UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

"ENVEJECIMIENTO EN CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN Y PRESENCIA DE LA Bcl-2 COMO POSIBLE MOLÉCULA PROTECTORA DE DAÑO EN EL ADN"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

B. E. NORMA EDITH LÓPEZ DÍAZ-GUERRERO

TUTOR:

M. en C. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

ASESORES:

DRA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

M. en B.E. EDITH CORTÉS BARBERENA

DR. HUMBERTO GONZÁLEZ MÁRQUEZ

DRA. REBECA LÓPEZ MARURE



México, D. F. ***Octubre de 2001***

“ENVEJECIMIENTO EN CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMON DE RATON Y PRESENCIA DE Bcl-2 COMO POSIBLE MOLÉCULA PROTECTORA DE DAÑO EN EL ADN”

Maestría en Biología Experimental

B.E. Norma Edith López Diáz-Guerrero

1. INTRODUCCION 1
1.1 ENVEJECIMIENTO CELULAR 1
1.2 LOS RADICALES LIBRES Y EL ESTRÉS OXIDATIVO 2
1.3 PRODUCCION FISIOLOGICA DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO 3
1.4 PROTECCIÓN CELULAR CONTRA RADICALES LIBRES 5
1.5 ESTRÉS OXIDATIVO 6
1.6 DAÑO AL ADN 6
1.7 PROLIFERACIÓN CELULAR Y SENESCENCIA REPLICATIVA 7
1.8 BCL-2 y APOPTOSIS 8
1.9 Bcl-2 COMO PROTECTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO 9
1.10 CONTENIDO DE Bcl-2 EN ORGANISMOS ENVEJECIDOS 11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 13
3. HIPÓTESIS 14
4. OBJETIVO GENERAL 15
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES 15
5. METODOLOGÍA 16
5.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS DE PULMON DE RATON Y ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO. 16
5.1.1 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN 16
5.1.2 SEMBRADO DE CELULAS PARA LAS DETERMINACIONES A LO LARGO DEL TIEMPO DE CULTIVO 18
5.2 PARAMETROS DE ENVEJECIMIENTO 19
5.2.1 PROLIFERACION CELULAR 19
5.2.2 FUNCIONALIDAD CELULAR 20
5.2.3 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DUPLICACION CELULAR 21
5.2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA SENESCENCIA EN LAS CÉLULAS DE CULTIVO PRIMARIO 22
5.3 EVALUACION DEL CONTENIDO DE BCL-2 POR WESTERN BLOT 23
5.4 RETO DE ESTRÉS OXIDATIVO 28
5.5 DETERMINACION DE DAÑO AL ADN TOTAL. 29
5.6 CUANTIFICACION DE RADICALES LIBRES 31
5.7 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS 33

6. RESULTADOS 34
6.1 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMON DE RATON 34
6.2 PROLIFERACIÓN CELULAR 34
6.3 INCORPORACIÓN DE TIMIDINA 35
6.4 FUNCIONALIDAD CELULAR 36
6.5 DAÑO OXIDATIVO AL ADN 36
6.6 DETERMINACIÓN DE SENESCENCIA POR ENSAYO SA-β-GALACTOSIDASA 37
6.7 NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO) 38
6.8 DETERMINACIÓN DE LA PROTEINA Bcl-2 POR WESTERN BLOT 38
7. DISCUSION 40
8. REFERENCIAS 48

1. INTRODUCCION

1.1 ENVEJECIMIENTO CELULAR

El proceso de envejecimiento es un fenómeno biológico complejo e inevitable que se relaciona con la pérdida o decaimiento de varias funciones bioquímicas, estructurales y fisiológicas del organismo que conducen a la morbilidad y a la muerte (Kirkwood, 1989).

Existen varias hipótesis que tratan de explicar el envejecimiento, sin embargo ninguna de ellas explica todas las causas del fenómeno, antes bien, parece ser que el envejecimiento es un proceso multifactorial controlado por una combinación de factores genéticos y ambientales. Por ejemplo, las hipótesis moleculares proponen que la duración de la vida de cualquier especie está gobernada por genes que interactúan con los factores ambientales. Las hipótesis sistémicas adscriben el envejecimiento de todo el organismo a un decremento de la función de un sistema clave, como el sistema nervioso, endocrino o inmunológico. Las teorías celulares relacionan los cambios que se producen en los elementos estructurales y funcionales de las células con el paso del tiempo bajo la influencia de factores ambientales con cambios morfológicos en varios organelos celulares como los lisosomas y las mitocondrias (Timiras, 1997).

Una hipótesis basada en el deterioro celular, propuesta por Harman en 1956, sugiere que el envejecimiento es el resultado del daño en el ADN acumulado a lo largo de la vida de un organismo, debido a los efectos nocivos de los radicales libres que se producen durante el curso del metabolismo celular normal. De

acuerdo a la hipótesis de Harman, las células que provienen de animales viejos deben haber acumulado mayor daño al ADN en comparación de las células provenientes de animales jóvenes. Actualmente ésta hipótesis es de las más aceptadas puesto que explica muchos de los cambios degenerativos asociados con el envejecimiento (Melov, 2000), y cuenta con una gran cantidad de evidencia experimental que la apoya (Lu et al., 1999).

1.2 LOS RADICALES LIBRES Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxigeno (ERO) son radicales libres que poseen al menos un electrón desapareado, lo que les confiere gran inestabilidad y al mismo tiempo reactividad con otras moléculas.

El oxigeno basal ($^3\Sigma gO_2$) puede ser extremadamente reactivo en presencia de otros radicales libres o en colisión con moléculas químicamente muy reductoras. Sin embargo, debido a que es un diradical que presenta dos electrones desapareados de espines paralelos, no puede aceptar en su orbital molecular un par de electrones con espines antiparalelos a la vez, sino de uno en uno. Es por ello que el producto de la primera reducción del oxigeno es el anión superóxido $O_2^{\cdot -}$ que es muy abundante en los ambientes biológicos. El anión superóxido en presencia de metales como el fierro o el cobre lleva a cabo una serie de reacciones de óxido-reducción denominadas reacciones de Haber-Weiss donde el superóxido es capaz de transferir un segundo electrón que genera el peróxido de hidrógeno (que no es un radical libre, pero si un fuerte oxidante citotóxico). El ion Fe^{+2} ó el

ion Cu^{+} que se encuentran en la célula, principalmente como cofactores unidos a proteínas, son capaces de transferir un tercer electrón al H_2O_2 (reacción de Fenton) para formar un anión y un radical hidroxilo $^{\bullet}OH$ que dan lugar a radicales libres con efectos lascivos en la célula.

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{+3} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}$$ Reacciones de Haber-Weiss

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{+2} \rightarrow H_2O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + {}^{\bullet}OH + {}^{-}OH$$ Reacción de Fenton

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + {}^{-}OH$$

(Halliwell, 1991)

El radical hidroxilo es muy reactivo y puede iniciar la reacción de lipoperoxidación, el rompimiento de las hebras o daño a las bases del ADN, y oxidar cualquier molécula orgánica. A diferencia del H_2O_2 que circula libremente a través de las membranas, el $^{\bullet}OH$ sólo actúa en el lugar donde se genera (McCord, 1993).

1.3 PRODUCCION FISIOLOGICA DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Las especies reactivas de oxigeno (ERO) se producen continuamente a velocidades altas como subproductos del metabolismo aeróbico (Hayakawa et al., 1991) y son esenciales para la regulación del metabolismo de nutrientes, de producción de energía, de destoxificación del organismo y de defensa contra las infecciones (Kirkwood, 1989). Las ERO se producen en los sistemas enzimáticos tales como las hidroxilasas, las dioxigenasas, las monooxigenasas y las

oxidoreductasas dependientes de NAD+, durante la fagocitosis, en la cascada que conduce a la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, en la acción del citocromo P-450 y en la β-oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas. Recientemente se ha sugerido que las especies reactivas de oxigeno tienen un papel importante en la regulación de expresión de algunos genes (Roberfroid, 1995).

Las mitocondrias son los organelos cuya función es proveer energía química a las células en forma de ATP. Estas son las responsables del uso de más del 90% del oxigeno en la célula. Se ha estimado que cerca del 1 al 5% del oxigeno consumido por las mitocondrias es convertido a peróxido de hidrógeno y a especies reactivas de oxigeno en condiciones fisiológicas normales. Por lo tanto la mitocondria es la fuente intracelular principal y también el propio blanco de los radicales libres (Wei, 1998).

Por otro lado, existen también factores externos que inducen la formación de los radicales libres. Algunos factores son la luz ultravioleta, la radicación ionizante y las sustancias químicas (Wallace et al., 1987) como pueden ser el humo de cigarrillo, el aire contaminado y los gases radiactivos naturales (Ames 1983).

1.4 PROTECCIÓN CELULAR CONTRA RADICALES LIBRES

La amenaza continua del daño que causan los radicales libres en la célula, en los tejidos y en general en los organismos pluricelulares, es contrarrestada por la existencia de sistemas de defensa celular. Las superóxido dismutasas (Cu-Zn

SOD y Mn SOD), la GSH peroxidasa y la GSH S-transferasa, actúan sobre el superóxido y el peróxido de hidrógeno respectivamente. La catalasa (CAT) protege a las células de la acumulación de H_2O_2 utilizándolo como aceptor de electrones. Otros atrapadores de radicales libres son la albúmina, los flavonoides y las proteínas secuestradoras de iones metálicos.

También existen sistemas de protección de bajo peso molecular como los carotenoides (β-caroteno) que evitan el daño fotosensible (Roberfroid et al., 1995), el ácido ascórbico (vitamina C) que limita las reacciones en cadena de radicales libres por donación de átomos de hidrógeno y el α-tocoferol (vitamina E), que reacciona con radicales peroxilo para formar radicales de vitamina E que son poco reactivos, evitando la lipoperoxidación de la membrana (Scandalios, 1992). Así como el glutatión reducido.

A pesar de la eficiencia de los sistemas de defensa antioxidantes, Lu y colaboradores (1999) han sugerido que existe una disminución en las actividades enzimáticas de protección contra las ERO durante el proceso del envejecimiento.

1.5 ESTRÉS OXIDATIVO

En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidantes (producción de ERO) y los sistemas de defensa (antioxidantes y/o atrapadores de radicales libres) que mantiene la homeostasis celular y la regulación del estado redox intracelular. Esto permite un control versátil en las expresiones génicas y de transducción de señales (Arakaki et al., 1999).

Cuando este balance no se mantiene, ya sea por la pérdida o la disminución del sistema protector, por un aumento en la producción de ERO o por ambos eventos simultáneamente, se dice que existe un estado de estrés oxidativo (Fahn, 1992). Si se mantienen las células bajo estrés oxidativo, se puede tener como resultado severas disfunciones metabólicas.

1.6 DAÑO AL ADN

Las principales biomoléculas blanco de las ERO son los lípidos (Marnett et al., 1985), las proteínas (Wallace et al., 1987) y los ácidos nucleicos (Fraga et al.,1990) lesionando así la función y la estructura celular.

A pesar de que existen algunos mecanismos de reparación del ADN nuclear (Mecocci et al., 1993) y reparación del ADN mitocondrial (ADNmit) (Bohr, 1998), los radicales libres causan daños estructurales como mutaciones de pares de bases, rearreglos, deleciones, inserciones y amplificaciones de secuencia; así como rompimientos de ADN, daño a genes supresores de tumores como p53, y amplificación de la expresión de protooncogenes. Además se ha visto que el estrés oxidativo induce la transformación maligna de células en cultivo (Wiseman et a.l, 1996).

Los niveles de daño oxidativo al ADNmit son al menos 10 veces más elevados que los que se encuentran en el ADN nuclear (Mecocci et al., 1993). Esos niveles de daño oxidativo y de mutación en el ADNmit se relacionan con su ubicación cercana a la membrana interna mitocondrial en donde se forman los

radicales libres. El daño al ADNmit se incrementa, debido a que no cuenta con histonas como el ADN nuclear (Laderman et al., 1996) que lo protejan de esos ataques y aunque se ha reportado que existen sistemas de reparación (Bohr, 1998), parecen no ser suficientes.

