueven directa o indirectamente la inflamación. Estos factores incluyen a la IL-6 e IL-8, una variedad de MCPs (proteínas quimioatrayentes de monocitos), MIPs (proteínas inflamatorias de macrófagos) y proteínas que regulan múltiples aspectos de la inflamación, como el GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos). Se puede predecir que la secreción de estas y otras proteínas similares por las células senescentes causa inflamación crónica, al menos localmente y posiblemente de manera sistémica. La inflamación crónica, por supuesto es un contribuyente importante para casi todas las enfermedades importantes relacionadas con la edad, tanto degenerativas como hiperplásicas (Campisi, 2013).

1.4 Senescencia en células epiteliales

Aunque los estudios *in vivo* muestran que la senescencia puede afectar a una variedad de tipos de células, los modelos celulares *in vitro* utilizados de forma

recurrente son muy escasos y generalmente se utilizan fibroblastos (por ejemplo, IMR90 y WI-38) como ha sucedido desde los estudios iniciales de Hayflick. Por lo tanto, la mayoría de nuestro conocimiento y los conceptos sobre la senescencia están acotados al tipo celular de fibroblasto.

Las células epiteliales aunque desempeñan importantes funciones estructurales y funcionales en la mayoría de los órganos humanos y participan en numerosas patologías, especialmente el cáncer, son poco consideradas en estudios de senescencia.

En algunos tipos de células epiteliales humanas normales, como las células epiteliales de mama y queratinocitos en cultivo, la SR se establece de forma muy atípica, ya que se realiza en dos pasos (Fig. 4). Las células después de proliferar exponencialmente en cultivo, se someten a una primera detención del crecimiento que se produce después de 10 a 20 divisiones celulares. Esta primera meseta se denomina “M0” o “senescencia temprana”. En esta meseta, las células comparten las principales características de la senescencia: tienen una morfología aplanada, la mayoría de ellas son positivas para SA-β-Gal, expresan un secretoma inflamatorio (SASP) y están detenidas principalmente en la fase G0/G1 del ciclo celular. Lo más importante de esta detención, es que el ciclo celular no es irreversible en todas las células. Aproximadamente una célula de cada 10^4 escapa espontáneamente del estado senescente, pierde la actividad de SA-β-Gal y continúa su progresión en el ciclo celular para dar lugar a clones celulares que se someten a otras 5-45 divisiones celulares. Estas células post-senescentes luego experimentan una segunda meseta de crecimiento denominada “M1” o “segunda

meseta”. En esta meseta las células muestran nuevamente los principales marcadores (p16, p21 y p53) de senescencia: muestran un aspecto aplanado y agrandado, la actividad β -Gal aumenta y expresan un SASP (Abbadie et al., 2017).

Para otros tipos de células epiteliales, los estudios son escasos y a menudo es difícil determinar, según los datos disponibles en los artículos, si la senescencia espontánea *in vitro* ocurre en uno o dos pasos. Algunos datos que se han recopilado muestran que algunas células epiteliales normales, inmortalizadas o transformadas que entran en la senescencia después de un estrés como SIPS o una manipulación farmacológica o genética, desarrollan la senescencia rápidamente y aparentemente en un solo paso (Abbadie et al., 2017).

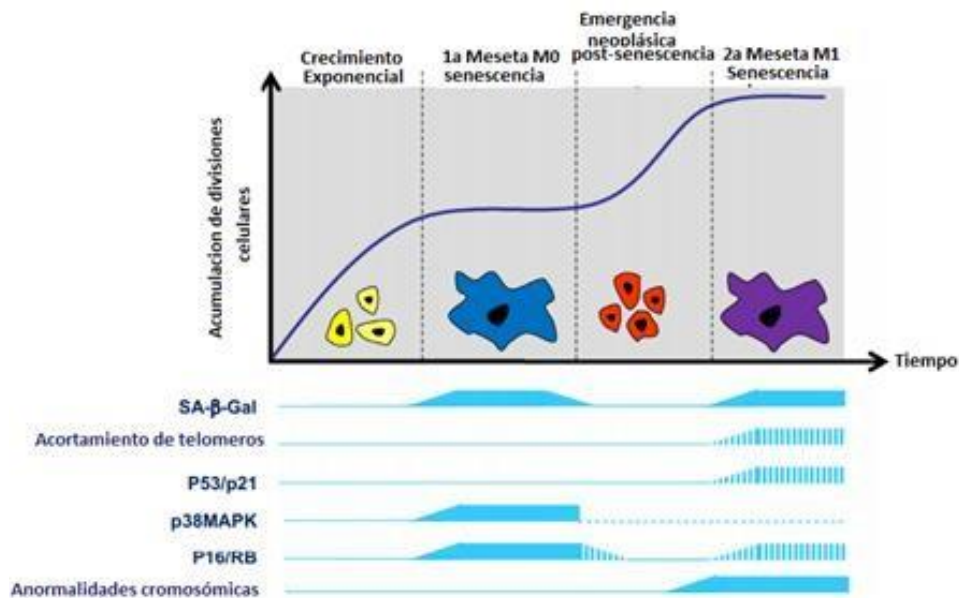


Figura 4. Esquema del establecimiento de la senescencia en células epiteliales. La SC se establece en dos etapas en queratinocitos humanos y células epiteliales de mama. Representación esquemática de las curvas de crecimiento *in vitro*. Los rectángulos rellenos representan eventos comunes a los queratinocitos y las células epiteliales mamarias. Los rectángulos rayados representan eventos específicos de un tipo celular. Las líneas discontinuas representan fases no investigadas (Tomado y modificado de Abbadie, 2017)

Gran parte de los diferentes tipos de cáncer que existen relacionados con la vejez en los seres humanos surgen de células epiteliales, conocidos como carcinomas (Burton, 2009). Los carcinomas más frecuentes son el de mama, colon, pulmón y próstata. El origen de esta susceptibilidad de las células epiteliales a transformarse en células cancerosas puede deberse a que son más propensas a desarrollar inestabilidad cromosómica a diferencia de otros tipos celulares (Krtolica y Campisi, 2002).

1.5 Cáncer de próstata (PCa)

La próstata humana adulta es susceptible a enfermedades relacionadas con la edad como la hiperplasia benigna de próstata (BPH) y el cáncer de próstata (PCa). El origen del cáncer de próstata puede ser epitelial o estromal. Entre una multitud de factores ambientales y genéticos que las favorecen, el envejecimiento es el factor de riesgo más importante pero se desconoce hasta este momento la etiología y la patogénesis. Mediante cortes histológicos se ha observado que en la mayoría de los tumores de próstata provenientes de organismos envejecidos existe una gran acumulación de células epiteliales senescentes o fibroblastos senescentes en el estroma (Bhatia *et al.*, 2008) que podrían contribuir al desarrollo y a la progresión del PCa. También se han detectado células epiteliales senescentes positivas a SA- β -gal en BPH, pero el papel de estas células en la etiología del PCa no es claro.

A nivel mundial el cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos; esta patología ocupa el cuarto lugar de todas las enfermedades cancerosas y es el segundo más común entre hombres. Aproximadamente uno de cada siete hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en el transcurso de su vida. Se estima que seis de cada diez casos se diagnostican en hombres de 65 años o más. La edad promedio en la que se diagnostica es de 67 años. El cáncer de próstata es la causa más frecuente de mortalidad por tumores malignos con un 16% de incidencia en México. Los datos más recientes publicados por el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) indican una tasa de mortalidad de 13 defunciones por cada 100,000 hombres (IMSS, 2017). Se ha correlacionado la edad avanzada como factor de riesgo dominante para desarrollar el carcinoma de próstata.

Actualmente existe evidencia de que los fibroblastos senescentes de próstata que residen en el tejido envejecido pueden secretar factores de crecimiento solubles capaces de alterar el microambiente (Bavik, 2006) promoviendo el crecimiento y la progresión tumoral de células epiteliales humanas en la próstata (Lehmann *et al.*, 2008). No obstante, los fibroblastos senescentes que secretan estas moléculas no son las únicas células capaces de modular el microambiente prostático y promover la carcinogénesis, las células epiteliales prostáticas senescentes también podrían comportarse de esta manera (Coppé *et al.*, 2008).

Se ha descrito la participación de la interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) en el desarrollo del cáncer de próstata. La IL-6 actúa estimulando el crecimiento en células benignas y tumorales de próstata. Además se ha observado que los niveles

de IL-6 y sus receptores aumentan durante la carcinogénesis de la próstata (Azevedo *et al.*, 2011). La IL-8 es una citocina proinflamatoria secretada durante el PCa y se vincula con la progresión, también la IL-8 se correlaciona con el potencial metastásico de las células cancerosas (Neveu *et al.*, 2014).

1.6 Fisiología de la próstata

La próstata es una glándula formada por un epitelio glandular incrustado en el estroma fibromuscular (Figura 5 A). El epitelio prostático se compone de dos capas: una luminal y otra basal (Fig 5 B). La capa luminal secretora formada por células columnares altas que producen antígeno específico prostático (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP) y calicreína humana-2 que son secretadas como parte del líquido seminal. Esta capa de células está apuntalada por una capa basal de células epiteliales cuboidales que a su vez está revestida por una membrana basal que consiste en una matriz extracelular que forma una división entre las células basales y el estroma (Long *et al.*, 2005).

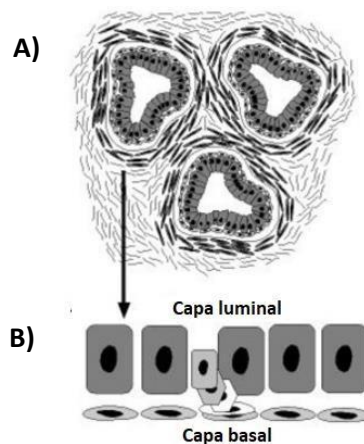


Figura 5. A) Representación de una sección transversal de la próstata que muestra epitelio glandular incrustado en un estroma fibromuscular. B) Representación esquemática de las dos capas epiteliales histológicas distintas, que demuestran la migración de las células de las capas basal a luminal durante la diferenciación.

Se han identificado tres tipos celulares principales en el epitelio prostático, las células basales y luminales así como una población de células neuroendocrinas (NE). Todos los tipos celulares antes mencionados tienen su origen en una célula madre las cuales se someten a un proceso de diferenciación (Figura 6) hasta la obtención de una célula luminal secretora terminalmente diferenciada, el proceso de diferenciación puede ser identificado mediante cambios en la expresión de CK en las diferentes subpoblaciones.