Se ha observado que las lesiones oxidativas en el ADNmit se acumulan en función de la edad en el cerebro humano (Laderman et al., 1996), en el hígado de rata (Ames et al., 1990) y en la piel humana (Lu et al., 1999). De modo que la acumulación del daño al ADN se ha asociado con el proceso de envejecimiento (Deng et al., 1999).

1.7 PROLIFERACIÓN CELULAR Y SENESCENCIA REPLICATIVA

Hasta la mitad del siglo pasado se pensó que las células en cultivo se dividían indefinidamente si se les proporcionaba el medio adecuado (Carrel, 1912). Sin embargo, los experimentos realizados por Hayflick y Moorehead (1961), demostraron que los fibroblastos humanos normales, después de un número finito de divisiones celulares, dejan de dividirse y entran en un fase que se conoce actualmente como senescencia replicativa. En 1995 se tuvo la primera evidencia directa de la existencia de células senescentes in vivo en dermis de humano, utilizando un ensayo histoquímico para β-galactosidasa (Dimri et al., 1995). La característica primordial de este estado es que cesa totalmente la proliferación celular, aún ante estímulos mitogénicos. Sin embargo, las células se mantienen metabólicamente activas y detenidas de manera irreversible en la fase G1 del ciclo

celular (Lundberg et al., 2000; Chen et al., 2000). Las células senescentes muestran cambios selectivos en la expresión génica que les da un fenotipo alterado, el cual es dependendiente del tipo celular (Campisi, 1997). Cabe aclarar que la senescencia sólo se observa en organismos pluricelulares y en células que tienen potencial para el recambio celular (Faragher et al., 2000). Por el aumento de las células senescentes encontrados al final de la vida de los cultivos, Hayflick (1977) propuso que la senescencia puede contribuir al envejecimiento en el organismo.

1.8 BCL-2 y APOPTOSIS

La molécula de Bcl-2 se descubrió en linfomas de células B en folículo humano, en la translocación intercromosomal t(14;18) que yuxtapone el proto-oncogene bcl-2 con el locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ig) (McDonell et al., 1989). Bcl-2 es una proteína de 26 kDa, 205 aminoácidos (Bcl-2b) o 239 aminoácidos (Bcl-2a) y que tiene una cola hidrofóbica anclada a la membrana (Bashki et al., 1985).

Se ha caracterizado a Bcl-2 como una proteína supresora de la muerte celular programada (apoptosis). Se ha reportado que cuando dimeriza consigo misma tiene una función antiapoptótica, mientras que cuando forma heterodimeros con la proteína homóloga Bax, es un promotor de la muerte celular (Kurscner et al., 1996). Bcl-2 se localiza anclada en las membranas y orientada

hacia el lado citosólico, ya sea en el núcleo, el retículo endoplásmico o la mitocondria (Hockenbery, 1993).

La apoptosis es una muerte fisiológica activa (diferente de la necrosis) que controla las poblaciones celulares durante la embriogénesis, la homeostasis normal de los tejidos, la respuesta inmune y los daños por virus u otros agentes como especies reactivas de oxigeno (Hockenbery, 1993). Aunque la apoptosis es un proceso morfológico bien definido, los mecanismos bioquímicos involucrados permanecen en investigación (Esteve et al., 1999).

1.9 Bcl-2 COMO PROTECTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO

Además del papel antiapoptótico de Bcl-2, se sabe que ésta proteína protege la viabilidad celular frente a un reto de estrés oxidativo. Sin embargo el mecanismo por el cual esto se lleva a cabo aún es motivo de controversia. Se ha propuesto que Bcl-2 pudiera estar protegiendo a las células mediante diferentes mecanismos y que su función pudiera ser antioxidante, prooxidante o de reparación.

Bcl-2 como prooxidante

En 1994 Steinman utilizó cultivos transfectados con bcl-2 . En los cultivos de E. Coli observó una mayor resistencia y sobrevivencia de la población en comparación de los controles. En los cultivos de células B de ratón encontró generación de ERO que inducía una respuesta antioxidante celular. Degli en 1999 transfectó bcl-2 en células de linfoma de Daudi y reportó un aumento en

la producción de peróxido de hidrógeno y un incremento en las defensas antioxidantes celulares. Con base en lo anterior, estos investigadores han propuesto que Bcl-2 actúa como una molécula pro-oxidante, puesto que induce una respuesta contra los oxidantes de baja reactividad que alertan o preparan a la célula a enfrentar un estrés oxidativo severo.

Bcl-2 como antioxidante

Por otra parte, existen trabajos que apoyan el papel antioxidante de Bcl-2. Se ha reportado que la sobreexpresión de esta proteína protege contra la muerte por estrés oxidativo además de mantener niveles bajos de fragmentación del ADN (Hockenbery, 1993). Así mismo, se sabe que Bcl-2 confiere protección contra la lipoperoxidación en las membranas plasmáticas y mitocondriales de las células neuronales (Myers et al., 1995) sin interacción de ésta molécula con constituyentes citosólicos (Bruce-Keller et al., 1998). Longo y col. (1997) realizaron estudios donde sobreexpresaron Bcl-2 en Saccharomyces cerevisiae y encontraron que persistió una disminución en la frecuencia de mutaciones y un aumento en la actividad de la catalasa cuando los cultivos se expusieron a estímulos de muerte celular con la ceramida o TNF-α. Lo anterior les llevó a proponer que Bcl-2 posee una actividad antioxidante y que la función de esta molécula en este modelo es similar a la que sucede en las células de mamíferos.

Bcl-2 y reparación

Al someter a la línea neuronal PC12, que sobreexpresa Bcl-2, a un estrés oxidativo con óxido nítrico (Deng et al., 1999), se encontró un bloqueo en la producción de ERO y una disminución en la fragmentación del ADN. Estos resultados llevaron a sugerir que Bcl-2 posiblemente está involucrada en la regulación de la expresión o función de enzimas de reparación del ADN, como la uracil-ADN-glicosilasa, la endonucleasa, la ADN-ligasa y la 8-oxoguanina-ADN-glicosilasa.

1.10 CONTENIDO DE Bcl-2 EN ORGANISMOS ENVEJECIDOS

Se han realizado relativamente pocos estudios para determinar la presencia de la proteína Bcl-2 en los tejidos y en los organismos de mamíferos. En 1994 Migheli y colaboradores reportaron un aumento en la expresión de la proteína Bcl-2 en los cerebros envejecidos, y propusieron que éste incremento pudiera ser el reflejo de un mecanismo de protección de daño contra las ERO.

En otros estudios, se compararon linfocitos humanos de individuos jóvenes (<35 años) y de individuos viejos (>60 años) y se encontró una correlación entre el aumento en la expresión de Bcl-2 y la edad avanzada del paciente (Schindowski et al., 2000)

Recientemente se ha reportado una sobreregulación de Bcl-2 en el hipocampo y el cerebelo de ratas viejas de 24 meses en comparación con los niveles de ésta proteína en ratas de 3 meses. Cuando se trató a los animales viejos

con un antioxidante PBN (N-tert-butil-α-fenilnitrona), se encontró una reversión en la sobreexpresión de dicha molécula. Por lo anterior se ha propuesto que la expresión de Bcl-2 pudiera incrementarse como consecuencia del estrés oxidativo durante el envejecimiento (Kaufmann et al., 2001).

El conocimiento de los mecanismos de daño al ADN, la participación de Bcl-2 en la modulación de las ERO y la comprensión de la relación entre el envejecimiento y la apoptosis, son puntos fundamentales para la comprensión de los mecanismos involucrados en las enfermedades asociadas con el envejecimiento celular, como la enfermedad de Alzheimer, el cáncer, la Diabetes, la enfermedad de Parkinson, las enfermedades cardiovasculares y autoinmunes.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La teoría de los radicales libres propone que el envejecimiento es el producto de la acumulación de daño por especies reactivas de oxigeno (ERO) en las células a lo largo de la vida de un organismo. La característica de las ERO es el ataque a las biomoléculas celulares, principalmente el ADN. Para contrarrestar el efecto de las especies reactivas, la célula cuenta con una amplia gama de sistemas antioxidantes, mecanismos de protección y reparación. En los últimos años se ha reportado que la proteína Bcl-2, además de estar bien caracterizada como molécula antiapoptótica, participa de alguna forma en la modulación de las ERO protegiendo a la célula del daño oxidativo, aunque se desconoce en que forma.

De manera que el interés de este trabajo reside en ayudar a la comprensión del vínculo que existe entre el daño al ADN generado por estrés oxidativo y el contenido de Bcl-2 en las células de organismos jóvenes y viejos, para correlacionarlo con el deterioro en la funcionalidad y la proliferación celular asociado a la senescencia replicativa y al envejecimiento celular.

3. HIPÓTESIS

Dado que el envejecimiento se ha relacionado con el deterioro en las funciones celulares por acumulación de daño generado en el ADN por radicales libres, se espera encontrar una diferencia en la presencia de niveles de ERO y de daño al ADN en los fibroblastos procedentes de ratones viejos en comparación con los que proceden de animales jóvenes.

Dado que Bcl-2 se ha relacionado con un efecto antiapoptótico y de protección contra agentes oxidantes, se espera encontrar una diferencia en el contenido de ésta proteína en los fibroblastos de células de ratones jóvenes en comparación con los que provienen de ratones viejos.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el daño en el ADN generado por estrés oxidativo y relacionar el deterioro celular con el contenido de Bcl-2 en los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la proliferación y el deterioro de las funciones celulares en los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos.
2. Evaluar el daño al ADN frente a un reto oxidativo en los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos.
3. Determinar los niveles de ERO y correlacionarlos con el daño oxidativo al ADN en los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos.
4. Determinar el contenido de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos.

5. METODOLOGÍA

5.1 OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS DE PULMON DE RATON Y ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO.

5.1.1 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN

Como modelo experimental se utilizó el cultivo primario de fibroblastos de pulmón. Este modelo ha sido ampliamente usado en el estudio de los aspectos celulares del envejecimiento (Warner, et al., 1997) y la senescencia (Campisi, 1997). Se eligió al pulmón debido a que este órgano tiene una elevada exposición al estrés oxidativo.

Los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos se obtuvieron según la técnica de Doyle (1998). Se utilizaron ratones hembras de la cepa CD-1 de aproximadamente 2 y 13 meses de edad. Los animales viejos fueron usados para la procreación en el bioterio produciendo entre 6 y 7 camadas cada uno. A los 13 meses, estos animales ya mostraban un fenotipo claramente envejecido, como la falta de tono muscular, la caída de pelo, la acumulación de grasa y en alguno de ellos la aparición de tumores. Los ratones jóvenes de 2 meses no procrearon en ninguna ocasión y no mostraron fenotipo envejecido.

Técnica de obtención de cultivo primario (Técnica modificada de Doyle et al., 1998)

Los ratones jóvenes y viejos fueron sacrificados mediante dislocación médulo-encefálica.

1. Se hizo una incisión ventral para extraer los pulmones.
2. Se colocó el tejido de pulmón en las cajas Petri estériles que contenían PBS (SIGMA) con 1% de antibiotic-antimycotic (Gibco).
3. El tejido se lavó 2 veces con la solución anterior, se aspiró el PBS con una jeringa evitando de que el tejido no se perdiera.
4. Se utilizó un bisturí y unas pinzas para disgregar el tejido lo más finamente posible.
5. Los fragmentos de tejido de cada origen se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL que contenían 7 mL de colagenasa 1.A (Sigma) al 0.03% en DMEM (Medio Esencial modificado por Dulbecco) (Sigma) sin SFB.
6. Se colocaron los tubos en un baño a 37°C en agitación durante 30 minutos.
7. Pasado ese tiempo se agregaron 30 mL de medio DMEM completo con 1.5% Antibac-antimycotic, 15% de SFB inactivado (Hyclone), 1% de Aminoácidos no esenciales (Microlab) a cada tubo.
8. Se homogenizó vigorosamente la suspensión utilizando una pipeta.
9. Se distribuyó la suspensión celular de manera equitativa en cajas Petri de 60 mm de diámetro.
10. El establecimiento de las primeras células fue aproximadamente después de 6 días de cultivo. El medio DMEM se cambió cada 3 ó 4 días.

11. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera con 5% de CO_2 y 90 % de humedad con temperatura de 37 °C.