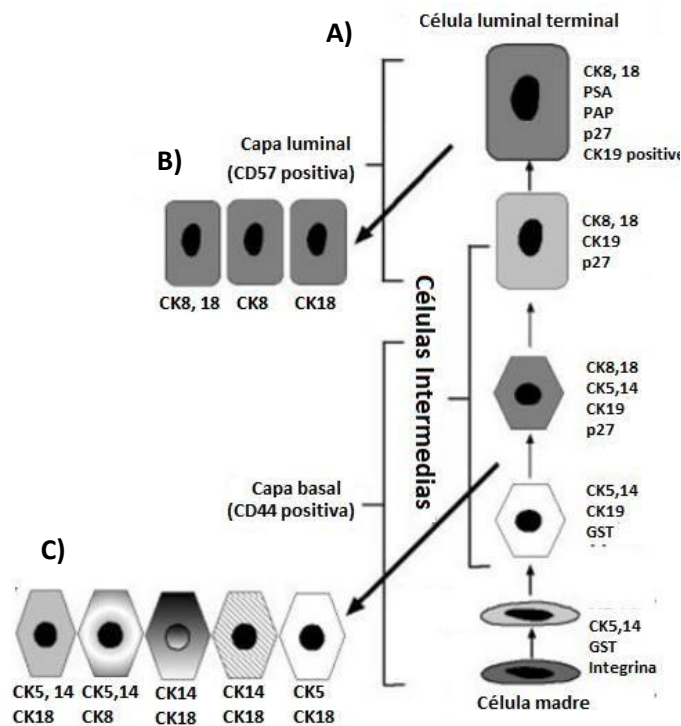


Figura 6. Proceso de diferenciación celular en la próstata A) Evolución de los fenotipos epiteliales desde una célula madre basal hasta una célula luminal secretora terminalmente diferenciada. B) Subpoblaciones de células luminales terminalmente diferenciadas. C) Fenotipos intermedios y su expresión de CK (Tomado y modificado de Long *et al.*, 2005)

1.6.1. Células NE

Las células NE se localizan entre las capas basal y luminal. Se consideran células no proliferativas debido a que están diferenciadas terminalmente, además no expresan el receptor de andrógenos ni el oncogén antiapoptótico Bcl-2. El papel exacto y la función de estas células no están dilucidado por completo, pero se cree que pueden desempeñar un papel en el crecimiento y la diferenciación de la próstata en desarrollo. Las células NE se caracterizan por la expresión de cromogranina A, y otros marcadores como serotonina, bombasina, VIP (péptido intestinal vasoactivo) y calcitonina (Sciarra *et al.*, 2003).

1.6.2 Células basales

La capa basal confiere el compartimento proliferativo de la próstata. Formada por células independientes de andrógenos que expresan citoqueratinas (CK) de elevado peso molecular, CK5 y CK14 y el marcador de superficie celular CD44. Otros marcadores incluyen CK10, 11, 15 y 17, p63 (un homólogo de p53), la integrina $\alpha 2$, la proteína antiapoptótica Bcl-2, P-cadherina, la fosfoproteína nuclear pp32, GST- π (glutación S-transferasa- π), c-MET, el receptor de membrana para HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Long *et al.*, 2005).

1.6.3 Células lumbales

La capa luminal consiste en células que dependen de andrógenos. Expresan CK de bajo peso molecular y se caracterizan por expresar CK8, CK18 y el marcador de superficie celular CD57. El receptor de andrógenos también está presente,

mediando la producción y secreción de PSA y PAP. Las células lumbinales no expresan niveles detectables de Bcl-2 (Long *et al.*, 2005).

1.6.4 Células intermedias

Se ha observado que algunas células en la capa basal expresan marcadores lumbinales, mientras que los marcadores basales se veían en la capa luminal. Estos hallazgos, sugieren de manera importante que el epitelio prostático está formado por poblaciones heterogéneas de células (Xue *et al.*, 1998). Además el estroma prostático es capaz de producir normalmente al menos ocho familias de factores de crecimiento. De estos, se sabe que cinco familias están involucradas en la regulación de la proliferación y diferenciación del epitelio, incluyendo EGF (factor de crecimiento epidermal), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) e IGF (factor de crecimiento similar a la insulina) que estimulan el crecimiento del epitelio (Oliver *et al.*, 2004).

1.7 Estrés oxidante en cáncer de próstata como inductor de senescencia en la próstata

Los procesos asociados con la proliferación, la apoptosis y la senescencia pueden ser el resultado de la activación de las vías de señalización en respuesta a cambios intracelulares en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (EROs). Por lo tanto, la producción excesiva de estas especies, la insuficiencia en el sistema de defensa antioxidante de una célula normal, o ambos, pueden incrementar la posibilidad de llevar a la célula a la muerte por apoptosis, a la implementación de la

senescencia o a tener un daño suficiente para desarrollar patologías como el cáncer (Minelli *et al.*, 2009).

Factores tanto intrínsecos como del entorno celular pueden conducir a una mayor producción de las EROs en la próstata. El aumento de los niveles de EROs puede conducir a una disfunción de la próstata que a su vez genere mayor producción de EROs. Ante esta situación, los sistemas de defensa antioxidante enzimático y no enzimático contrarrestan y regulan los niveles de los radicales para mantener la homeostasis fisiológica.

La reducción del nivel de EROs por debajo del punto homeostático puede interrumpir la proliferación y el sistema de defensa, mientras que la acumulación excesiva de las ERO en la próstata pueden alterar su funcionamiento normal por aumento de daño en las biomoléculas como el ADN nuclear y mitocondrial. Esta situación puede generar una variedad de respuestas fisiológicas en las células como el desarrollo de la respuesta senescente (Khandrika *et al.*, 2009) (Figura 7).

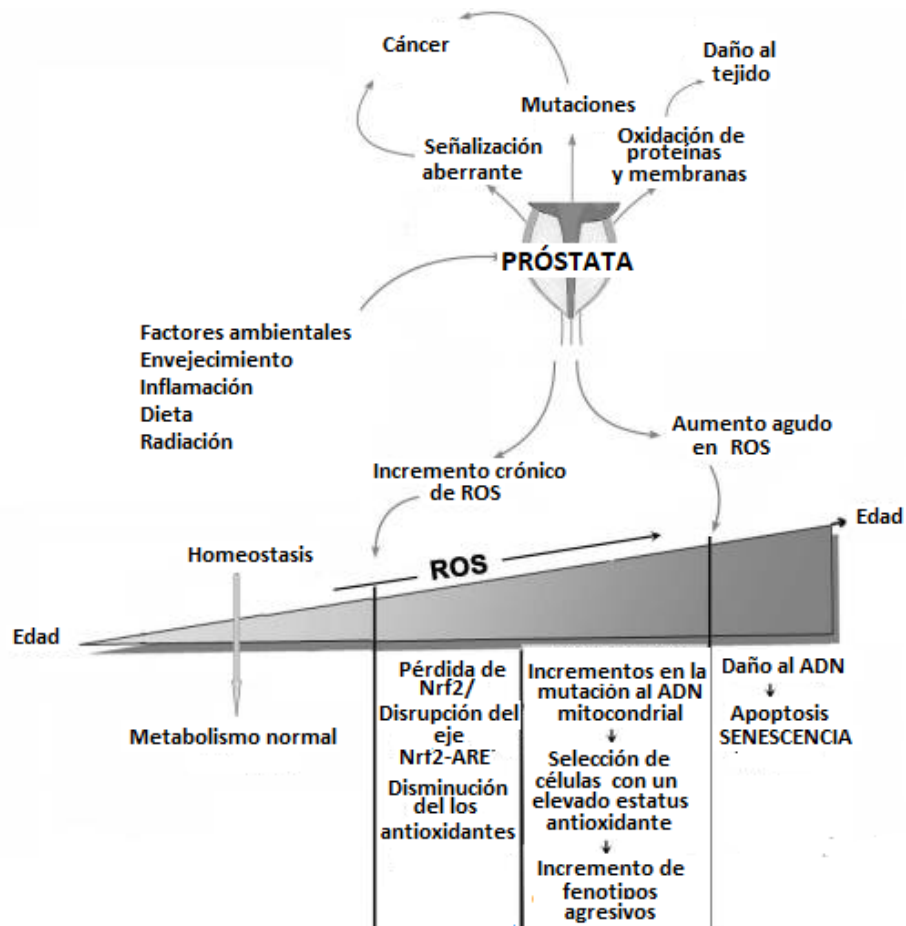


Figura 7. Mecanismos de producción de las ROS y respuesta generada en células de próstata. Se muestra un incremento en la producción y acumulación de las ROS en próstata con la edad, además se indican los factores que intervienen en su producción así como los distintos efectos que este incremento tiene en las células. Tomado y modificado de Khandrika *et al.*, 2009

1.8 Senescencia Prematura Inducida por Estrés (SIPS) como modelo de estudio

Para estudiar los mecanismos moleculares de la senescencia celular, los modelos de cultivo celular son herramientas útiles. En particular el modelo de la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) puede contribuir a la identificación de mecanismos implicados en este proceso. La SIPS se puede definir como el efecto a largo plazo del estrés sub-citotóxico sobre las células proliferativas y algunas postmitóticas, con la aparición de los parámetros característicos de la senescencia

celular (Toussaint *et al.*, 2000; Dumont *et al.*, 2000). El término "prematura" se refiere a la aparición de la senescencia durante las primeras duplicaciones celulares en comparación con el número máximo de duplicaciones celulares que usualmente sucede durante la SR. La SIPS puede inducirse mediante el tratamiento de células primarias (pero también inmortalizadas o transformadas) con una concentración no letal de una multitud de estresores, como el peróxido de hidrógeno que aumentan los niveles de EROs con potencial para generar un daño al ADN (Ott *et al.*, 2018).

2. ANTECEDENTES

En el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular de la UAM-I se han realizado distintos estudios sobre senescencia celular tanto replicativa (SR) como de SIPS. En una de las investigaciones, tras inducir la senescencia prematura por estrés oxidante en fibroblastos primarios de pulmón humano WI-38, los medios condicionados que contenían SASP, se colectaron y se añadieron a cultivos de células epiteliales de adenocarcinoma mamario MCF-7, y posteriormente se observó que la proliferación aumentó significativamente. Tras el análisis del SASP del medio condicionado, se encontró que contenía niveles elevados de las interleucinas IL-8 e IL-6 que promovieron la proliferación celular (Barajas-Gómez *et al.*, 2017).

En 2002, Untergasser y colaboradores observaron que después de varios pasajes de un cultivo de HPEC, aumentó la expresión de marcadores de senescencia como el inhibidor de ciclo celular p16 (Fig. 8) y la actividad enzimática β -gal así como cambios en su morfología mostrando un aspecto aplanado, indicando así el establecimiento de la SR.

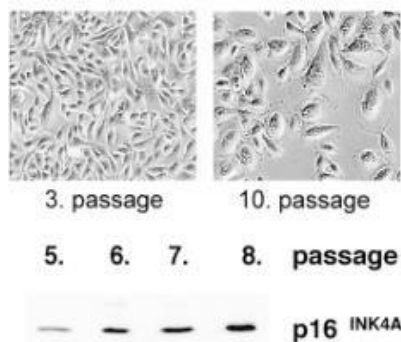


Figura 8. Células epiteliales de próstata después de varios pasajes en cultivo. Muestran un incremento en la expresión del inhibidor de ciclo celular p16, así como cambios en la morfología (Untergasser *et al.*, 2002).

En 2008, Coppé y colaboradores estudiaron la actividad secretora de las células epiteliales de próstata humanas (HPEC) senescentes por irradiación con rayos X. Se analizaron los factores secretados por estas células utilizando matrices de anticuerpos (membranas con anticuerpos dirigidos a diferentes citocinas, basados en el principio de un ensayo de Elisa) y se determinó que las moléculas contenidas del SASP de fibroblastos y células epiteliales senescentes se superponían de manera significativa (Fig. 9).

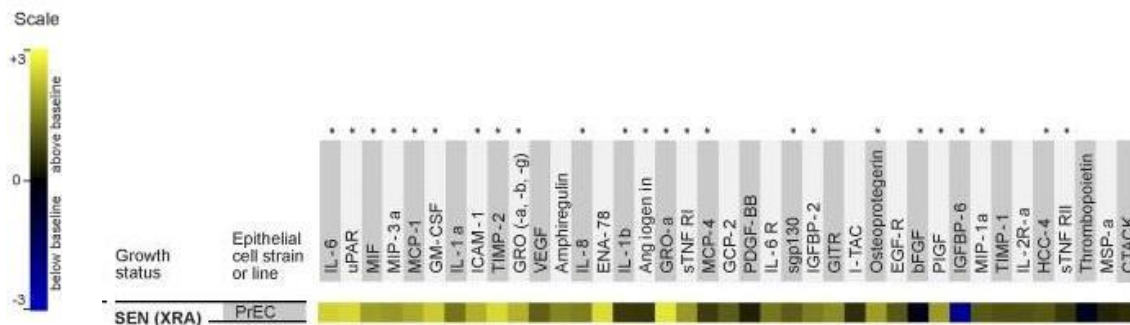


Figura 9. Factores secretados por las células epiteliales de próstata (PrEC) con inducción de senescencia mediante radiación X (XRA). Las señales más altas que la línea de base se muestran en amarillo; Las señales por debajo de la línea de base se muestran en azul. Un asterisco (*) indica los factores en el SASP que se conservan entre los fibroblastos y todas las células epiteliales.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que diversos tipos celulares pueden alcanzar la senescencia celular en respuesta al límite de divisiones o ante el estrés y el daño al ADN. A pesar de que se ha visto que la senescencia celular está relacionada con patologías asociadas al envejecimiento como el cáncer, que en su mayoría son de origen epitelial (GLOBOCAN, 2018; Cancer Research UK, 2018) son pocos los estudios que se han realizado en células epiteliales senescentes, limitando así los conocimientos acerca de su participación en el proceso carcinogénico. De manera particular, se ha visto que el estrés oxidante en enfermedades prostáticas puede inducir una respuesta de senescencia celular generando un SASP que puede alterar y generar procesos inflamatorios y de proliferación del tejido prostático. Sin embargo, a pesar de su relevancia, no existen estudios de los parámetros de senescencia de células epiteliales de próstata por SIPS con H_2O_2 y de los componentes del SASP que aporten información para conocer el posible efecto sobre las células circundantes no senescentes. Por otro lado, durante senescencia en fibroblastos se sabe que existe cese de la proliferación celular aún ante estímulos mitogénicos (Campisi, 2013), sin embargo se desconoce si este fenómeno ocurre también en células epiteliales de próstata durante la senescencia.

Debido a que se ha visto que el factor de estrés oxidante es inherente al desarrollo de patologías y que existe gran acumulación de células senescentes en los tumores de próstata, es importante generar un modelo de senescencia con células epiteliales de próstata humana por SIPS que nos permita conocer los parámetros característicos de la senescencia de este tipo celular, para verificar si tienen un

comportamiento similar con el establecimiento de la senescencia en fibroblastos, así como evaluar los componentes del SASP que pudieran contribuir a la comprensión de las relaciones que se generan entre las células senescentes epiteliales y su microambiente.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será el comportamiento de los parámetros de senescencia y el contenido del SASP de células epiteliales de próstata humana con SIPS?

5. HIPÓTESIS

En patologías prostáticas existe una asociación entre el estrés oxidante y la presencia de células epiteliales senescentes, sin embargo no existen estudios sobre el comportamiento de estas células y se desconoce si presentan los parámetros ya descritos en estudios clásicos con fibroblastos, considerando que son dos tipos celulares diferentes. Un modelo in vitro de células epiteliales de próstata HPEC inducidas a senescencia por H₂O₂ (SIPS) permitirá identificar los marcadores de este estado y el fenotipo secretor característico para comprender las relaciones entre las células senescentes y su microambiente.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los parámetros de la senescencia por SIPS y los componentes del SASP de células epiteliales senescentes de próstata humana.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la concentración de peróxido de hidrógeno que genere un fenotipo senescente.
2. Evaluar la expresión de los parámetros de la senescencia celular.
3. Caracterizar los componentes del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP).
4. Evaluar la respuesta proliferativa ante estímulos mitogénicos de células senescentes.
5. Evaluar el efecto proliferativo del SASP sobre células no senescentes.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cultivos primarios de células epiteliales de próstata

Los experimentos evaluados se realizaron utilizando cultivos primarios de células epiteliales de próstata: Primary Prostate Epithelial Cells; Normal, Human (ATCC® PCS-440-010™). El medio de cultivo utilizado fue Prostate Epithelial Cell Basal Medium (ATCC® PCS-440-030™) suplementado con Prostate Epithelial Cell Growth Kit (ATCC® PCS-440-040™) y 1% de penicilina/estreptomicina.

8.2 Inducción de senescencia prematura por estrés (SIPS)

Se utilizó como modelo de estudio a la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) para simular la senescencia por daño oxidante. Para conocer la concentración adecuada de H₂O₂ para la inducción de SIPS, se realizaron curvas de proliferación celular para evaluar el efecto de diferentes concentraciones en los cultivos primarios. Se sembraron 5x10³ cél/ cm² por pozo en una placa de 24 pozos. Las células se trataron con las siguientes concentraciones de H₂O₂: 12, 25 y 50 μM durante dos horas. El H₂O₂ fue disuelto en el medio de cultivo. Pasadas las dos horas se retiró el medio que contenía H₂O₂ y las células se lavaron con DPBS y finalmente se añadió medio de cultivo sin H₂O₂ (López-Díazguerrero et al., 2006).

8.3 Parámetros de senescencia celular

Los siguientes parámetros de senescencia se evaluaron en los días 1, 4, 8 y 12 después de la inducción de senescencia con H₂O₂.

8.3.1 Proliferación celular

La proliferación celular se determinó contando células viables mediante la técnica de exclusión por azul de tripano. El conteo celular se realizó tomando una alícuota de 20 μL de células resuspendidas en medio de cultivo que se mezcló con 20 μL del colorante azul de tripano. La mezcla fue resuspendida nuevamente y se tomó una alícuota de 10 μL, la cual se colocó en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio de contraste de fases para contar el número de células viables. Se contaron 4 cuadrantes y se calculó la media \bar{x} .

El número total de células se calculó mediante la ecuación:

$$N = (\bar{x}) (V) * (2) * (10^4)$$

Dónde: N = Número total de células.

V = Volumen total de la suspensión de células (mL).

8.3.2 Ensayo SA- β -Galactosidasa

Para evaluar la senescencia celular, se utilizó la determinación cuantitativa de la presencia de la enzima β -galactosidasa que es un marcador que se encuentra sobreexpresada en células senescentes.

A cada pozo de una placa de 24 pozos, se le agregaron 300 μ L de solución fijadora (formaldehído al 3%) durante 15 min. y posteriormente se retiró la solución y se realizaron 3 lavados con DPBS. Se agregaron 300 μ L de solución X-gal que contenía 100 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 100 mM de $K_3Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O$, 1 M $MgCl_2$, 5 M de NaCl, buffer de $C_6H_8O_7 / Na_2HPO_4$ 0.2M y 50 mg/mL de X-gal. El pH se ajustó a 6. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se eligieron 3 campos de manera aleatoria y se contaron 100 células en cada uno utilizando un microscopio de contraste de fases. El total de células teñidas y no teñidas correspondieron al 100%.

8.4 Expresión de marcadores del establecimiento de la senescencia

Utilizando inmunocitoquímicas se evaluó la expresión de proteínas implicadas en el establecimiento de la senescencia (p53, p21, p16 y β -galactosidasa).

Las células se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 5×10^3 cél/ cm^2 y se les realizó SIPS. Las células se lavaron con DPBS, se fijaron con formaldehído al

3% durante 15 min., y después se lavaron nuevamente con DPBS- Tween y se les agregaron 100 μ l del bloqueador universal de proteínas en solución 1:10 durante 15 min. Posteriormente las células se lavaron con DPBS-tween, se les añadieron 100 μ L del anticuerpo anti-p16-conejo en dilución 1:100 y se incubaron durante 1 hora. Pasada la hora, las células se lavaron en 2 ocasiones con DPBS-Tween y se repitieron los pasos anteriores para los anticuerpos anti-p21-ratón en dilución 1:200, anti-p53-ratón en dilución 1:200 y anti-GLB-conejo en dilución 1:200. Después se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos, para lo cual se retiró el anticuerpo primario. Para el caso del anticuerpo secundario *Alexa Fluor® 594* anti-ratón, primero se lavaron las células 2 veces con DPBS-Tween, y se añadió 100 μ l a una dilución de 1:500 del anticuerpo secundario y se incubó durante 1 hora, pasado ese tiempo se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron 3 lavados con DPBS-Tween. Para el caso del anticuerpo secundario *Alexa Fluor® 488* anti-conejo, se hizo una dilución 1:500 y se siguieron los pasos descritos anteriormente. Posteriormente a las muestras se añadió solución de montaje con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) y se les colocó un portaobjetos. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss modelo LSM 780 NLO. Las preparaciones se realizaron en los días 4 y 9 después de SIPS.

8.5 Análisis del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP)

Para el análisis del SASP, las células se sembraron 5×10^3 cél/ cm^2 en cajas petri para cultivo celular de 35×10 mm. Las determinaciones se realizaron el día 4 para el control y para SIPS los días 4 y 9 después de la inducción. Cuando las células

llegaron al día de la determinación, el medio condicionado se colectó en tubos de 15 mL y se guardó a -80°C para su análisis posterior. Las células se despegaron con Tripsina-EDTA para células primarias (ATCC® PCS-999-003™) y se contaron como se describió previamente, para la normalización de los datos de SASP.

Para realizar las determinaciones, se descongelaron los medios condicionados y se concentraron 7 veces para llegar a un volumen final de 1 mL, el cual fue analizado siguiendo el protocolo del kit comercial *RayBio® Human Cytokine Antibody Array*, de la siguiente manera: las membranas contenidas en el kit se bloquearon con buffer de bloqueo (proveniente del kit) durante media hora; posteriormente, se incubaron con 1 mL de muestra y se agitaron por 2 h. Pasado ese tiempo, la muestra fue removida y se realizaron cinco lavados con los buffers de lavado contenidos en el kit. Después se incubó por 2 h con 1 mL del *cocktail* de anticuerpos conjugados con biotina contenidos en el kit. Posteriormente se realizaron otros 5 lavados para remover los anticuerpos que no se unieron y se incubó por 2 h más con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (*HRP-streptavidin*) y se realizaron otros 5 lavados. Para llevar a cabo la detección de la señal, se añadió 1 mL del buffer de detección incluido en el kit durante 2 min y las membranas se revelaron usando el fotodocumentador Gel logic 1500 (Kodak, EUA). Para realizar el análisis de las citocinas presentes, se utilizó el software FIJI. Los datos se normalizaron empleando el número de células, para poder realizar comparaciones entre los grupos

8.6 Respuesta a estímulos mitogénicos

Primero se realizó una curva de proliferación celular para evaluar el efecto del EGF a distintas concentraciones, ya que se ha reportado previamente que este factor tiene marcados efectos mitogénicos en HPEC (El Sheikh et al., 2004).