5.1.2 SEMBRADO DE CELULAS PARA LAS DETERMINACIONES A LO LARGO DEL TIEMPO DE CULTIVO

Para realizar las determinaciones de los ensayos de proliferación celular, funcionalidad celular, incorporación de timidina tritiada y ensayo SA-β-galactosidasa a lo largo del tiempo de cultivo, se sembraron aproximadamente 5000 céls/pozo por triplicado en placas de 48 pozos, para cada uno de los días en los que se hicieron los experimentos.

1. Aproximadamente después de 5 ó 6 días de obtenidos los cultivos primarios, las células se lavaron cuidadosamente con PBS.
2. Las células se despegaron con Tripsina- EDTA 0.25 % (SIGMA).
3. Las células se contaron utilizando un hemocitómetro.
4. Se repartieron aproximadamente 5000 céls/pozo por triplicado para cada uno de los días en los que se hicieron los ensayos de proliferación celular, funcionalidad celular, incorporación de timidina tritiada y β–galactosidasa asociada a la senescencia. Se utilizaron placas de 48 pozos.
5. Cuando hubo confluencia celular de aproximadamente el 80 %, las células se subcultivaron en nuevos pozos.
6. Se realizaron las determinaciones correspondientes cada tercer día.

5.2 PARAMETROS DE ENVEJECIMIENTO

5.2.1 PROLIFERACION CELULAR

Se cuantificó la proliferación celular cada tercer día a lo largo de la vida del cultivo mediante la tinción con azul de tripano. El azul de tripano es un colorante de exclusión que indica la pérdida de la viabilidad celular. En las células viables la membrana plasmática previene que el azul de tripano entre. En las células muertas la permeabilidad de la membrana plasmática deja de ser una barrera y el colorante se difunde fácilmente hacia el citoplasma (Doyle et al., 1994). El número de células que no incorporaron el colorante se cuantificaron utilizando un hemocitómetro y un microscopio óptico.

Técnica para determinar la proliferación celular

1. Las células se lavaron con PBS una vez y se despegaron con 200 μL de Tripsina- EDTA 0.25 % (SIGMA).
2. Para inactivar la enzima se agregaron 200 μL de medio DMEM + SFB 15 %.
3. Se tomó una alícuota de 20 μL de suspensión celular y 20μL de azul de tripano y se homogenizaron.
4. De ésta suspensión se tomaron 10 μL y se contaron las células utilizando un hemocitómetro en un microscopio óptico.
5. El promedio de células contadas en 5 campos se multiplicó por 2, que corresponde a la dilución y ese valor se consideró el número de células X 10^4 en 1 mL de suspensión celular.

5.2.2 FUNCIONALIDAD CELULAR

Para evaluar la funcionalidad celular se usó la técnica de MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio] (SIGMA), con la que se cuantificó la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial que participa en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, reduciendo a la ubiquinona (Konigsberg, 1992). La enzima que se encuentra en las células funcionales reduce el sustrato MTT y como resultado se produce formazán de color azul, que se mide espectrofotométricamente a 570 nm (Mosman, 1983).

Técnica de funcionalidad celular (MTT)

1. A los pozos con las células correspondientes al día del experimento se les retiró el medio y se lavaron cuidadosamente con PBS.
2. Se retiró el PBS y se agregó 1 mL de MTT (Sigma) (0.5 mg/mL) pH 7.5.
3. Las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C.
4. Se retiró el MTT y se lavaron las células cuidadosamente con PBS una vez.
5. Se agregaron 800 μL de solución de extracción (HCl 0.04 M en isopropanol) a cada pozo.
6. Las placas de cultivo se colocaron sobre un plato de agitación (Thermolyne AROS 160) durante 15 minutos a temperatura ambiente para disolver el formazán.
7. Se depositó el contenido de cada pozo en celdas de cuarzo para su lectura a 570 nm utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU 640).

8. La funcionalidad se determinó normalizando los datos por número de células.

5.2.3 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE DUPLICACION CELULAR

Para estimar la velocidad de síntesis del ADN ó de duplicación celular, los cultivos de células de ratones jóvenes y viejos se incubaron con medio DMEM sin SFB que contenía una concentración de 1μCu/mL de timidina tritiada, la cual se incorporó en el ADN celular. Después de 24 horas de incubación se cuantificó la radioactividad incorporada utilizando un contador de centelleo (Butler, 1992).

Técnica de incorporación de timidina tritiada

1. A cada pozo se agregaron 500 μL de medio DMEM sin SFB inactivado que contenía 1 μCu/mL de timidina tritiada.
2. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 ºC.
3. Pasado ese tiempo se aspiró con cuidado el medio y se lavó dos veces con PBS, cuidando de no despegar a las células.
4. Las células se fijaron con 500 μL de una solución con metanol al 95% + 5% de PBS y se dejaron incubando durante 15 minutos a 37 ºC.
5. Se retiró el metanol y se lavó cuidadosamente con PBS dos veces.
6. Se agregaron 500 μL de NaOH 0.2N a cada pozo para hidrolizar y despegar las células adheridas y se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 37ºC.

7. Pasado ese tiempo, el contenido de cada pozo se transfirió a un vial que contenía 5 mL de liquido de centelleo (120g de Naftaleno, 8g de PPO, 0.4g de POPOP, 200 mL de Metanol, 40 mL de Etilenglicol, 2000 mL de Dioxano).
8. La radiactividad se cuantificó utilizando un contador de centelleo (BECKMAN LS 6500) y se reportó como cpm de timidina tritiada incorporada/no.de células.

5.2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA SENESCENCIA EN LAS CÉLULAS DE CULTIVO PRIMARIO

Cómo marcador de senescencia se usó el ensayo de β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-gal). La técnica consiste en la hidrólisis del reactivo x-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido) por la enzima β-galactosidasa cuya presencia se encuentra considerablemente aumentada en las células envejecidas en comparación de las células jóvenes. Tras la reacción se produce un precipitado verde-azul (Dimri, 1995) que se cuantifica contando las células teñidas con la ayuda de un microscopio óptico.

Técnica de ensayo SA-β-gal

1. Se agregaron 300 μL de solución fijadora (Buffer PIPES 0.1M pH 6.9, 2% de paraformaldehido, 2 mM de $MgCl_2$, 1.35 mM de EGTA pH 8) a cada pozo.
2. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora.
3. Pasado ese tiempo se retiró la solución y se lavaron las células tres veces con PBS.

4. Se agregaron 300 μL de solución X-gal que contenía 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM de $K_3Fe(CN)_63H_2O$, 2 mM $MgCl_2$ y 1 mg/mL de X-gal (PROMEGA), con un pH final de 6.8, el cual se ajustó a pH 6.
5. Las células se mantuvieron en incubación a 37°C durante toda la noche.
6. La observación de las células positivas teñidas de azul se realizó utilizando un microscopio óptico. Se contó en cada uno de los pozos del triplicado un campo, y el total de células teñidas y no teñidas, correspondió al 100%.
7. Las células fijadas se almacenaron a 4 ºC para las determinaciones futuras.

5.3 EVALUACION DEL CONTENIDO DE BCL-2 POR WESTERN BLOT

Se realizó el inmunoensayo tipo western blot para determinar el contenido de la proteína Bcl-2 en los fibroblastos de los cultivos primarios de ratones jóvenes y viejos. Como control positivo de la presencia de Bcl-2, se utilizó una línea de tumor mamario humano MCF-7 que sobreexpresa Bcl-2. Esta línea celular fue proporcionada por el Dr. Alejandro Zentella del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Técnica de inmunoanálisis por Western blot (Sambrook, 1989)

A. Lisis de células de cultivo primario.

1. Se utilizaron 5 cajas Petri de 60 mm de diámetro con una confluencia del 70%. Las células se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS. Las cajas se

mantuvieron de forma inclinada sobre una cama de hielo. El exceso de PBS se extrajo por aspiración.

2. A cada caja Petri se le agregaron 50 μL de solución de lisis (Aproptinina 1μg/μL, Leupeptina 1μg/μL) y se incubaron durante 3-5 minutos sobre el hielo, las cajas se movieron cada minuto para que la solución se repartiera homogéneamente.
3. Se utilizó un gendarme para reunir toda la materia celular.
4. La muestra se colocó en un tubo de microfuga y se centrífugó a 14,000 rpm durante 15-20 minutos a 4°C (Centrifuge eppendorf 5415C).
5. El sobrenadante que contenía el material del citosol se transfirió a otro tubo de microfuga y se almacenó a –20°C, mientras que el botón en dónde quedaron los núcleos se desechó.

B. Determinación de la proteína total por el método de Bradford

1. Se realizó una curva patrón utilizando albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA).
2. Se tomaron 2 μL De la proteína total extraída de los cultivos primarios de ratones jóvenes y viejos así como de la línea MCF-7 (que sobreexpresa Bcl-2) y se colocaron en tubos de ensayo con 800 μL de agua destilada cada uno.
3. Se agregaron 200 μL de reactivo de Bradford a cada tubo y se mezcló cada uno utilizando un vortex.

4. Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro a 595 nm y se determinó la concentración de proteína para cada caso usando la curva patrón.

C. Electroforesis de proteínas totales en gel de SDS-poliacrilamida

1. Para el corrimiento de las proteínas totales se prepararon 10 mL del gel de resolución al 13 % (3.35 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 100 μL de dodecil sulfato de sodio SDS 10%, 4 mL de Acrilamida/Bis (Stock 30%), 50 μL de persulfato de amonio 10%, 5 μL de N,N,N´,N´-tetrametiletilendiamina TEMED) 1X y 10 mL del gel concentrador al 4% (6.1 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 100 μL de SDS 10%, 1.3 mL de Acrilamida/Bis (Stock 30%), 50 μL de persulfato de amonio 10%, 10 μL de N,N,N´,N´-tetrametiletilendiamina TEMED).
2. Para cada una de las muestras se prepararon tubos eppendorf. Cada tubo contenía 40 μg de proteínas totales + Buffer 4X (2-mercaptoetanol, SDS y glicerol) y agua destilada.
3. Los tubos se pusieron en agua hirviendo durante 3 minutos para relajar la estructura secundaria de las proteínas.
4. El marcador de peso molecular, las muestras de las proteínas totales de la línea MCF-7 (60 μg) y de los fibroblastos de ratones jóvenes y viejos (40 μg de cada uno) se colocaron en los carriles del gel concentrador utilizando una jeringa Hamilton.

5. Para el corrimiento se utilizó el Buffer de corrida (Tris 0.25, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). El corrimiento se realizó durante 2 horas a un voltaje de 80 mV.

D. Transferencia de proteínas totales a la membrana de nitrocelulosa.

1. Transcurrido el tiempo de corrimiento de las proteínas, se identificó el rango de la posición de la proteína Bcl-2 ayudados por el marcador de peso molecular.
2. Se cortó cuidadosamente el gel dejando un fragmento que se tiñó con azul de Comassie para ver el cargado, el otro fragmento que contenía la proteína de interés se utilizó para la transferencia y cuidadosamente se colocó el gel con pinzas entre 2 capas de papel filtro y la membrana de nitrocelulosa y sobre ésta 2 capas de papel filtro, todos cortados exactamente del mismo tamaño del gel formando un "sándwich".
3. El "sandwich se colocó" sobre la placa de la cámara de transferencia que contenía buffer de transferencia frío (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.05% y Metanol 20%), se transfirió a un voltaje de 100 mV durante toda la noche.

E. Anticuerpo primario, secundario y revelado.

1. Pasado ese tiempo, se colocó la membrana en un recipiente que contenía TBS-tween (Nacl 150 mM, Tris-Hcl 20 mM, tween 0.1 %, pH 7.5) + 3 % de leche descremada. Se bloqueó durante 60 minutos a temperatura ambiente.
2. Se lavó cuidadosamente 2 veces con TBS-tween.