Para lo cual el EGF se disolvió en albumina al 0.5% y se agregó al medio de cultivo para obtener las distintas concentraciones. Luego en placas de 48 pozos se sembró una densidad 3×10^3 cél/cm² y se añadieron 500 µl de medio con las distintas concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 ng/mL del factor y se realizó el conteo celular descrito previamente a las 24, 48 y 72 horas para determinar el efecto.

En los cultivos de células se expusieron a tratamientos agudos (una exposición al mitógeno durante 72 horas) del EGF.

Posteriormente se eligió la concentración de 1000 ng/mL debido a que dicha concentración mostro el mayor efecto en la proliferación como resultado del experimento anterior y se añadió a cultivos en proliferación y a cultivos senescentes.

En placas de 24 pozos se sembró una densidad de 3×10^3 cél/ cm². A los grupos correspondientes se les realizó la inducción de senescencia por SIPS como se describe previamente, y en el día 9 cuando la senescencia se añadió a los grupos correspondientes el EGF a una concentración de 1000 ng/mL disuelto en medio y se cuantificó la proliferación mediante la técnica de exclusión por azul de tripano como se describió en párrafos anteriores.

Para evaluar si la proliferación en cultivos celulares estaba dada o no por células senescentes se realizó una inmunocitoquímica con un doble marcaje con anticuerpos dirigidos a Ki-67 y GLB. Utilizando inmunocitoquímicas se evaluó la

expresión de proteínas implicadas en el establecimiento de la senescencia (p53, p21, p16 y β -galactosidasa).

Las células se sembraron en cubreobjetos a una densidad de 5×10^3 cél/ cm^2 y se les dio el tratamiento correspondiente. Posteriormente se lavaron con DPBS y fijaron con formaldehído al 3% durante 15 min. y después se lavaron nuevamente con DPBS- tween y se agregó 100 μl del bloqueador de proteínas en solución 1:10 por 15 min. Posteriormente las células se lavaron con DPBS-tween y se añadieron 100 μL del anticuerpo anti-Ki-67-conejo en dilución 1:200 y se incubaron durante 1 h. Pasada la hora, las células se lavaron en 2 ocasiones con DPBS-tween y se repitieron los pasos anteriores para anti-GLB-conejo en dilución 1:200, después se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos, para lo cual se retiró el anticuerpo primario y se lavó 2 veces con DPBS-tween y se añadieron 100 μl de *Alexa Fluor*® 594 anti-ratón en dilución 1:500 y se incubó durante 1 hora. Pasado ese tiempo, se retiró el anticuerpo secundario y se hicieron 3 lavados con DPBS-tween. Se colocó *Alexa Fluor*® 488 anti-conejo en dilución 1:500 siguiendo los pasos anteriores. Se añadió solución de montaje con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol). Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Carl Zeiss modelo LSM 780 NLO.

8.7 Efecto del SASP en la proliferación de células no senescentes

Para determinar el efecto en la proliferación dado por el SASP, se recolectó el medio de cultivo proveniente de HPEC senescentes del día 9. Las células se despegaron con tripsina -EDTA para células primarias (ATCC® PCS-999-003™) y

se contaron como se describió previamente, para saber de cuantas células provenía el SASP. Posteriormente en placas de 24 pozos se sembró una densidad de 15×10^3 cél/cm² y se les añadió el SASP y medio fresco en proporción 1:1 y se evaluó la proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas.

8.8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Cada experimento se realizó por triplicado en al menos tres eventos independientes. Para evaluar normalidad de los datos se utilizaron las pruebas de D'Agostino & Pearson y Shapiro-Wilk. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó por análisis de varianza (ANOVA- dos vías) seguida por la prueba de Tukey. En ambos casos se manejó un nivel de probabilidad de $p < 0.0001$, $p < 0.01$ y $p < 0.05$ como criterio mínimo de significancia. Se utilizó el programa estadístico Graph Pad Prism 7.0.

9. RESULTADOS

9.1 Proliferación celular después de SIPS

Para determinar la concentración de H_2O_2 que indujera senescencia por SIPS, se realizó una curva de proliferación probando distintas concentraciones de H_2O_2 . El efecto de los tratamientos sobre la proliferación se evaluó mediante conteo celular por exclusión de azul de tripano. Los resultados obtenidos muestran que las células control continúan proliferando hasta el día 12, el último día en que se realizaron las determinaciones.

En cada caso, las células tratadas con 12, 25 y 50 μM de H_2O_2 mostraron cambios estadísticamente significativos ($P < 0.0001$) en la proliferación a partir del día 4 y hasta el día 12 ($P < 0.0001$). Las diferencias en la proliferación entre las distintas concentraciones de H_2O_2 se muestran en la Figura 10. A partir del día 4, la concentración de 12 μM de H_2O_2 es la que presentó la menor proliferación respecto al control y al resto de las distintas concentraciones ($P < 0.0001$); seguida de la concentración de 25 μM que mostro una proliferación mayor a la de 12 μM pero menor a la de 50 μM ($P < 0.0001$).

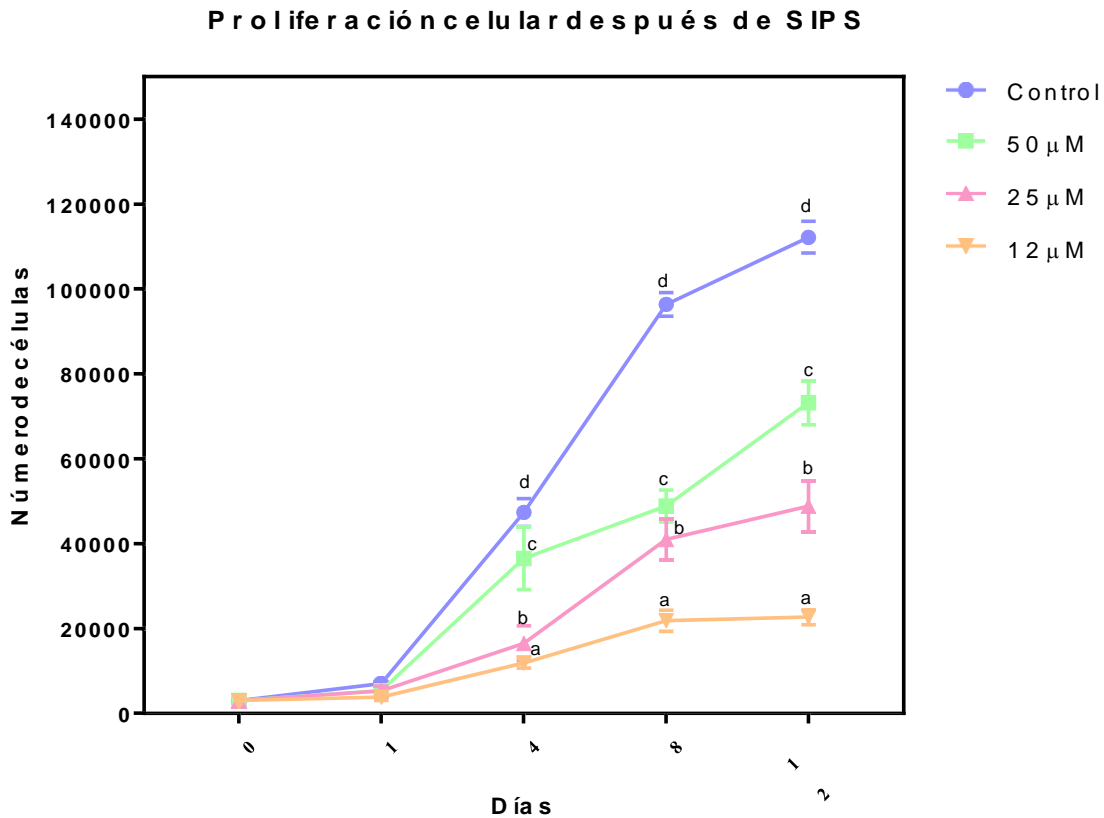


Figura 10. Curva de proliferación por conteo mediante exclusión por azul de tripano después de la adición de distintas concentraciones de H_2O_2 para la inducción de SIPS. La gráfica muestra el resultado de tres experimentos independientes. Cada valor corresponde a la media \pm DE. Anova-2 vías con prueba *post hoc* de Tukey. Las literales diferentes representan diferencias significativas entre las distintas concentraciones de H_2O_2 ($p < 0.0001$).

9.2 Actividad de la enzima β -galactosidasa

Con la finalidad de confirmar que la inhibición de la proliferación estaba asociada con el fenómeno de senescencia, se evaluó la actividad de la enzima β -galactosidasa lisosómica que normalmente esta sobreexpresada en la SC.

El tratamiento del cultivo con una concentración de 12 μ M de H_2O_2 mostró un mayor ($P < 0.0001$) porcentaje de células positivas al ensayo de la actividad de la enzima

β -galactosidasa con respecto al control y al resto de las concentraciones aplicadas ($P < 0.0001$) desde el día 1 y hasta el día 12 (Fig.11).

Además se observaron cambios en la morfología de las HPEC característicos de la senescencia hacia una forma planada y agrandada (Fig. 12 B) con el tratamiento de $12 \mu\text{M}$ de H_2O_2 .

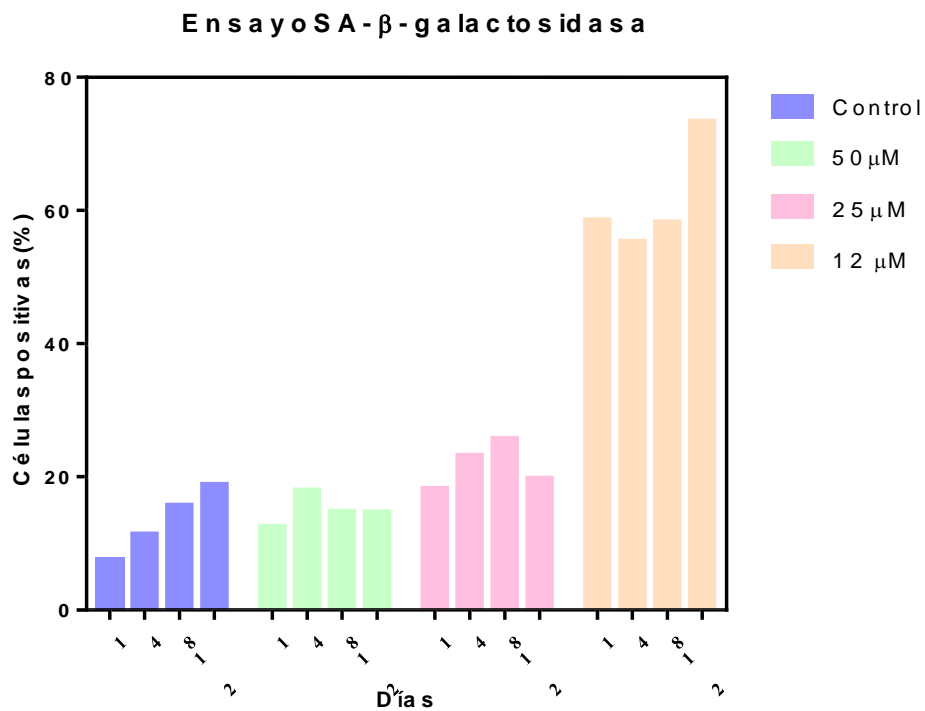


Figura 11. Porcentaje de células senescentes en función del tiempo para los 3 tratamientos analizados en las HPEC. ANOVA-2 vías. Diferencias significativas ($P < 0.0001$).

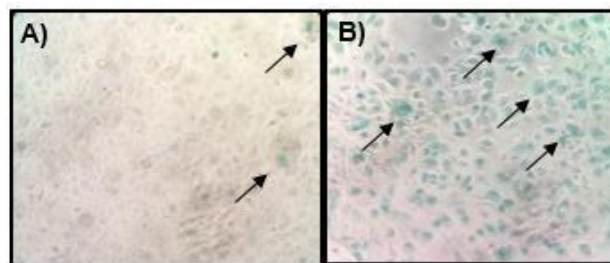


Figura 12. Ensayo SA- β -gal. A) HPEC control en día 4. B) HPEC 4 días después de SIPS con $12 \mu\text{M}$ de H_2O_2 . Las flechas indican a las HPEC positivas al ensayo. Microscopía óptica 100 X.

9.3 Evaluación de parámetros de senescencia

Para validar el establecimiento de la SC por la adición de 12 μM H_2O_2 a los cultivos de HPEC se evaluó la expresión de los inhibidores del ciclo celular p16 y p21 así como p53 y la enzima β -galactosidasa.

Mediante inmunocitoquímicas se consideró estudiar estos parámetros el día 4 (una etapa temprana después del establecimiento de la SC) y el 9 (una etapa tardía después del establecimiento de la SC) para determinar si existía una diferencia en la expresión de los marcadores del estado senescente.

Las imágenes que se obtuvieron mediante microscopia confocal muestran un aumento en la expresión de β -galactosidasa en el grupo tratado con 12 μM de H_2O_2 (Fig.13 A) siendo más evidente este incremento al día 9 después de SIPS. Además, se observa claramente la localización nuclear de p16 (Fig 13 B).

También se observaron cambios en la expresión y localización de p21 el cual muestra una ubicación en el núcleo en las células en el día 4 y 9 después de SIPS (Fig. 13 B). La expresión de p53 también muestra un incremento en su expresión en el día 4 después de SIPS:

Se consideraron células senescentes cuando éstas fueron positivas a los marcadores: p16 y β -galactosidasa en el citosol y con incrementos en la expresión de p53 y p21 nuclear.

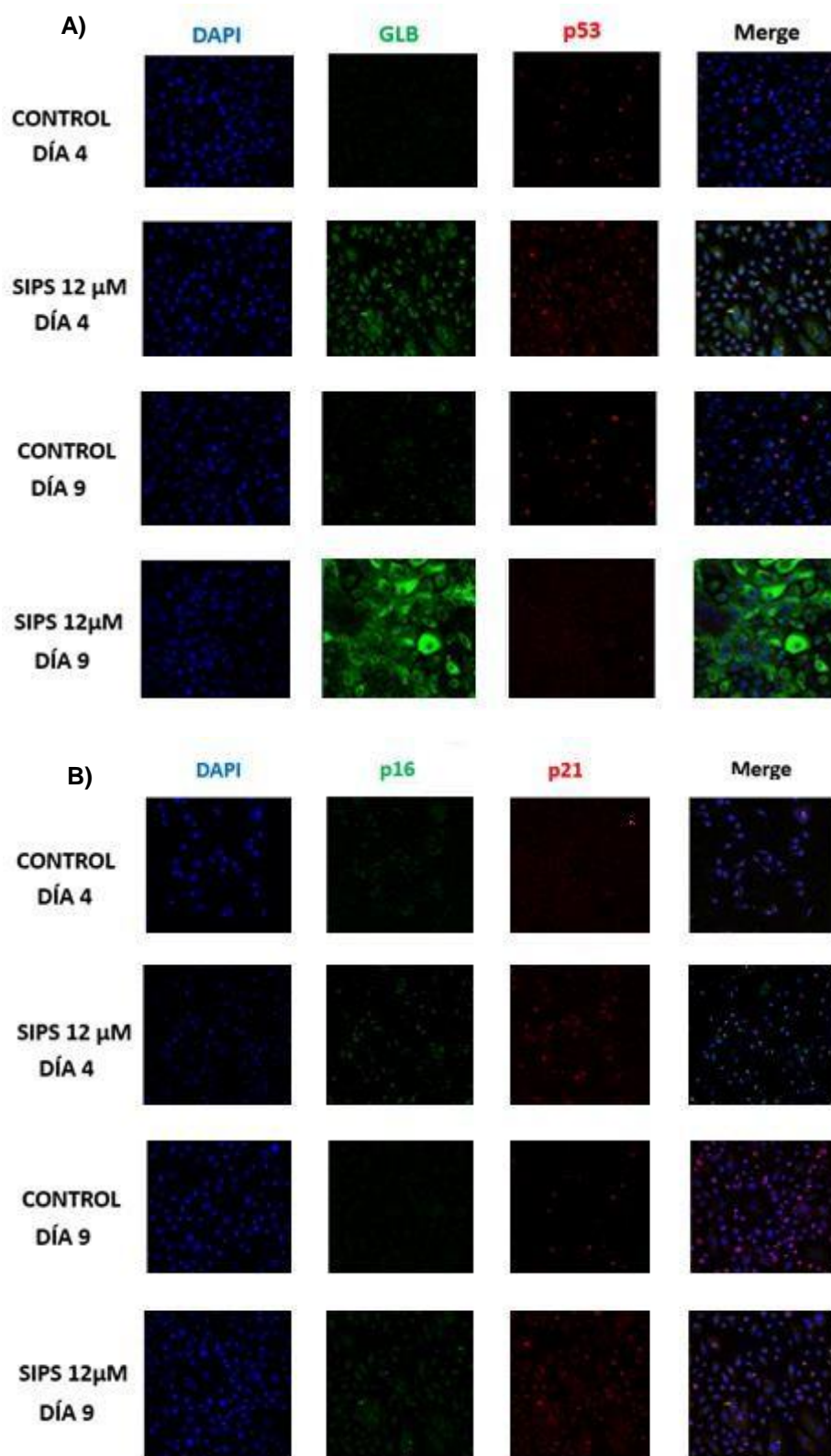


Figura 13. Inmunocitoquímicas de los cultivos primarios de células epiteliales de próstata para los GR de senescencia p16, p21, p53 y β -galactosidasa (GLB). Los núcleos fueron marcados con DAPI. Se muestran imágenes representativas de cada experimento (100x).

9.4 Análisis del SASP

Se analizó el SASP proveniente de una etapa temprana (día 4) en el establecimiento de la senescencia y se comparó con el SASP proveniente de una etapa tardía (día 9) en la cual la senescencia ya estaba completamente establecida (evidenciado por un incremento en el porcentaje de células positivas al ensayo SA- β -galactosidasa así como un aumento en la expresión de marcadores del estado senescente (Fig. 9 y 10). Se empleó el kit *RayBio® Human CytokineAntibodyArray* para analizar 80 citocinas provenientes del SASP de los medios condicionados de SIPS como se describió anteriormente y el ensayo se realizó por duplicado.

La Tabla 2 muestra el arreglo de las membranas de detección de citocinas indicando la ubicación de cada una de ellas. La Figura 14 corresponde a tres membranas representativas del análisis del SASP. En estas imágenes cada marca corresponde a la secreción de una citocina en particular.

Al analizar las membranas se observaron diferencias entre los patrones de secreción de los distintos días en los cuales se colectó el SASP, en donde se puede apreciar que algunas de las citocinas contenidas en el SASP de día 4 no son las mismas secretadas por las células senescentes de una etapa más tardía (SASP de día 9), además de existir diferencias en cuanto a la intensidad en la expresión de citocinas específicas.

El mapa de calor en la Figura 15 muestra el perfil de expresión de las citocinas contenidas en el SASP. De las 80 citocinas que el kit detecta, se encontraron expresadas un total de 38 citocinas. Para cuantificar la secreción de las citocinas de manera individual, se analizó la densidad óptica relativa (D.O.R.) de cada mancha

utilizando el software FIJI, normalizando contra el control positivo de cada membrana y el número de células de las cuales provenía el SASP. Se creó una línea base obteniendo un promedio en la expresión de las citocinas en el control, el SASP de día 4 y 9. Las señales más altas que la línea de base se muestran en verde, las señales por debajo de la línea de base se muestran en rojo.

Las citoquinas que mostraron un incremento en sus niveles de expresión fueron el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), las interleucinas IL-6 e IL-8, las quimiocinas GRO $\alpha/\beta/\gamma$ (CXCL1/CXCL2/CXCL3) en el SASP proveniente del día 4 con respecto al control. Posteriormente al día 9 estas moléculas modificaron su secreción disminuyendo su expresión.

El análisis de correlaciones múltiples contenido en la Tabla 3 cuantifica el grado de asociación en el contenido de citocinas del SASP de día 4 y de día 9 y las citocinas del control, cuanto más cercano es el valor de r a 1, el grado de asociación es mayor. Al comparar el SASP de día 4 con el control se encontró que el perfil de secreción es distinto, lo cual es corroborado por un valor de $r=-0.94$. Por el contrario el perfil de secreción SASP proveniente del día 9 comparado con el control es muy similar con una $r=0.78$.

Debido a que los componentes del SASP presentan variaciones en tipo y en la expresión de citocinas, estos datos sugieren la existencia de una expresión diferencial de los componentes del SASP dependiente del tiempo durante la senescencia.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g	GRO alpha (CXCL1)
2	I-309 (CCL1)	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN-gamma	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 beta (CCL4)
4	MIP-1 delta (CCL15)	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	TGF beta 1	TNFalpha	TNF beta (TNFSF1B)	EGF	IGF-1	Angiogenin
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC (CXCL13)	Ck beta8-1 (CCL23)	Eotaxin-1 (CCL11)	Eotaxin-2 (CCL24)	Eotaxin-3 (CCL26)
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7 (KGF)	FGF-9	FLT-3 Ligand	Fractalkine (CX3CL1)	GCP-2 (CXCL6)	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10 (CXCL10)	LIF	LIGHT (TNFSF14)	MCP-4 (CCL13)	MIF	MIP-3 alpha (CCL20)	NAP-2 (CXCL7)	NT-3
8	NT-4	OPN (SPP1)	OPG (TNFRSF11B)	PARC	PLGF	TGF beta2	TGF beta3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS

Tabla 2. Mapa del arreglo de citocinas de kit de detección. Cada cuadro representa un punto en la membrana de detección para una citocina diferente.