3. La membrana se colocó en una solución que contenía 15 μL del anticuerpo primario anti- Bcl-2 (Bcl-2 Alpha Ab-1 Mouse Mab Neomarker) en 3 mL de TBS-tween + albúmina 0.1 % durante 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación ligera. El anticuerpo primario se utilizó a una dilución 1:200.
4. La membrana se lavó cuidadosamente 3 veces con TBS-tween. La duración de cada lavado fue de 5 minutos.
5. Posteriormente, se agregó 1 μL de anticuerpo secundario α-IgG peroxidasa de ratón en 10 mL de TBS-tween + albúmina 0.1 % durante 90 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución de 1:10000.
6. Se lavó 2 veces con TBS-tween cuidadosamente y 3 veces con TBS solo. La duración de cada lavado fue de 5 minutos.
7. Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 2 mL de luminol Super Signal West Pico y 2 mL de peróxido Super Signal West Pico Stable.
8. Para el revelado se utilizó película para diagnóstico Kodak que se veló gracias a la fluorescencia generada por la reacción de la peroxidasa indicando la presencia de Bcl-2.
9. La película se reveló utilizando el Revelador y el Fijador Kodak preparados a diluciones 1:20 y 1:10 respectivamente.

Los pasos 8 y 9 se realizaron en el cuarto obscuro.

5.4 RETO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Para generar un estado de estrés oxidativo se utilizó H_2O_2,que es un agente oxidante natural y precursor de radicales hidroxilo (•OH). Se realizaron experimentos previos para encontrar el tiempo y la concentración no letal de peróxido de hidrógeno que indujera daño en el ADN sin causar muerte celular y se encontró que la concentración adecuada fue 0.3 mM. Este tratamiento permitió evaluar la respuesta primaria de las células frente a las ERO.

Tratamiento agudo con H_2O_2

1. A cada pozo con células se le retiró el exceso de medio DMEM completo.
2. Se lavó cuidadosamente con PBS.
3. A cada pozo se le agregó medio DMEM con H_2O_2 0.3 mM.
4. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C.
5. Pasado ese tiempo las células se despegaron con tripsina-EDTA 0.25 %.
6. La enzima se inactivó con DMEM completo y la suspensión celular se colectó en un tubo que se centrifugó a 1,200 rpm durante 10 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se desechó.
7. El botón celular se utilizó para los experimentos de daño al ADN mediante la técnica de electroforesis unicelular alcalina.

5.5 DETERMINACION DE DAÑO AL ADN TOTAL.

La determinación de daño en el ADN se realizó mediante la técnica de electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa, en la que se revela el daño al ADN de manera independiente en cada célula de la población. Las células se embeben en un gel de agarosa y se lisan con detergentes que contienen concentraciones elevadas de sales. Este tratamiento produce rompimientos de una sola hebra y se libera el superenrrollamiento por lo que se forma una estructura relajada llamada nucleoide. Cuando los nucleoides se colocan en un campo eléctrico se forma una estela que da la apariencia de un cometa, de ahí el nombre. La longitud de la estela refleja la cantidad de daños en el ADN de cada célula (Singh et al., 1988).

Técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina

1. La agarosa regular al 1% se disolvió en PBS libre de calcio y magnesio (Microlab) y se calentó en el horno de microondas por 30 segundos.
2. Cuando estuvo completamente líquida, se tomó un volumen de 110 μL que se coloco sobre un cubreobjetos que estaba sobre el hielo. El cubreobjetos se puso sobre un portaobjetos completamente esmerilado (Fisher Finest). Al enfriarse la agarosa se formó una capa sobre el portaobjetos. Todos los pasos para formar las capas se hicieron sobre una cama de hielo.

3. Aproximadamente 100 000 células, se despegaron con tripsina-EDTA 0.25 % y posteriormente la enzima se inactivó con medio DMEM que contenía SFB inactivado.
4. La suspensión de células se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. El sobrenadante se desechó y el botón se mezcló con 80 μL de agarosa LMP tibia al 0.5% disuelta en PBS libre de calcio y magnesio (Microlab). Se tomó un volumen de 80 μL y se colocó sobre un cubreobjetos que a su vez se puso sobre el portaobjetos con la capa de agarosa regular preparada anteriormente. Se despegó cuidadosamente el cubreobjetos y a este se le agregaron otros 80 μL de la solución de agarosa LMP tibia que se colocó de nuevo sobre el portaobjetos, quedando así la muestra con las células entre una capa de agarosa regular y otra de agarosa LMP.
6. El cubreobjetos se despegó cuidadosamente. El portaobjetos con las capas de agarosa adheridos a él se colocaron en la solución de lisis que contenía NaCl 2.5 M (JT Baker), EDTA 100 mM (Sigma), Tris 10 mM (JT Baker), NaOH 10 N (JT Baker) pH 10, más 1% de tritón (Sigma) y 10% de DMSO (Merck), que se preparó en el momento de usarse. Las preparaciones se dejaron en ésta solución durante 3 horas a 4°C.
7. Pasado ese tiempo, las preparaciones se colocaron en un buffer de corrida de electroforesis que contenía 45 mL de solución Stock de NaOH 10 N y 7.5 mL de

solución Stock de EDTA (para 1.5 L) y se dejaron equilibrar durante 20 minutos.

8. Posteriormente las preparaciones se colocaron en una cámara de electroforesis y se corrieron los geles por 20 minutos a 25 volts y 300 miliamperes.
9. Al término del corrimiento se enjuagaron los geles con solución de neutralización (Tris 0.4 M) en 3 ocasiones de 5 minutos cada una.
10. A cada preparación, se le agregaron 2-3 gotas de bromuro de etidio 0.1 mg/mL y se les colocó un cubreobjetos (para evitar que se deshidrataran los geles).
11. El daño al ADN se cuantificó midiendo la longitud de la cola del cometa en μm a partir del borde del nucleoide hasta el extremo de la cola. Se observaron los cometas con un microscopio de epifluorescencia con un objetivo 40x. La longitud de la cola se determinó con un Analizador de imágenes (Synoptics) el software VIDS.

Los experimentos se realizaron por triplicado en 3 eventos independientes de los cuales se cuantificaron 50 cometas de cada condición. Las determinaciones se hicieron durante la fase de crecimiento exponencial en los cultivos primarios de células de ratones jóvenes y viejos los días 14, 17 y 20.

5.6 CUANTIFICACION DE RADICALES LIBRES

La determinación de los radicales libres se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Se usó el fluoróforo DCFH-DA (diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceina) que cuando entra a la célula es desacetilado por las

esterasas y se convierte en DCF (2´,7´-diclorodihidrofluoresceina). Cuando ésta molécula es oxidada por las ERO que provienen del H_2O_2 como los radicales •OH, emite fluorescencia a 520 nm cuando se excita a 480 nm (Deglii et al., 1999).

Técnica de Determinación de radicales libres

1. Aproximadamente 500 000 células se despegaron con tripsina-EDTA 0.25 % de sus respectivos pozos.
2. La suspensión celular se centrifugó durante 2 minutos a 4 ºC a 1000 rpm (CENTRA 4 IEC).
3. El botón celular se resuspendió en 0.5 mL de PBS que contenía 25 μL de DCFH-DA, con una concentración final de 4 μM (Stock de 100 mg en 2 mL de DMSO 1:100).
4. Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente para que se incorporara el fluoróforo.
5. Pasado ese tiempo la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm para quitar el exceso de DCFH-DA y el botón se resuspendió en 0.5 mL de PBS.
6. La cuantificación se realizó dentro de los siguientes 30 minutos en el Citómetro de flujo y las muestras se leyeron para determinar los niveles basales de ERO.
7. Para determinar los niveles de ERO después de someter a las células a estrés oxidativo, se agregó al homogenado celular una concentración 0.3 mM de

H_2O_2. Posteriormente se hizo la cuantificación de los ERO en el citómetro de flujo a los 15 y 30 minutos.

5.7 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Para el tratamiento estadístico de los ensayos de viabilidad celular, funcionalidad celular, incorporación de timidina tritiada y niveles de ERO, se utilizó la prueba de t Student, en donde se compararon las medias y las desviaciones normales de los grupos de datos, para determinar si entre esos parámetros las diferencias eran estadísticamente significativas. Para los resultados del ensayo cometa se usó el análisis de varianza (Tamhane), seguido por la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis. El nivel de significancia fue de $p \leq 0.05$ en todos los casos. Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS 8.0. Todos los experimentos se hicieron por triplicado en al menos tres ocasiones independientes.

6. RESULTADOS

6.1 ESTABLECIMIENTO DE CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMON DE RATON

Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de pulmones de ratones hembras de 2 y 13 meses de edad. Durante los primeros días del establecimiento de los cultivos se observó la presencia de algunas células epiteliales además de fibroblastos. Sin embargo, conforme el tiempo de cultivo fue avanzando, los fibroblastos comenzaron a predominar aproximadamente desde el día 7 como se ve en la Fig. 1.

Las determinaciones de especies reactivas de oxigeno (ERO) y de daño al ADN por ensayos cometa, se realizaron utilizando las células de aproximadamente el día 16 del cultivo, asegurándonos de tener solo presencia de fibroblastos y no otro tipo celular que interfiriera con los resultados.

6.2 PROLIFERACIÓN CELULAR

En la Fig. 2 se gráfica el no. de células a lo largo del tiempo de vida del cultivo. El conteo celular se realizó cada tercer día a lo largo del tiempo de los cultivos. Se aprecia que la curva de proliferación celular tiene un comportamiento característico de cultivo primario in vitro como lo ha referido Hayflick (1977). Se observa que tanto en el cultivo de fibroblastos de ratones jóvenes como en el de fibroblastos de ratones viejos, hay un tiempo de establecimiento hasta

aproximadamente el día 13 (tras su obtención). A partir de esa fecha los fibroblastos de ratones jóvenes muestran una fase log o de proliferación vigorosa más acentuada hasta aproximadamente el día 19, con un tiempo de duplicación celular de 30 horas. Los fibroblastos de ratones viejos presentan una proliferación más lenta con una división celular cada 34-36 horas. A partir del día 19 y 21 se observa el inicio de la pérdida de la capacidad proliferativa en las células provenientes de animales viejos y de jóvenes respectivamente, y para el día 27, ambos cultivos ya presentan un fenotipo senescente con una apariencia celular aplanada y grande, además de que han dejado de dividirse.

6.3 INCORPORACIÓN DE TIMIDINA

Las determinaciones de incorporación de timidina se hicieron en diferentes puntos a lo largo del cultivo. En la Fig. 3 se grafican las cpm/no.de células durante los días de cultivo. Los datos se normalizaron para poder comparar los resultados. Como se observa, desde el inicio ambos cultivos muestran un incremento paulatino desde el día 11 hasta el día 19. A partir de ese momento comienza a disminuir la incorporación de timidina hasta el día 27 en que se hizo la última medición. Es claro que el nivel de incorporación de timidina tritiada siempre es mayor en las células de animales jóvenes que en células de animales viejos y en el momento de mayor duplicación celular la incorporación es aproximadamente 30 % más alta en los primeros que en los segundos.

6.4 FUNCIONALIDAD CELULAR

La funcionalidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT, en dónde se evaluó la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial.

La evaluación se hizo cada tercer día durante la vida de los cultivos primarios de células de ratones jóvenes y viejos. En la Fig. 4 se grafican los valores normalizados de la absorbancia a 520 nm/no.de células contra los días de cultivo. A partir del día 13 del cultivo, los valores de funcionalidad en ambos cultivos comienzan a aumentar, y las células de animales jóvenes muestran un mejor estado funcional de hasta 50 % que las células de animales viejos. A partir del día 17, en ambos cultivos comienza a disminuir paulatinamente la actividad de la succinato deshidrogenasa. Al término se aprecia un deterioro del 75 % en ambos cultivos en comparación a la funcionalidad inicial.

6.5 DAÑO OXIDATIVO AL ADN

El daño al ADN se determinó mediante el ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina. Las determinaciones se hicieron durante la fase de crecimiento exponencial en los cultivos primarios de células de ratones jóvenes y viejos los días 14, 17 y 20. En la Fig. 5 se grafica la longitud de la cola del cometa de los fibroblastos de ratones jóvenes y viejos ya sea con/sin tratamiento de peróxido de hidrógeno. Se observa que basalmente ya existe un daño en el ADN en las células de ambos cultivos, sin embargo el daño en las células de animales viejos es 30 % mayor con respecto a las de animales jóvenes. Cuando las células se sometieron a

un reto oxidativo, se observa un aumento del 42 % de daño en las células de ratones jóvenes y del 142 % de daño al ADN en células de ratones viejos, en comparación de sus respectivos controles. Las diferencias fueron estadísticamente significativas con $p<0.05$.