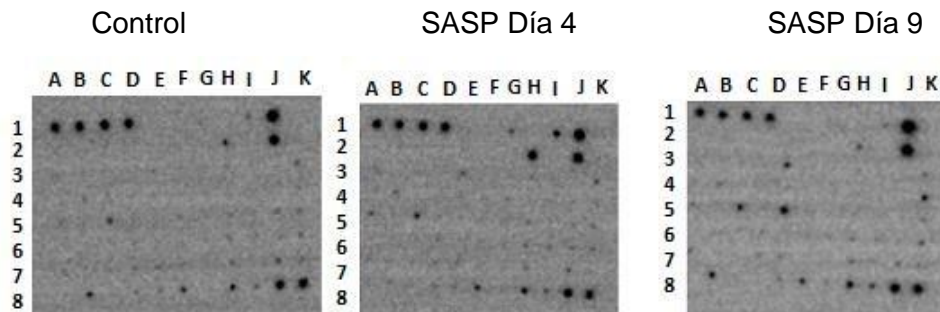


Figura 14. Análisis del SASP proveniente de distintos días después la inducción de SIPS. Se muestran membranas representativas del análisis de 80 citocinas, cada marca corresponde a una citocina específica

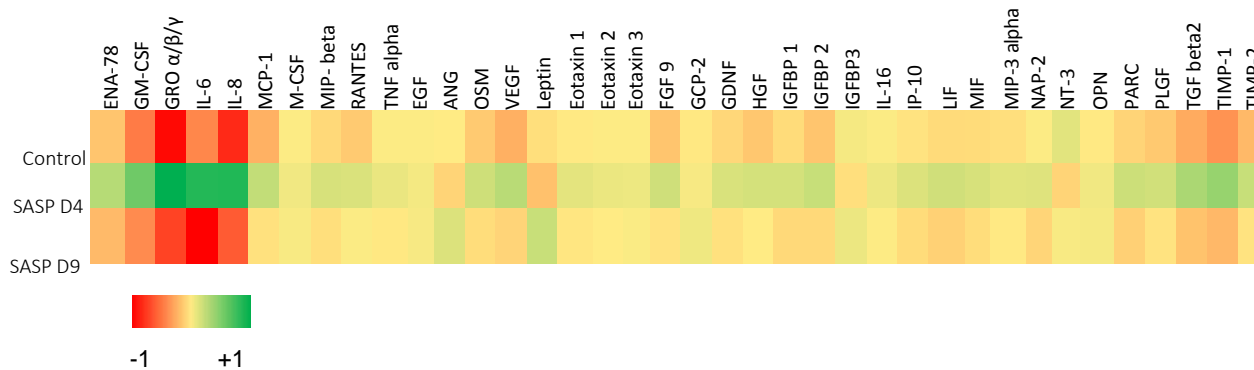


Figura 15. Citocinas provenientes del SASP colectado en día 4 y 9. Se colectó el medio condicionado (MC) y fue sometido a un inmunoensayo. La imagen muestra mediante un *heat map* la secreción semicuantitativa de las HPEC en distintos días posteriores a la inducción de SIPS (SASP D4- SASP de día 4 y SASP D9- SASP de día 9). Se muestran la densidad óptica relativa (D.O.R.) de cada muestra normalizada con el grupo control.

	Control	S4	S9
Control	1		
S4	-0.94099651	1	
S9	0.78975216	-0.95074738	1

Tabla 3. Matriz de correlación del perfil de secreción de células no senescentes y el SASP proveniente de día 4 y 9.

9.5 Evaluación de la respuesta proliferativa ante estímulos mitogénicos de células senescentes

Posteriormente para determinar si las HPEC senescentes a diferencia de los fibroblastos senescentes, podrían responder ante un estímulo mitogénico, se realizó la adición del factor de crecimiento epidermal (EGF) el cual ha mostrado ser un inductor en la proliferación de distintas líneas celulares de próstata (El Sheikh *et al.*, 2004). Inicialmente se realizó una curva de proliferación para determinar la concentración del EGF que pudiera inducir la mayor proliferación se trató con distintas concentraciones del EGF 1, 10, 100 y 1000 ng/mL a los cultivos de HPEC, se realizó el conteo mediante la técnica por exclusión de azul tripano a las 24, 48 y 72 h posteriores a la adición del EGF (Figura 16).

Se observaron cambios significativos en la proliferación con el tratamiento de 100 y 1000 ng/mL de EGF con respecto al control ($P < 0.0001$) desde las 24 h y hasta las 72 h. Mientras que a las concentraciones de 1 y 10 ng/mL se observó un aumento de proliferación significativo ($P < 0.0001$) a partir de las 24 horas y hasta las 48 horas con respecto al control, a las 72 horas la proliferación se igualó al control. Por lo cual el mayor efecto en la proliferación fue dado por la adición de 1000 ng/mL de EGF.

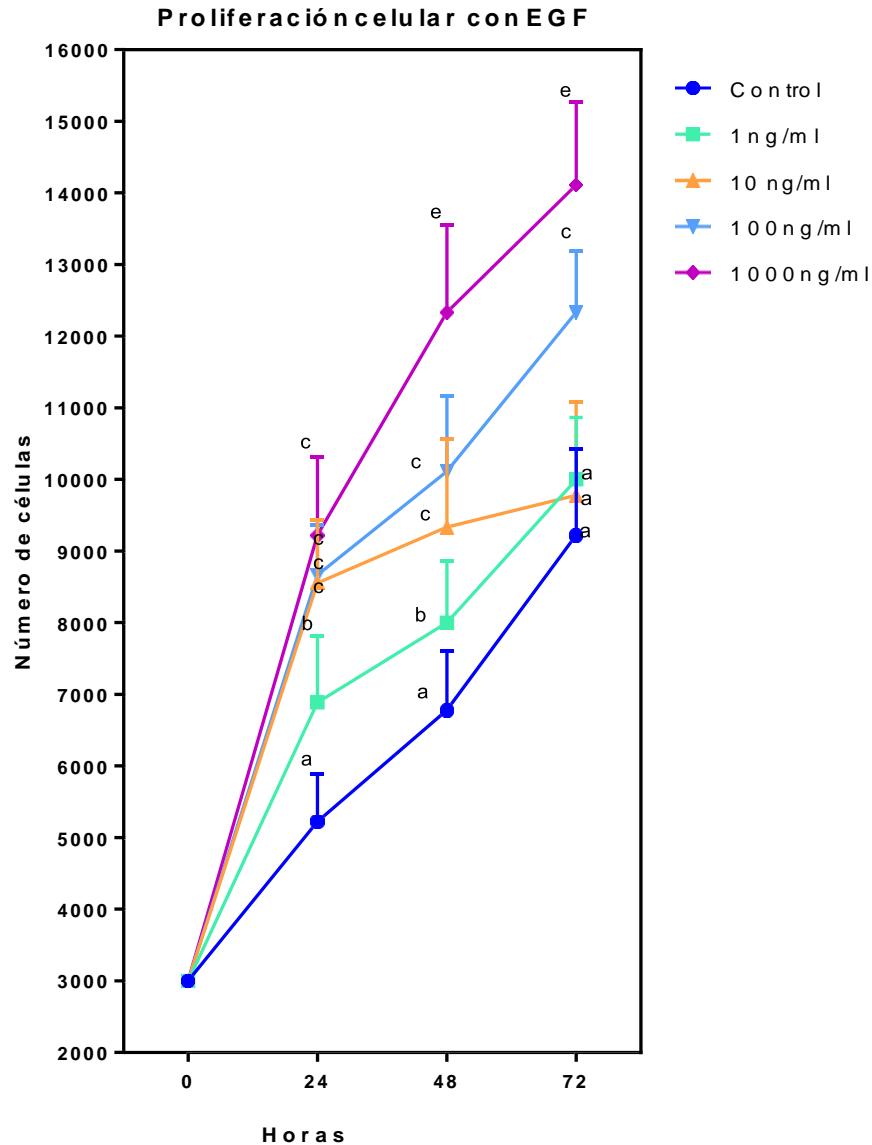


Figura 16. Curva de proliferación por conteo mediante exclusión por azul de tripano después de la adición de distintas concentraciones de EGF. La gráfica muestra el resultado de tres experimentos independientes. Cada valor corresponde a la media \pm DE. Anova-2 vías ($P < 0.0001$) con prueba *post hoc* de Tukey; literales diferentes representan diferencias significativas ($P < 0.01$).

Una vez determinada la concentración de EGF, se añadió a cultivos de HEPC senescentes al día 9 posterior a SIPS, y se determinó la proliferación celular a las 24, 48 y 72 horas (Figura 17).

La proliferación celular al añadir EGF al cultivo senescente (SIPS+EGF) mostró una proliferación menor con respecto al control ($P < 0.0001$) y no mostró cambios significativos en la proliferación con respecto al cultivo senescente (SIPS) en el día 10 (es decir a las 24 h de haber añadido el EGF). De igual manera, en el día 11 (48 ho posteriores a la adición del EGF) el cultivo SIPS+EGF mostró una proliferación menor con respecto al control ($P < 0.0001$) y no mostró cambios significativos en la proliferación con respecto al cultivo senescente (SIPS). Finalmente, en el día 12 (72 horas de estar en contacto con el EGF), el cultivo SIPS+EGF tuvo una proliferación menor con respecto al control ($P < 0.0001$), pero significativamente mayor al cultivo SIPS.

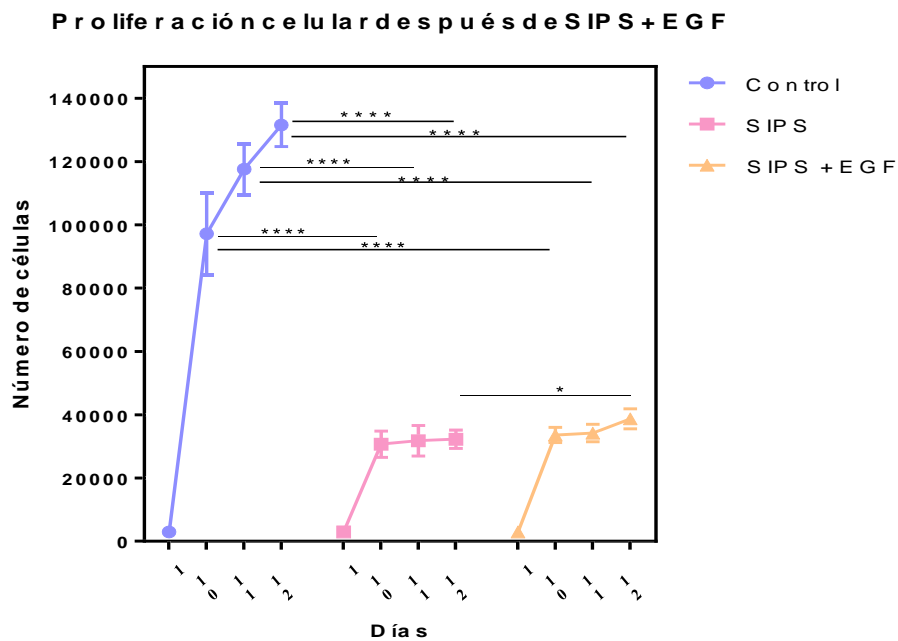


Figura 17. Curva de proliferación por conteo mediante exclusión por azul de tripano después de la adición de 1000 ng/mL de EGF al cultivo senescente. La gráfica muestra el resultado de tres experimentos independientes. Cada valor corresponde a la media \pm DE. Se realizó un Anova-2 vías con prueba *post hoc* de Tukey. Los asteriscos **** representan diferencias significativas ($P < 0.0001$) y * ($P < 0.05$)

Para determinar que los cambios significativos en la proliferación observados en el cultivo senescente al añadir EGF (SIPS+EGF) provenían de células senescentes que respondieron a estímulos mitogénicos o si se trataba de células que no establecieron la senescencia y que estas pudieran ser las responsables en las diferencias observadas en la proliferación, se realizó un inmunocitoquímica con un doble marcaje, usando Ki-67 para indicar que la célula estaba en división (Sun y Kaufman, 2018), y a β -gal (GLB) como indicador del el estado senescente (Figura 18).

Se observó que las células que expresaron β -gal no expresaron Ki-67 (Fig. 18), lo cual indica que las diferencias en la proliferación celular obtenidas en el experimento anterior estaban dadas por la proliferación de células que no establecieron la senescencia.

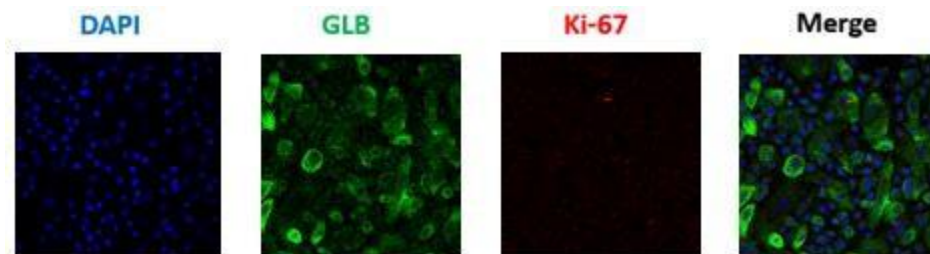


Figura 18. Inmunocitoquímicas de los cultivos primarios de células epiteliales de próstata senescentes tratadas durante 72 horas con EGF. Marcador de senescencia β -galactosidasa (GLB) y de proliferación Ki-67. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Se muestran imágenes representativas del experimento (100x).

Finalmente se evaluó el efecto del SASP en la proliferación celular, para lo cual se añadió el SASP de día 9 a cultivos de HPEC no senescentes y se evaluó la proliferación.

Como se muestra en la Figura 19 hubo una disminución en la proliferación celular a las 72 horas después de añadir el SASP (P <0.0001)

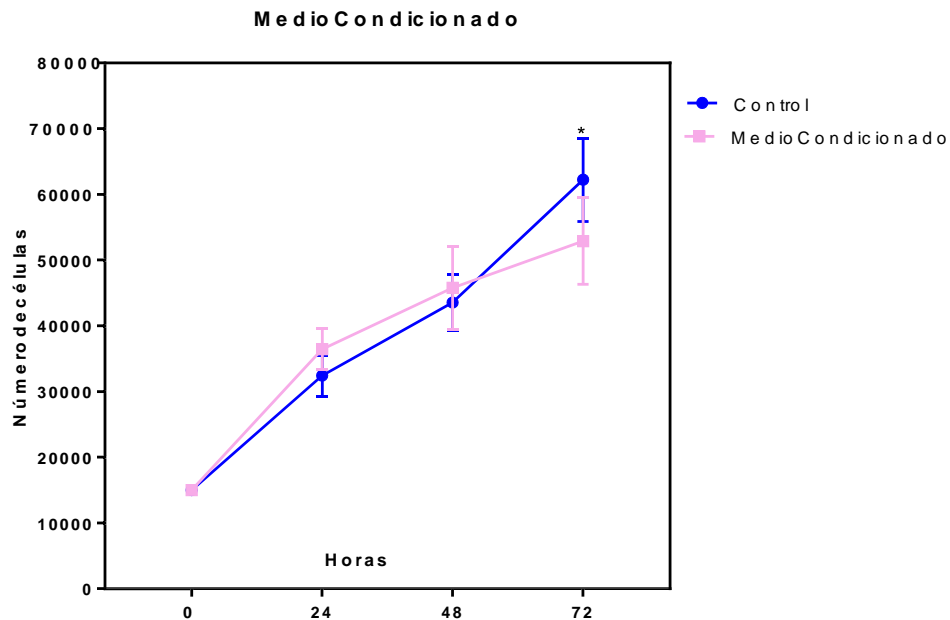


Figura 19. Curva de proliferación por conteo mediante exclusión por azul de tripano después de la adición del SASP de día 9 proveniente de cultivos de HPEC senescentes en proporción 1:1. La gráfica muestra el resultado de tres experimentos independientes. Cada valor corresponde a la media \pm DE. Se realizó Anova-2 vías con prueba *post hoc* de Tukey. Los asteriscos representan diferencias significativas (P <0.0001)

10. DISCUSIÓN

La senescencia celular es un fenómeno que se caracteriza principalmente por una detención en la proliferación y el desarrollo de un secretoma denominado SASP. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en fibroblastos y poco se ha estudiado en otros tipos celulares como las células epiteliales, donde se desconoce si este fenómeno de la senescencia se establece de la misma manera y con los mismos parámetros.

Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron las características del fenotipo senescente en HPEC a las que se les indujo SIPS mediante e tratamiento con H_2O_2 . Se observó que con una concentración de 12 μM de H_2O_2 se logró el establecimiento de la SC, sin embargo resulta ser una concentración baja comparada con 75 μM de H_2O_2 que se requiere para el establecimiento de la SC en fibroblastos (Maciel-Barón *et al.*, 2016). También se observaron cambios morfológicos característicos del estado senescente como el aspecto aplanado y agrandado después del tratamiento con H_2O_2 (Kong *et al.*, 2011). Esta concentración tan baja como inductor de la SC es probablemente debida a que son distintos tipos celulares con diferentes susceptibilidades y resistencia al estrés (Udensi y Tchounwou, 2016). Vital *et al.*, 2014).

Al utilizar las concentraciones de 25 y 50 μM se observó una disminución en la proliferación con respecto al control, pero un aumento con respecto a las células expuestas a 12 μM . Las concentraciones de 25 y 50 μM posiblemente pudieron inducir la proliferación pues se ha reportado que varias vías de transducción de señales en células de mamíferos están activadas por H_2O_2 , como las tirosin-

quinasas, las proteínas cinasas activadas por mitógenos, la proteína cinasa C, el receptor del factor de crecimiento epidérmico, proteínas fosfatasas, canales de potasio y el factor nuclear κ B (NF κ B) (Polytarchou *et al.*, 2005). Aunado a esto resultados previos aún no publicados por Aquino-Cruz y cols. en 2018, muestran también que las células epiteliales de mama MCF10A alcanzan la senescencia por SIPS con la misma concentración de H₂O₂.

Cuando se evaluó la expresión de marcadores del estado senescente como p53, p21, p16 y β -gal encontramos que su expresión fue similar a la de los fibroblastos senescentes. Específicamente se observó un incremento de p 16 en el núcleo, sitio en el que p16 ejerce su actividad de inhibición de los complejos CDK4/6–Ciclina D, y conducen a la detención del ciclo celular en G1 (Rayess *et al.*, 2012) manteniendo a la pRb en un estado hipofosforilado que resulta en la inhibición del factor de transcripción E2F. También se observaron cambios en la expresión y localización de p21, localizado en el núcleo tras la inducción de SIPS. El inhibidor p21 de CDK2, CDK3, CDK4 y CDK6, cuya sobreexpresión detiene a las células en G1, se activa transcripcionalmente por p53, el cual también incremento su expresión después de SIPS, en respuesta al daño en el ADN (Mirzayans *et al.*, 2012). La exposición a agentes que dañan el ADN da como resultado la activación de p53 que reprime a p16 y activa transcripcionalmente a p21, esta última proteína suprime la apoptosis y desencadena la senescencia (Fig. 20).

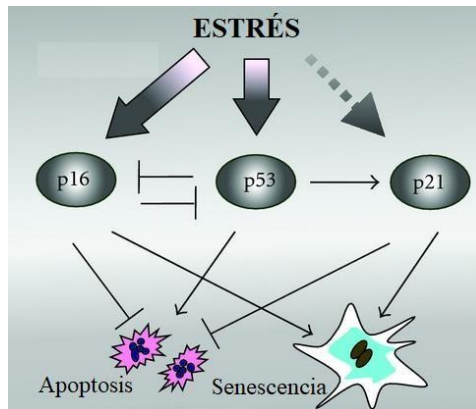


Figura 20. Modelo que ilustra la participación de los supresores de tumores p16, p53 y p21 en la senescencia (tomado y modificado de Mirzayans *et al.*, 2012)

Al analizar el SASP de día 4 donde ya se apreció un 60% de células senescentes, se mostró un incremento en la IL-6, lo que resulta interesante pues estudios previos han demostrado que niveles de IL-6 están elevados en pacientes con cáncer de próstata metastásico y se correlacionan negativamente con la supervivencia del tumor y la respuesta a la quimioterapia. La IL-6 es capaz de promover la proliferación celular del cáncer de próstata e inhibir la apoptosis *in vitro* e *in vivo*, además se asocia con un fenotipo agresivo del cáncer de próstata y puede estar involucrada en el proceso metastásico a través de la regulación de la transición epitelio-mesénquima (Nguyen y Tewari, 2014). Por su parte IL-8 también presentó un incremento notable en el SASP de día 4. La IL-8 es una importante citocina proinflamatoria secretada por una amplia variedad de células normales y cancerosas de diferentes tejidos en la próstata. La secreción incrementada de IL-8 se correlaciona con el potencial metastásico de las células de cáncer de próstata (Neveu *et al.*, 2014). Por lo cual los incrementos observados de estas interleucinas en el SASP del día 4 podrían promover el desarrollo del cáncer debido a las

actividades biológicas que ambas moléculas poseen. Por su parte niveles elevados de GRO (CXCL1), ejercen actividades promotoras durante el proceso carcinogénico al aumentar la angiogénesis tumoral (Kuo et al., 2012), postulando a esta molécula como participe en el desarrollo y progresión tumoral. Por otro lado en una respuesta que podría parecer compensatoria ante la expresión elevada de las citocinas anteriores, el GM-CSF una citocina capaz de inducir al factor de necrosis tumoral, así como la activación de macrófagos y actividad antitumoral de células dendríticas, mejora la inmunidad antitumoral a través de la activación directa de las células dendríticas, así como la activación indirecta de las células T (Small *et al.*, 1999) se encontró también elevado en el SASP de día 4. Estos cambios observados en la expresión de citocinas encontradas en el SASP podrían contribuir al proceso carcinogénico si la célula senescente no es eliminada por el sistema inmune como sucede en el envejecimiento. Sin embargo se debe considerar algunas otras propiedades de las citocinas, como la sinergia para la realización de sus funciones y su carácter pleiotrópico. Posteriormente la expresión de estas citocinas disminuyó en el SASP proveniente del día 9 lo que reafirma la idea de que el SASP presenta cambios dinámicos en el contenido de sus componentes con respecto al tiempo (Rodier y Campsi, 2011). Se ha propuesto que la primera fase de secreción del SASP comienza inmediatamente después del daño del ADN y dura las primeras 36 horas. La siguiente fase es la fase "temprana" de SASP, que continúa durante varios días después del inicio de la SC. Es durante este período que comienzan a aparecer los factores SASP más importantes. Durante los próximos 4 a 10 días, la secreción de la mayoría de los factores se intensifica debido al efecto autocrino de

la SASP, que finalmente conduce a la formación de la SASP "madura" (Borodikina *et al.*, 2018).