6.6 DETERMINACIÓN DE SENESCENCIA POR ENSAYO SA-β-GALACTOSIDASA

Para determinar el número de células que expresaron β–galactosidasa, las células teñidas se contaron cada tercer día durante el tiempo de vida de los cultivos de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos. En la Fig. 6 se muestra la gráfica del porcentaje de las células teñidas durante los días de cultivo. En ella se aprecia que la cantidad de células teñidas como positivas senescentes aumenta conforme avanza la vida del cultivo, tanto en los cultivos de células de ratones jóvenes como en células de ratones viejos. Un 10 % de células teñidas aparecen desde el comienzo del cultivo en las células provenientes de ratones viejos hasta alcanzar en el día 25, un 65 % en comparación de un 40% en las células de ratones jóvenes. La aparición de las células senescentes en el cultivo de ratones jóvenes es más lento y en menor proporción que en las células de ratones viejos. En la Fig. 7 y 8 se muestran las fotografías de ambos cultivos con aumento paulatino de las células teñidas senescentes los días 7, 11, 19 y 25.

6.7 NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO)

Para la determinación de las ERO se utilizó el fluoróforo DCF, que al ser oxidado por los radicales libres dentro de la célula emite fluorescencia que puede ser detectada por el citómetro de flujo.

En el eje de las “x” se grafican las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) en escala logarítmica, mientras que en el eje de las “y” se grafica el número de eventos.

Como se aprecia en la Fig. 9 la cantidad de ERO basales tras la incubación con el fluoróforo es mayor en los fibroblastos de ratones jóvenes que en los fibroblastos de ratones viejos, porque hay un mayor desplazamiento a la derecha. En el caso de los fibroblastos de ratones viejos se observa que el histograma tiene un pico mayor, debido a que los eventos están más agrupados como se ve en la Fig. 10. Cuando las células se someten a un reto oxidativo, como se ve en la Fig. 11, hay un aumento en la intensidad de fluorescencia del 47 % en las células de ratones jóvenes y del 38 % en las células de ratones viejos, dado por un desplazamiento del histograma hacia la derecha. Sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

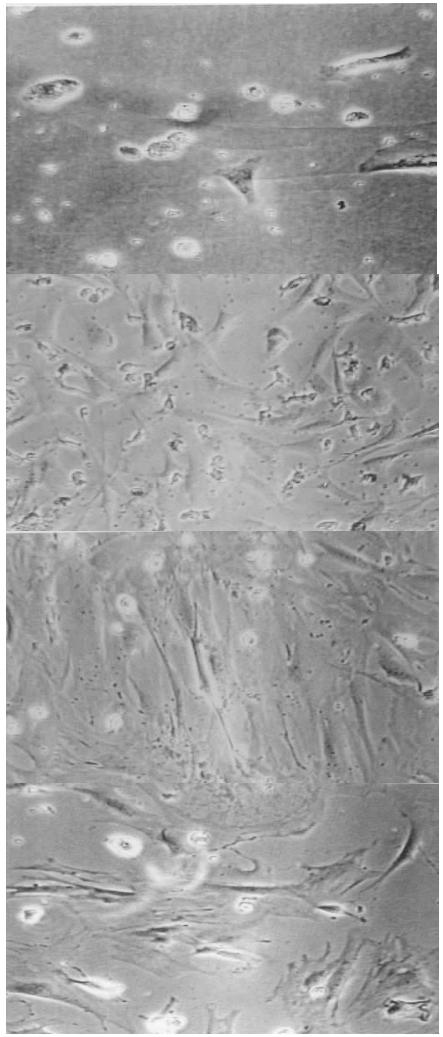
6.8 DETERMINACIÓN DE LA PROTEINA Bcl-2 POR WESTERN BLOT

Para evaluar el contenido de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos, se utilizó la técnica de inmunoanálisis Western blot (Fig. 12).

En el primer carril de izquierda a derecha se observa el contenido de Bcl-2 de la línea MCF-7 que se usó como control positivo. Es evidente que tanto en el carril de fibroblastos de ratones jóvenes como de ratones viejos se observa la presencia de la proteína de 26 KD.Se aprecia un contenido mayor de esta proteína en los fibroblastos de animales viejos en comparación de los fibroblastos de animales jóvenes.

Fig. 1 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN

Fibroblastos de ratón joven



Dia 3

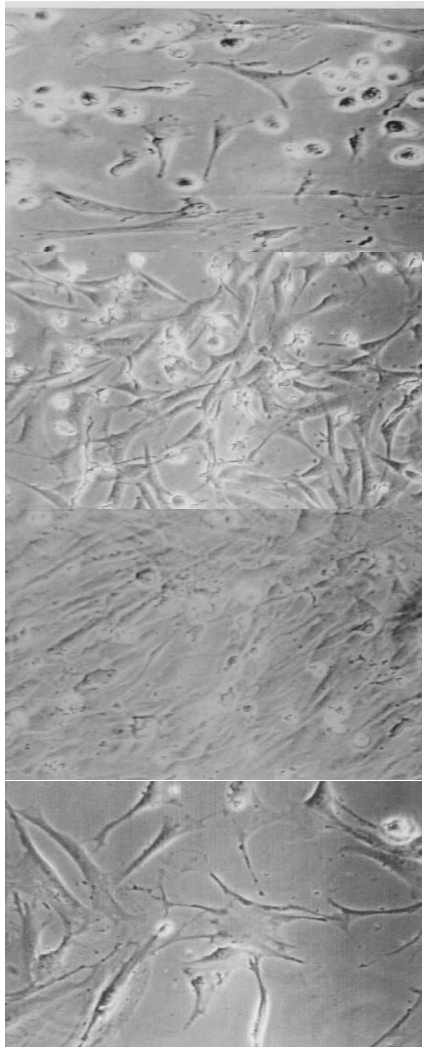
Dia 5

Dia 8

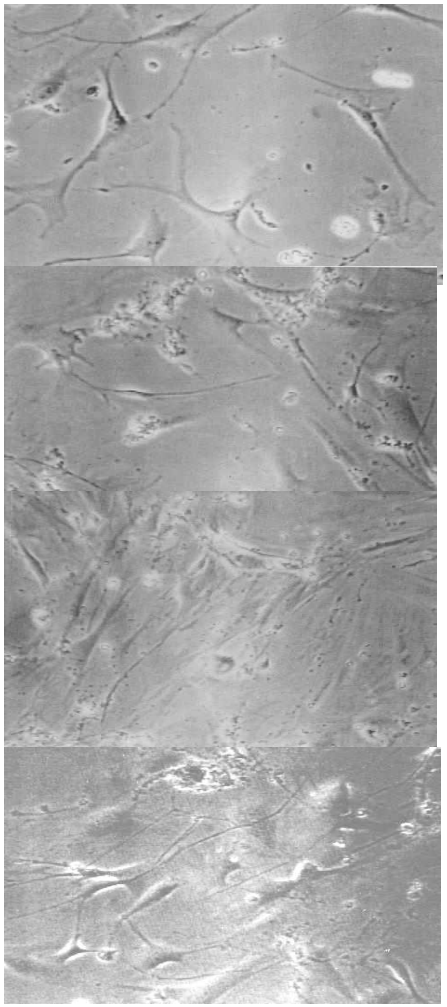
Dia 13

160x

Fibroblastos de ratón viejo



Fibroblastos de ratón joven



Dia 19

Dia 26

Dia 22

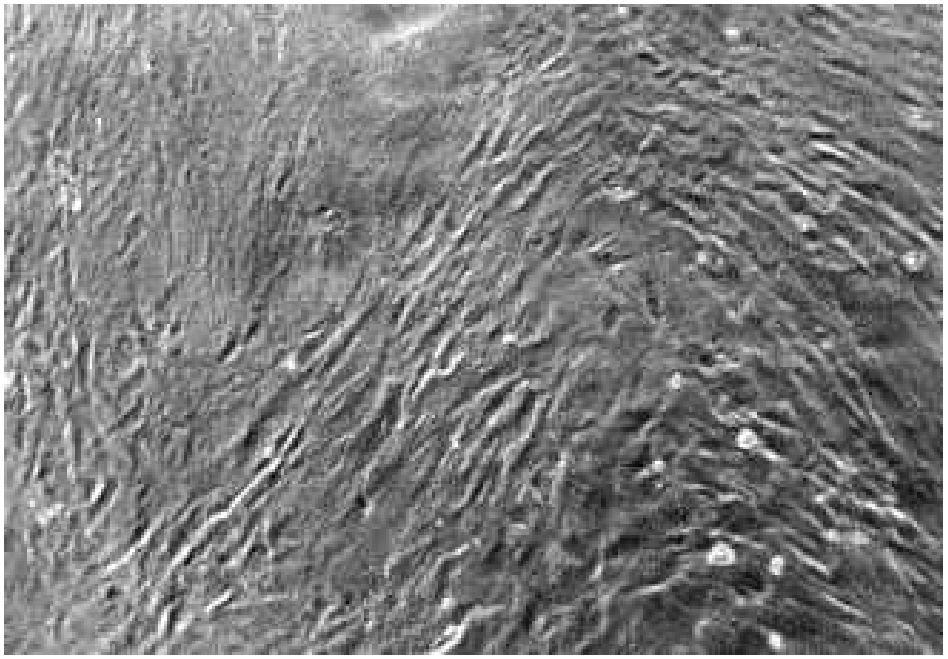
Dia 28

160x

Fibroblastos de ratón viejo

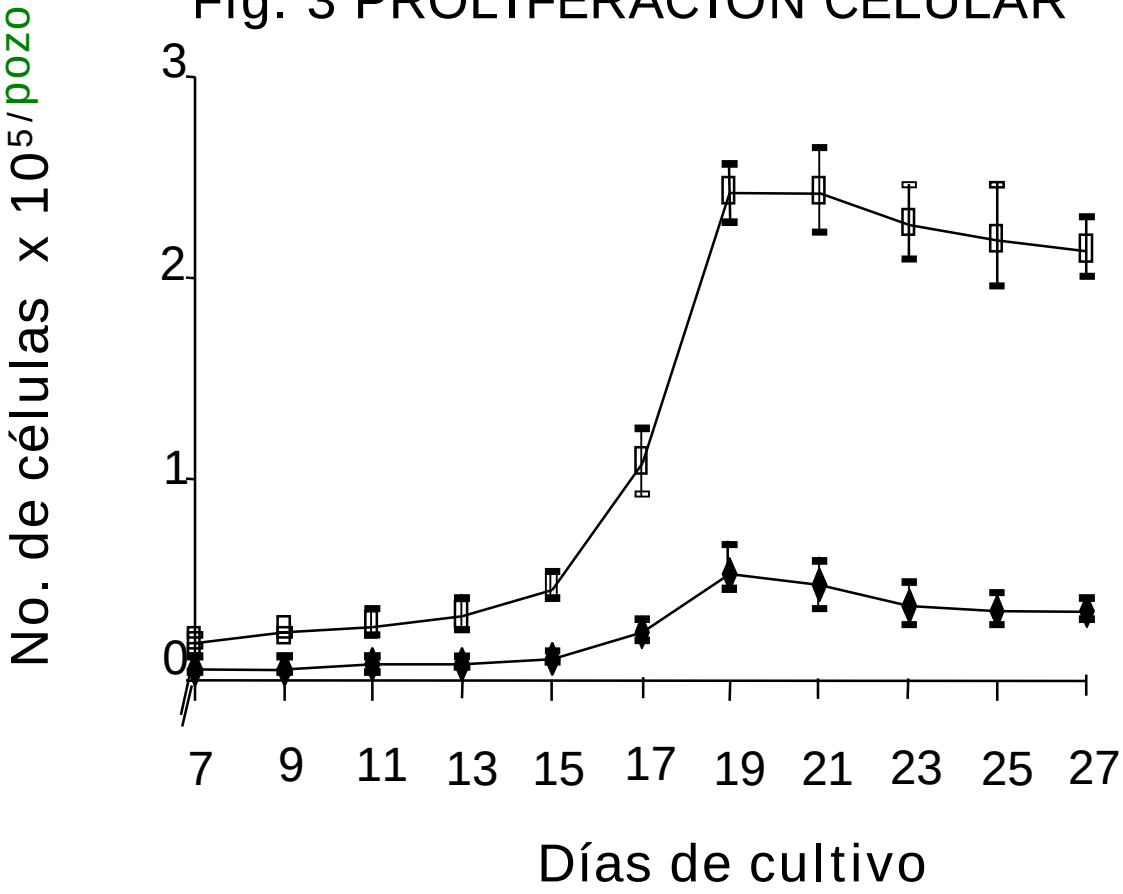


Fig. 2 CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN DE RATÓN JOVEN (16 dias de cultivo en confluencia)



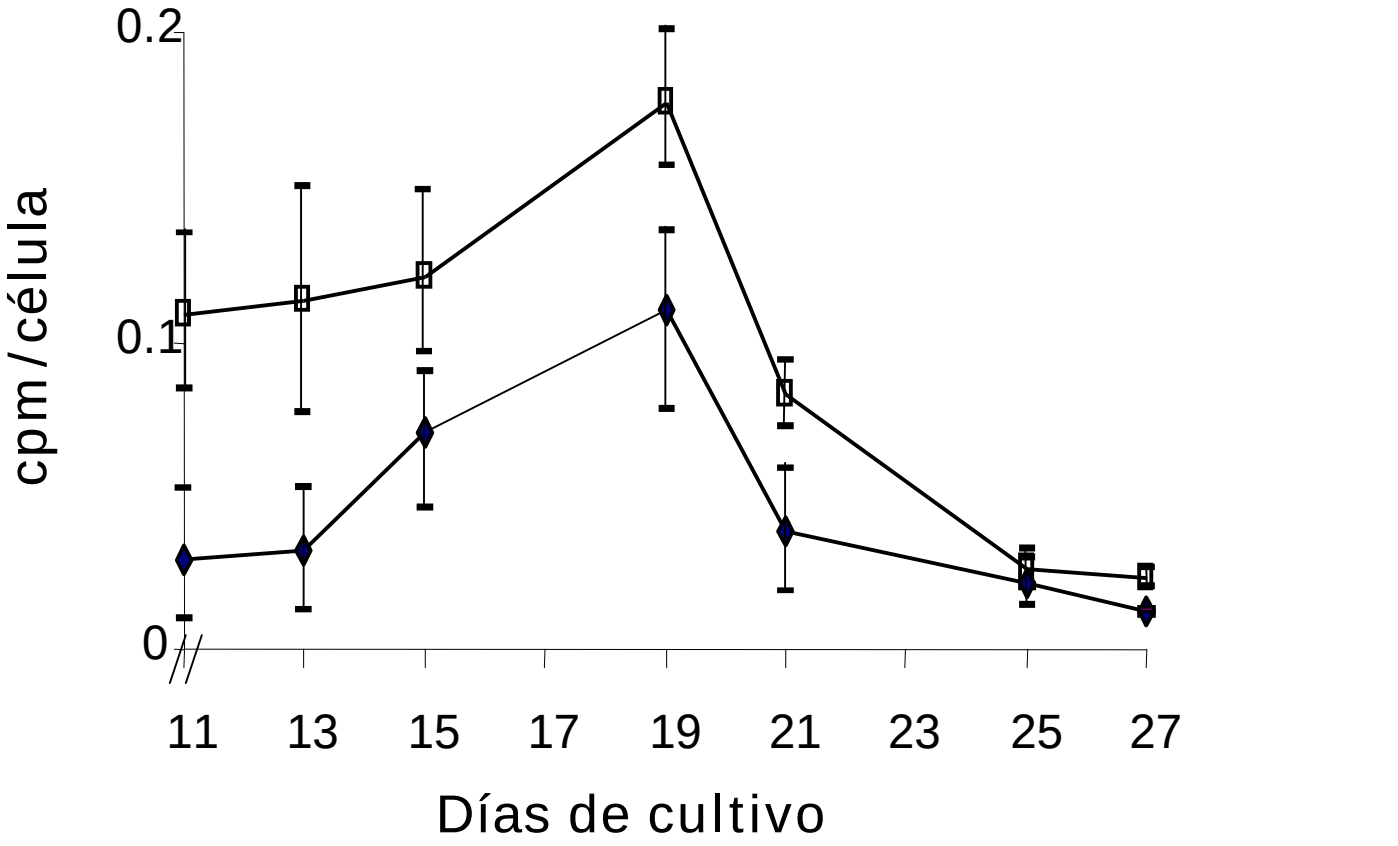
160X

Fig. 3 PROLIFERACION CELULAR



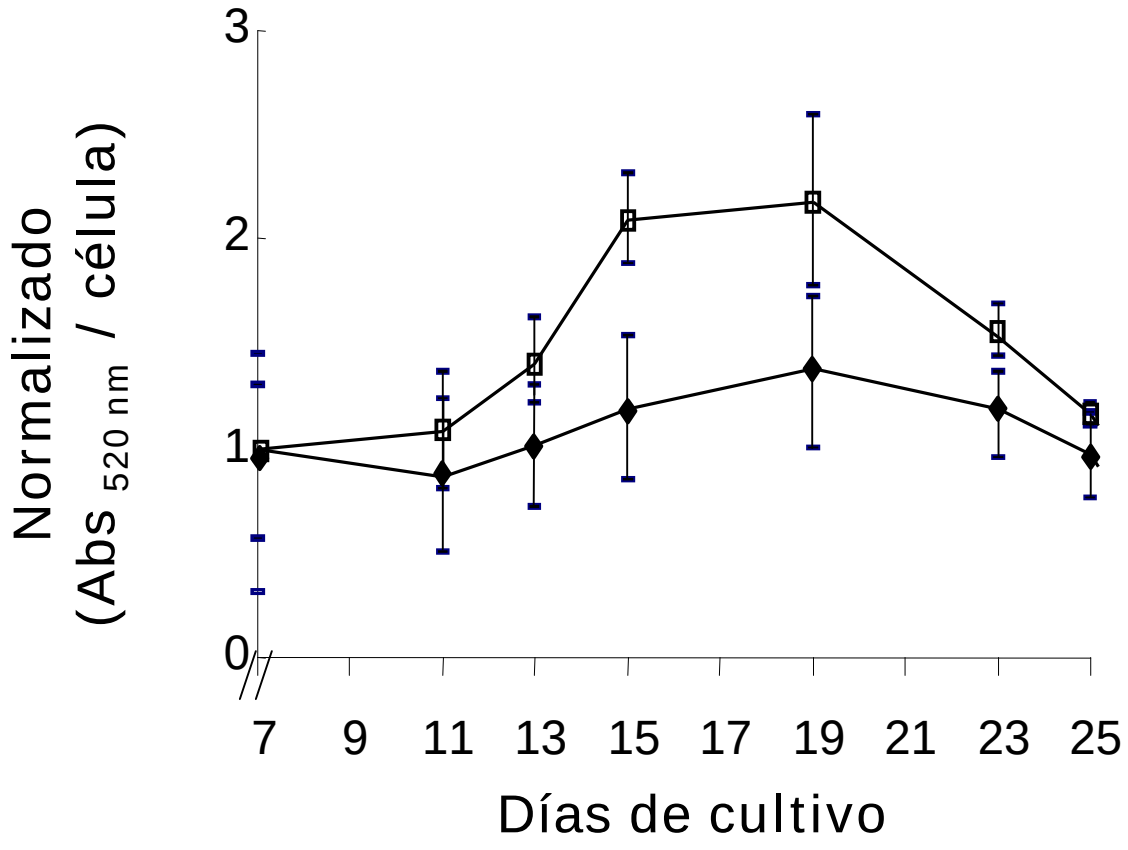
Se determinó la proliferación celular, considerando a las células viables (teñidas con azul tripano).
Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
En cada uno de los puntos existen diferencias estadísticamente significativas con $p<0.05$

Fig. 4 INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



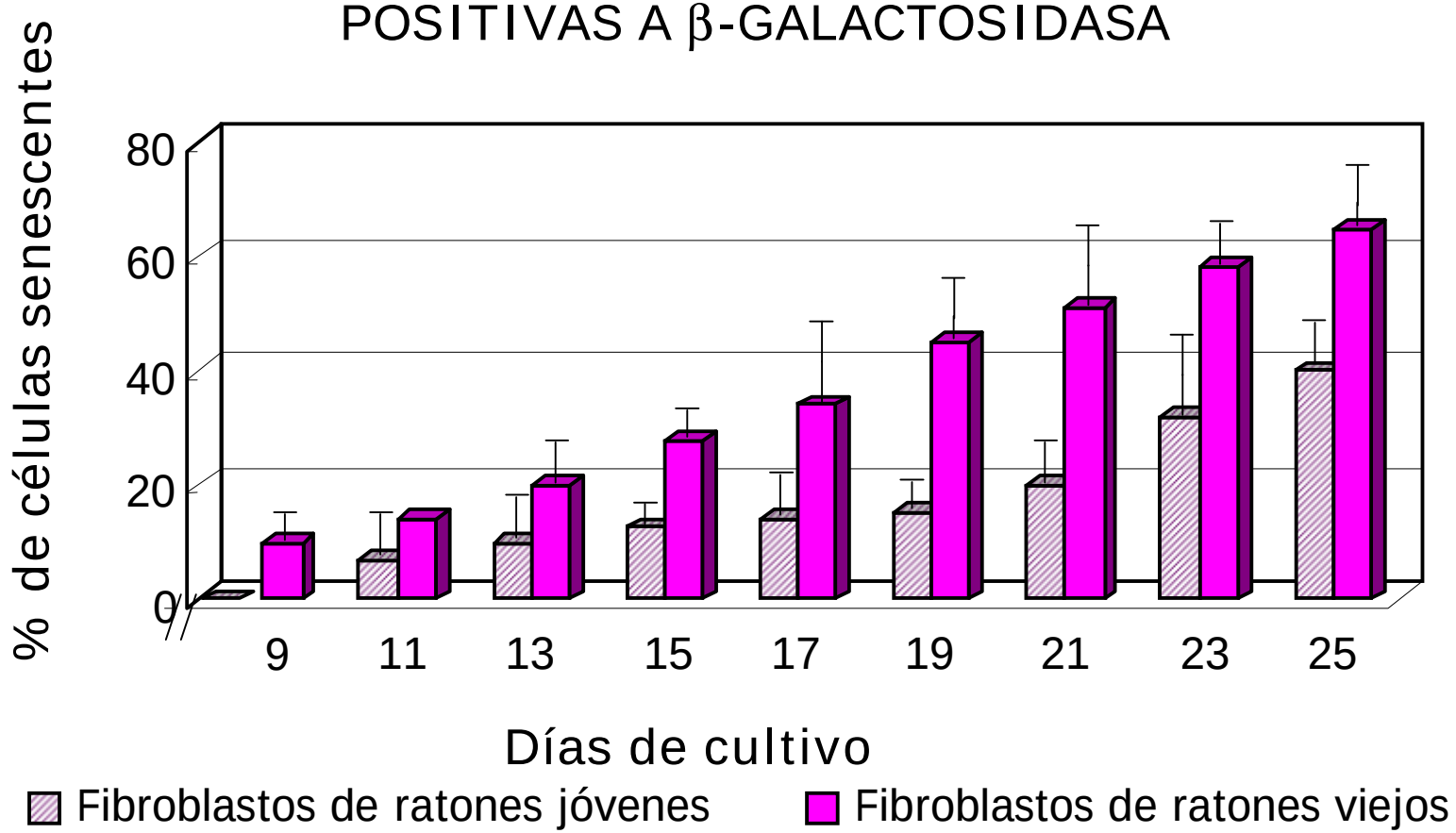
Se determinó la incorporación de timidina tritiada, después de 24 horas de incubación.
Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
En cada uno de los puntos existen diferencias estadísticamente significativas con $p<0.05$

Fig. 5 FUNCIONALIDAD CELULAR



Se determinó la funcionalidad celular, mediante el ensayo de MTT.
Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
En cada uno de los puntos existen diferencias estadísticamente significativas con $p<0.05$, excepto para la última medición.