El incremento en la proliferación del cultivo HPEC senescente al añadir EGF se debió a las células que no estaban en estado senescente demostrado por las inmunocitoquímicas, ya que a pesar de que el cultivo en su mayoría estaba senescente con SIPS, había células que continuaban proliferando debido a la heterogeneidad de la población pues no todas establecen la senescencia después de SIPS. También esta respuesta nula ante el EGF podría deberse a que las células en proliferación responden a los mitógenos (factores de crecimiento) inician y mantienen la transición de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular, pero durante la SC la activación de CDK4 o CDK6 se encuentra bloqueada por la expresión de p16 (Blagosklonny, 2003).

Finalmente la disminución en la proliferación observada al tratar a las HPEC con el SASP proveniente del día 9 pudo deberse a una disminución en la expresión de IL-6 e IL-8 que son moléculas son potentes inductoras de la proliferación de HPEC, reportes previos indican que la IL-6 puede actuar como un factor de crecimiento autocrino (Giri e Ittmann, 2001).

11. CONCLUSIÓN

Con este estudio se demostró que la concentración de H₂O₂ utilizada en células epiteliales de próstata fue menor que la requerida por los fibroblastos para lograr el establecimiento de la senescencia por SIPS. Los marcadores de senescencia como p53 mostraron un incremento en su expresión p53 y la localización de p16 y 21 nuclear, como lo que sucede durante la senescencia en fibroblastos. También se observó un aumento de β-gal citoplasmático en HPEC similar al que se reporta fibroblastos. El SASP generado por las HPEC durante la senescencia mostró cambios las moléculas contenidas en diferentes días posteriores a SIPS y además generó una disminución en la proliferación de HPEC, probablemente por la disminución de IL-6. También se comprobó que durante la senescencia las HPEC no presentaron respuesta ante el estímulo mitogénico dado por el EGF, situación que también ocurre en los fibroblastos senescentes.

Este trabajo de investigación detectamos que existen diferencias en la susceptibilidad de inducción de daño para generar SC, además de ser el comienzo de estudios sobre la participación de las células epiteliales senescentes de próstata mediante el SASP en el desarrollo de patologías en próstata.

12. PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar la proliferación de HPEC no senescentes con SASP proveniente del día 4.
- 2) Evaluar el estado redox mediante el cociente de glutatión oxidado y reducido por HPLC.
- 3) Evaluar mediante ensayo de cicatrización la migración de HPEC en presencia del SASP de día 4 y 9.
- 4) Evaluar la proliferación de una línea celular de cáncer de próstata al añadir el SASP proveniente de los días 4 y 9.

13. REFERENCIAS

- Abbadie, C., Pluquet, O., & Pourtier, A. (2017). Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(24), 4471-4509.
- Azevedo, A., Cunha, V., Teixeira, A. L., & Medeiros, R. (2011). IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World Journal Clinical Oncology*, 2(12), 384-396
- Barajas-Gómez, B. A., Rosas-Carrasco, O., Morales-Rosales, S. L., Vázquez, G. P., González-Puertos, V. Y., Juárez-Cedillo, T. & Luna-López, A. (2017). Relationship of inflammatory profile of elderly patients serum and senescence-associated secretory phenotype with human breast cancer cells proliferation: Role of IL6/IL8 ratio. *Cytokine*, 91, 13-29.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S. & Nelson, P. S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Research*, 66(2), 794-802.
- Bhatia, B., Multani, A. S., Patrawala, L., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Zhou, J., & Chang, S. (2008). Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *International Journal of Cancer*, 122(7), 1483-1495.
- Bianchi-Frias, D., Vakar-Lopez, F., Coleman, I. M., Plymate, S. R., Reed, M. J. & Nelson, P. S. (2010). The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PloS one*, 5(9).
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., y Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349-352.

- Borodkina, A. V., Deryabin, P. I., Giukova, A. A., & Nikolsky, N. N. (2018). "Social Life" of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It?. *Acta naturae*, 10(1), 4.
- Burton, D. G. A. (2009). Cellular senescence, ageing and disease. *Age*, 31(1), 1-9.
- Campisi, J. (1997). Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45(4), 482-488.
- Campisi, J. (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*, 14(1), 183-188.
- Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons?. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 339-349.
- Campisi, J. (2007). Aging and cancer cell biology, 2007. *Aging Cell*, 6(3), 261-263.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual Review of Physiology*, 75, 685-705.
- Campisi, J., & di Fagagna, F. D. A. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729.
- Cancer Research UK (2018), <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type>, Cancer Research UK.
- Chandeck, C., & Mooi, W. J. (2010). Oncogene-induced cellular senescence. *Advances In Anatomic Pathology*, 17(1), 42-48.
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?. *The EMBO Journal Reports*, 15(11), 1139-1153.

- Chiu, J Dawes, I. 2012. Redox control of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*. 22.592-601.
- Cho, S., & Hwang, E. S. (2011). Fluorescence-based detection and quantification of features of cellular senescence. In *Methods in cell biology* Academic Press.103,149-188.
- Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2004). Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology*, 5(1), 55-61.
- Collado, M., M.A. Blasco, & M. Serrano. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 130:223–233.
- Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J. & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6(12), e301.
- Coppé, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathological Mechanical Disease*, 5, 99-118.
- Coqueret, O. 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology*. 13. 65-70.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C. & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363-9367.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Fripiat, C., Mazarati, J. B. & Toussaint, O. (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(3), 361-373.

- El Sheikh, S. S., Domin, J., Abel, P., Stamp, G., & Lalani, E. N. (2004). Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF. *Neoplasia*, 6(6), 846-853.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., & Bray, F. (2018). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*.
- Giri, D., Ozen, M., & Ittmann, M. (2001). Interleukin-6 is an autocrine growth factor in human prostate cancer. *The American Journal of Pathology*, 159(6), 2159-2165.
- Hayflick, L. & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585-621.
- Imss.gob.mx. (2017). Cáncer de próstata. [online] Disponible en: <http://www.imss.gob.mx/salud-en-linea/cancer-prostata> [Acceso 02 Feb. 2017].
- Jackson, S., Bartek, J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature Review*. 461.1071-1078
- Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., & Koul, H. K. (2009). Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Letters*, 282(2), 125-136.
- Kong, Y., Cui, H., Ramkumar, C., & Zhang, H. (2011). Regulation of senescence in cancer and aging. *Journal of Aging Research*.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12072-12077.

- Krtolica, A. & Campisi, J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(11), 1401-1414.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development*, 24(22), 2463-2479.
- Kuo, P. L., Shen, K. H., Hung, S. H., & Hsu, Y. L. (2012). CXCL1/GRO α increases cell migration and invasion of prostate cancer by decreasing fibulin-1 expression through NF- κ B/HDAC1 epigenetic regulation. *Carcinogenesis*, 33(12), 2477-2487.
- Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R. & Terrian, D. M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 68(19), 7864-7871.
- Long, R., Morrissey, C., Fitzpatrick, J. M., & Watson, R. W. G. (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clinical Science*, 108(1), 1-11.
- López-Diazguerrero, N. E., López-Araiza, H., Conde-Perezprina, J. C., Bucio, L., Cárdenas-Aguayo, M. C., Ventura, J. L. & Königsberg, M. (2006). Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(7), 1161-1169.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.
- Maciel-Barón, L. A., Morales-Rosales, S. L., Aquino-Cruz, A. A., Triana-Martínez, F., Galván-Arzate, S., Luna-López, A. & Königsberg, M. (2016). Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *Age*, 38(1), 1-14.
- McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65-77.

- Minelli, A., Bellezza, I., Conte, C., & Culig, Z. (2009). Oxidative stress-related aging: a role for prostate cancer?. *Reviews on Cancer*, 1795(2), 83-91.
- Mirzayans, R., Andrais, B., Hansen, G., & Murray, D. (2012). Role of in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochemistry research international*, 212.
- Muller, M. (2009). Cellular Senescence: Molecular mechanisms, *In Vivo significance and Redox Considerations*. *Antioxidant Redox Signaling*. 11.59-98
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S. & Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104-1118.
- Neveu, B., Moreel, X., Deschênes-Rompré, M. P., Bergeron, A., LaRue, H., Ayari, C & Fradet, V. (2014). IL-8 secretion in primary cultures of prostate cells is associated with prostate cancer aggressiveness. *Research and Reports in Urology*, 6, 27-34.
- Nguyen, D. P., Li, J., & Tewari, A. K. (2014). Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU International*, 113(6), 986-992.
- Oliver, S. E., Barrass, B., Gunnell, D. J., Donovan, J. L., Peters, T. J., Persad, R. A. & Holly, J. M. (2004). Serum insulin-like growth factor-I is positively associated with serum prostate-specific antigen in middle-aged men without evidence of prostate cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(1), 163-165.
- Polytarchou, C., Hatzia Apostolou, M., & Papadimitriou, E. (2005). Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affinity regulatory peptide gene. *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40428-40435.
- Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer*, 130(8), 1715-1725.

- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 9.402-412.
- Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R. & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, 11(8), 9739-964.
- Rodier, F., Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Biology Chemistry*. 192. 547-556.
- Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., & Berezkin, G. V. (2015). Theories of aging: an ever-evolving field. *Acta Nature*, 7(1 (24)).
- Small, E. J., Reese, D. M., Um, B., Whisenant, S., Dixon, S. C., & Figg, W. D. (1999). Therapy of advanced prostate cancer with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clinical Cancer Research*, 5(7), 1738-1744.
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development*, 28(2), 99-114.
- Sciarra, A., Mariotti, G., Gentile, V., Voria, G., Pastore, A., Monti, S., & Di Silverio, F. (2003). Neuroendocrine differentiation in human prostate tissue: is it detectable and treatable?. *BJU International*, 91(5), 438-445.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1, 72–76.
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 1-12.
- Toussaint, O., Medrano, E. E., & Von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8), 927-945.
- Udensi, U. K., & Tchounwou, P. B. (2016). Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 139.

- Untergasser, G., Koch, H. B., Menssen, A. & Hermeking, H. (2002). Characterization of Epithelial Senescence by Serial Analysis of Gene Expression. *Cancer Research*, 62(21), 6255-6262.
- Vital, P., Castro, P., Tsang, S., & Ittmann, M. (2014). The senescence-associated secretory phenotype promotes benign prostatic hyperplasia. *The American Journal of Pathology*, 184(3), 721-731.
- Ward, I. M., & Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 47759-47762.
- Xue, Y., Smedts, F., Debruyne, F. M., de la Rosette, J. J. & Schalken, J. A. (1998). Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate. *The Prostate*, 34(4), 292-301.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00199

Matrícula: 2163802400

Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) de células epiteliales de próstata humana y caracterización del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP).

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 7 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN
DRA. ERIKA OLIVIA GOMEZ GONZALEZ
DRA. FELA MENDLOVIC PASOL
DRA. REBECA LOPEZ MARURE



Verónica Salas Venegas
VERONICA SALAS VENEGAS
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: VERONICA SALAS VENEGAS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

Dr. José Antonio de los Reyes Heredia
DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

Sara Lucía Camargo Ricalde
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

Mina Konigsberg Fainstein
DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

Erika O. Gómez
DRA. ERIKA OLIVIA GOMEZ GONZALEZ

VOCAL

Fela Mendlovic Pasol
DRA. FELA MENDLOVIC PASOL

SECRETARIA

Rebeca López Marure
DRA. REBECA LOPEZ MARURE