Fig. 6 PORCENTAJE DE CÉLULAS SENESCENTES POSITIVAS A β-GALACTOSIDASA



Se determinaron las células senescentes con tinción positiva a β-galactosidasa.
Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
En cada uno de los puntos existen diferencias estadísticamente significativas con $p<0.05$

Fig. 7 CÉLULAS SENESCENTES POSITIVAS A β-GALACTOSIDASA

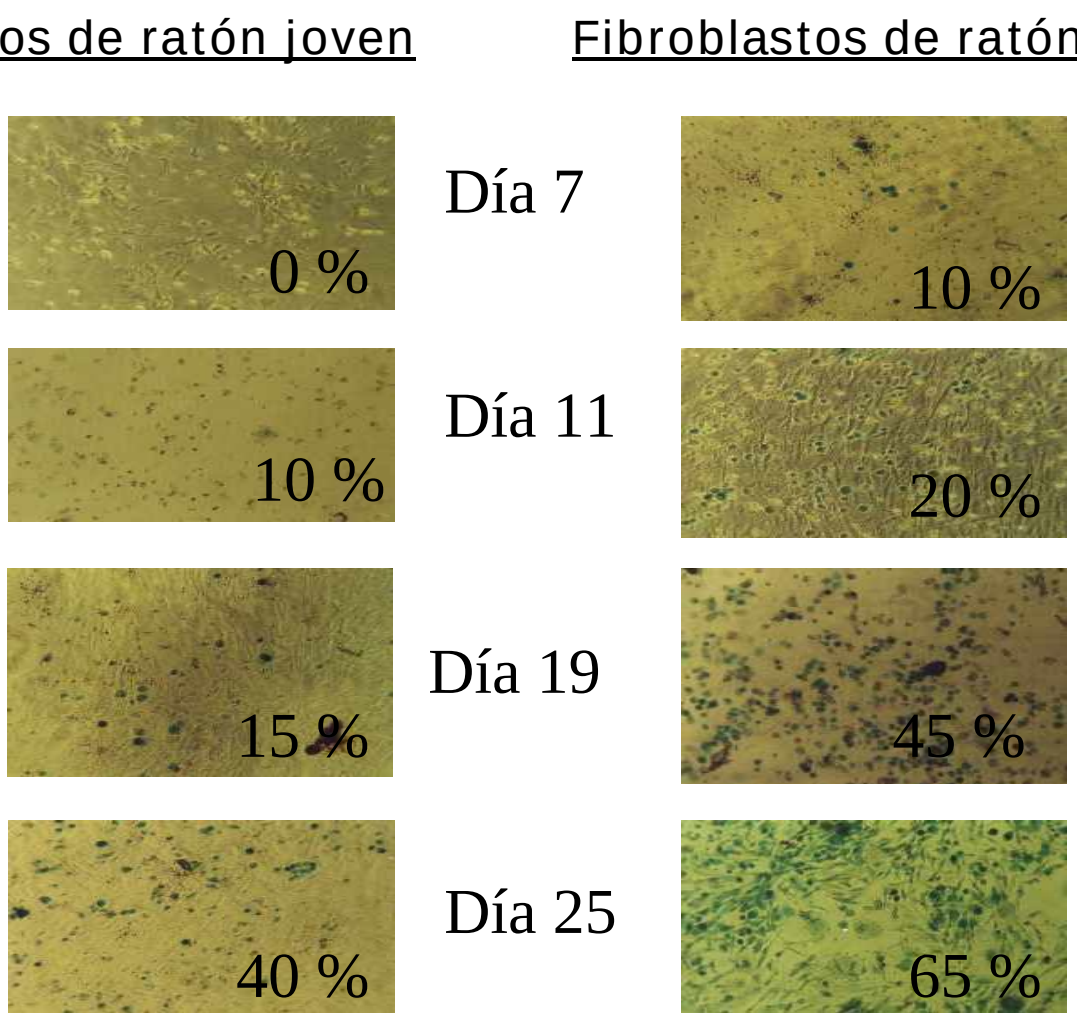
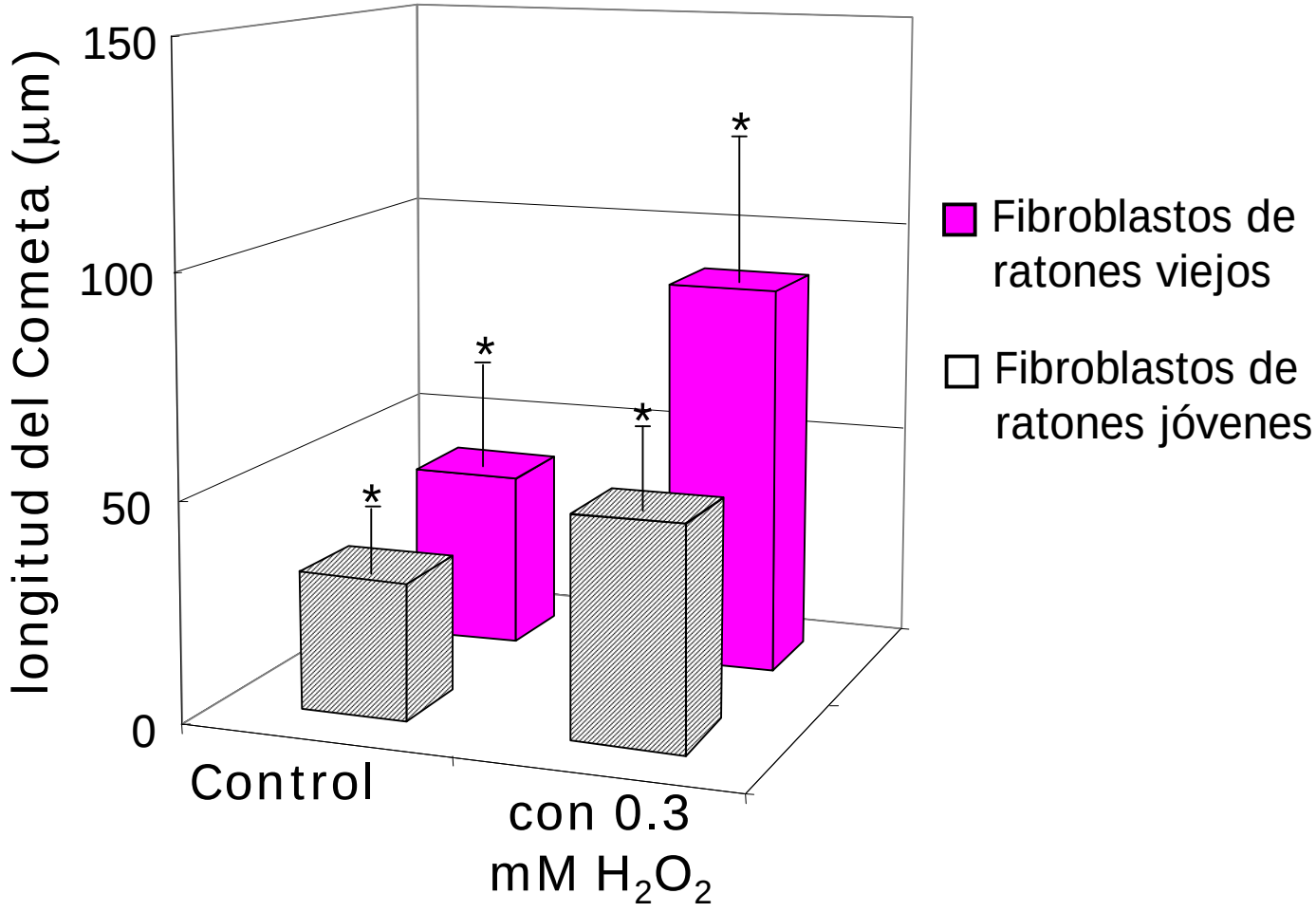
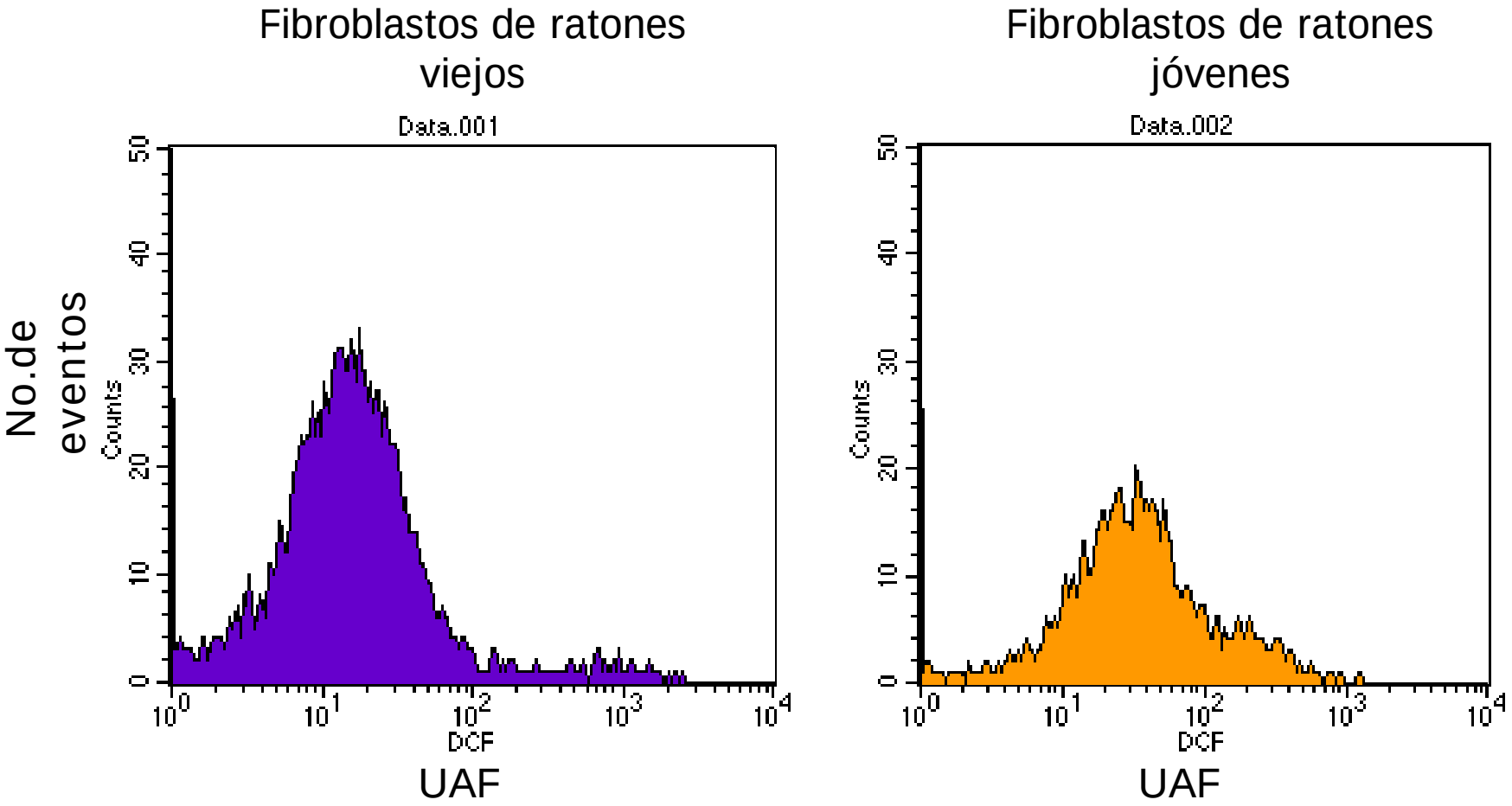


Fig. 8 DAÑO AL ADN



Se determinó el daño en el ADN mediante la electroforesis unicelular alcalina.
Se muestran los valores promedio con su desviación estándar.
En cada uno de los puntos existen diferencias estadísticamente significativas con $p<0.05$.

Fig. 9 NIVELES BASALES DE LAS ERO

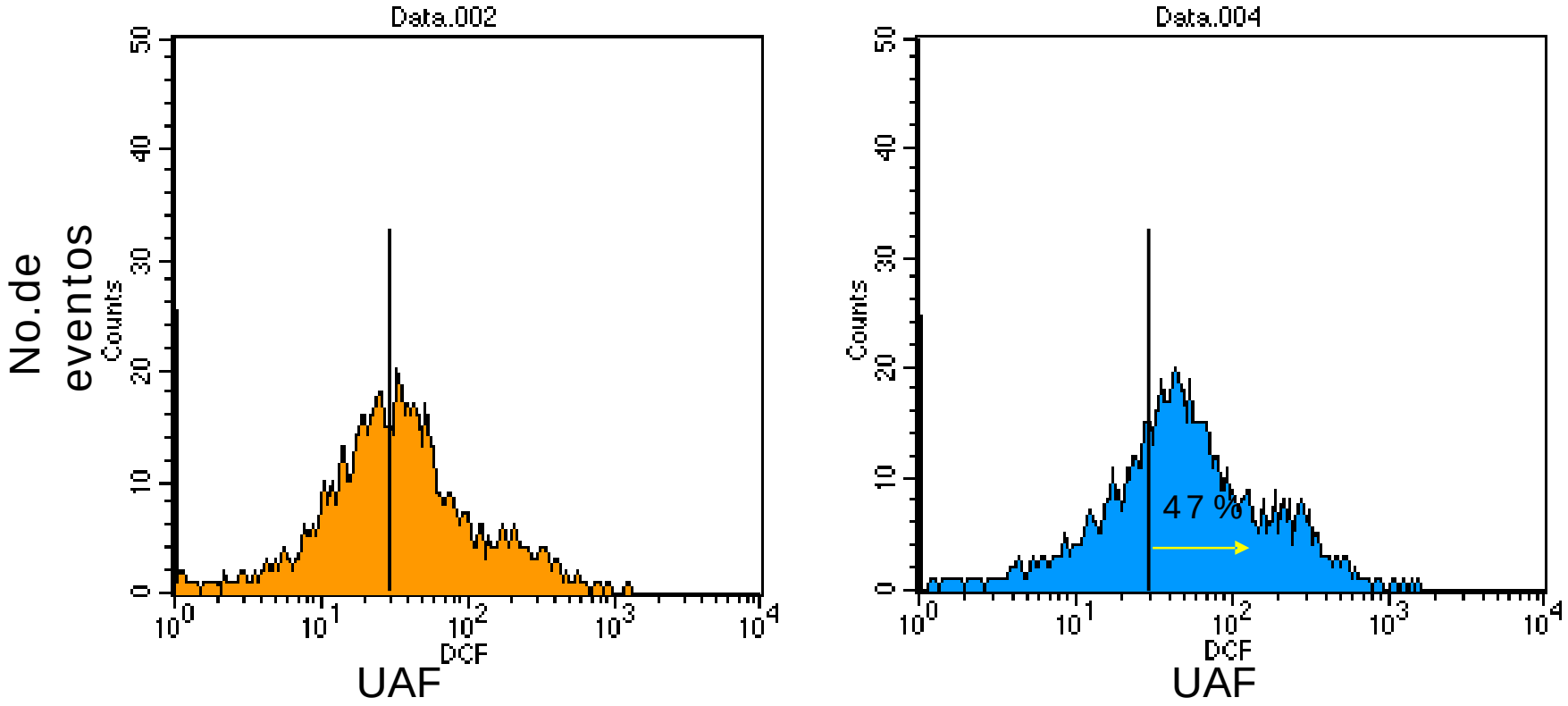


Se determinaron las ERO utilizando el fluoróforo DCF, mediante citometría de flujo.
Las gráficas son representación de 5 experimentos independientes.
Existe diferencia estadísticamente significativa con $p<0.05$

Fig. 10 NIVELES DE LAS ERO EN LOS FIBROBLASTOS DE RATONES JÓVENES

Niveles basales de ERO

Expuestas a 0.3 mM de H_2O_2 por 15 min

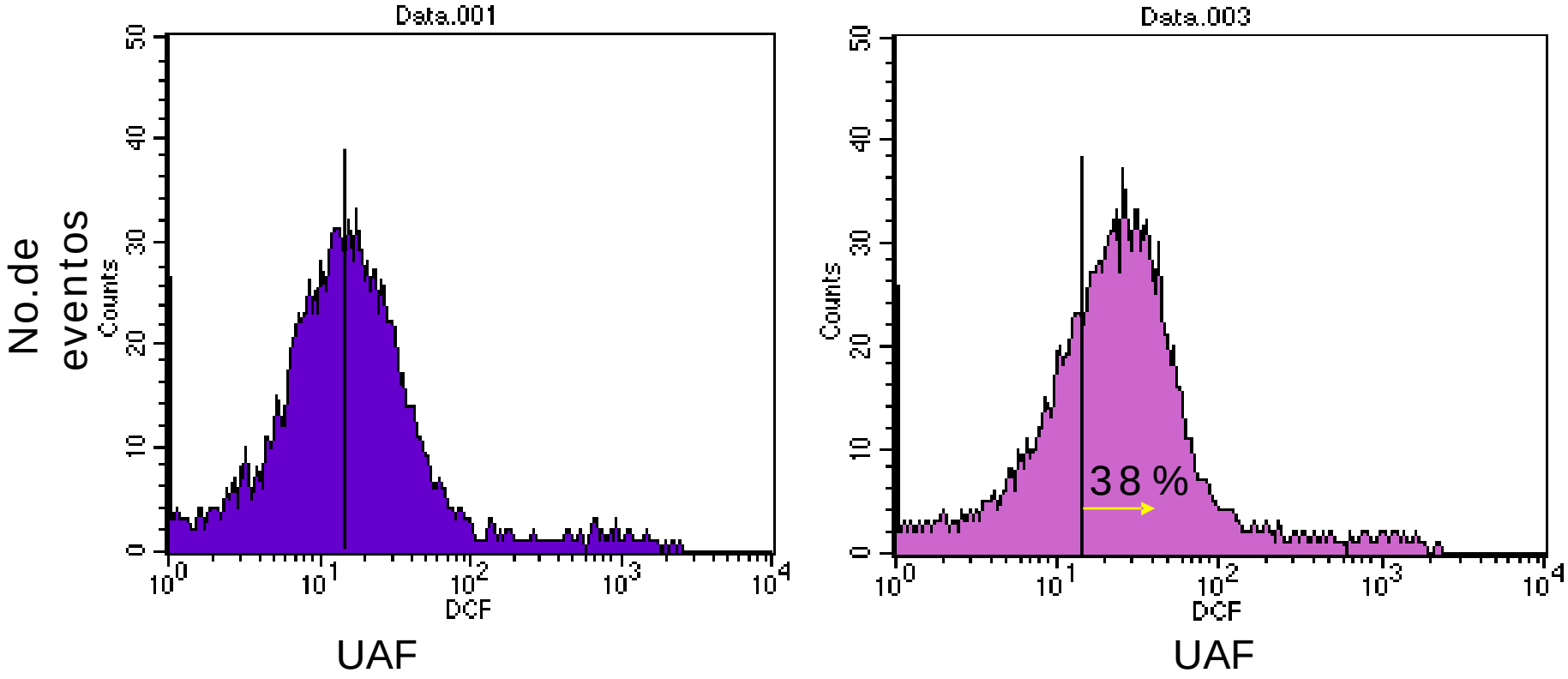


Se determinaron las ERO utilizando el fluoróforo DCF, mediante citometría de flujo.
Las gráficas son representación de 5 experimentos independientes.
Existe diferencia estadísticamente significativa con $p<0.05$

Fig. 11 NIVELES DE LAS ERO EN LOS FIBROBLASTOS DE RATONES VIEJOS

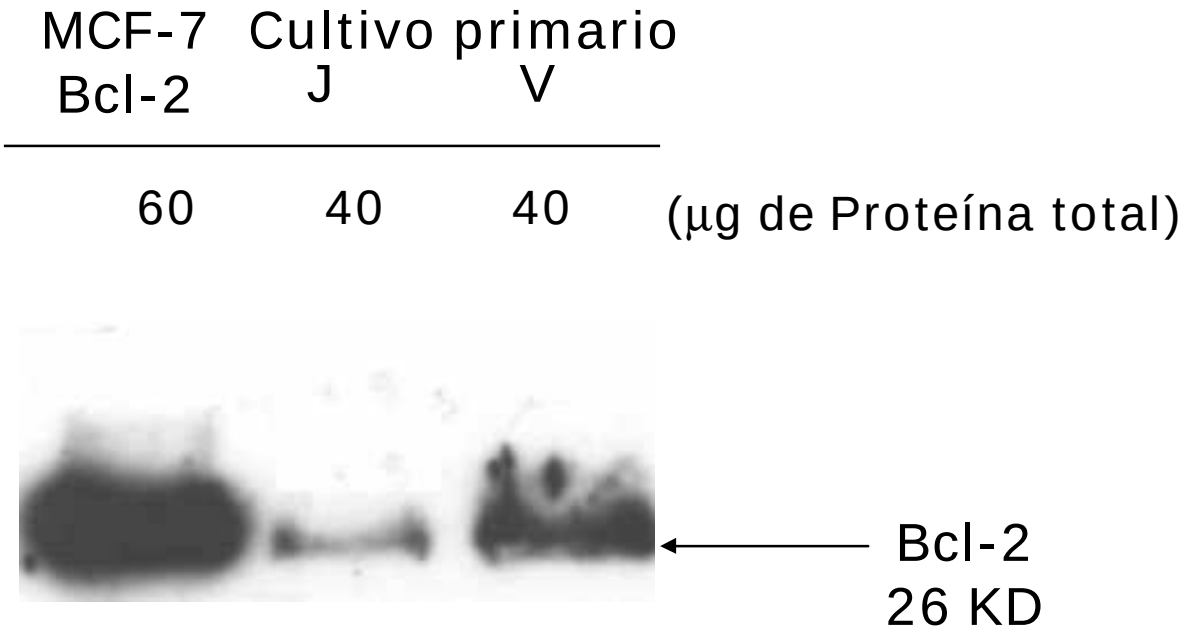
Niveles basales de ERO

Expuestas a 0.3 mM de H_2O_2 por 15 min



Se determinaron las ERO utilizando el fluoróforo DCF, mediante citometría de flujo.
Las gráficas son representación de 5 experimentos independientes.
Existe diferencia estadísticamente significativa con $p<0.05$

Fig. 12 INMUNOANALISIS DE Bcl-2



Se determinó el contenido de la proteína Bcl-2, mediante inmunoanálisis por Western-blot.
La placa es representación de 4 experimentos independientes.

7. DISCUSION

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo fue determinar el daño en el ADN generado por estrés oxidativo y relacionarlo con los parámetros de proliferación cuantificados en los cultivos primarios de fibroblastos de ratones jóvenes y viejos, para tratar de encontrar alguna correlación entre la acumulación paulatina de daño al genoma generado por las ERO, y la deficiencia funcional y proliferativa observada durante el envejecimiento. Los resultados de los ensayos cometa muestran que tanto las células de ratones jóvenes como de ratones viejos presentan un daño basal en el ADN, sin someterlas a ningún tipo de tratamiento. El daño en las células de animales viejos es 30 % mayor que en las de animales jóvenes, lo que coincide con el argumento de que el envejecimiento puede ser consecuencia de la acumulación de daño en el ADN (Harman, 1956, Bohr et al., 1998). Una de las principales causas que puede explicar ese daño es que debido al metabolismo aeróbico, las células continuamente están expuestas a subproductos del metabolismo celular como lo son las especies reactivas de oxigeno. A pesar de que en las células existen sistemas y moléculas antioxidantes, los radicales libres reaccionan con las biomoléculas y causan daño en el ADN. Así mismo, las ERO son capaces de dañar las estructuras de algunos organelos como la mitocondria, generando un deterioro en su función, y como consecuencia aumentando la producción de superóxido y peróxido de hidrógeno. Estos incrementos contribuyen a generar más deterioro en la célula ocasionando un círculo vicioso. El daño en el ADN puede manifestarse como rompimientos de las hebras sencillas o dobles,

modificación de las bases (Cadet et al., 2000) y desarreglo de la heterocromatina (Collins et al., 1997).

Cuando estos mismos cultivos se sometieron a estrés oxidativo, las determinaciones de los ensayos cometa revelaron un aumento en el daño al ADN debido al tratamiento con H_2O_2. Se encontró un aumento del 45 y del 142 % de daño en las células provenientes de ratones jóvenes y de viejos respectivamente. Los resultados apoyan datos previos de la literatura donde se ha reportado que los organismos jóvenes poseen un mayor número o más eficientes mecanismos de protección contra las ERO, en comparación de los de organismos viejos que tienen disminuidas las actividades de las enzimas atrapadoras de radicales libres como la catalasa y la glutatión reductasa (Mo, 1995).

No es posible asegurar el tipo de daño que se genera en el ADN y que se pone de manifiesto en el ensayo cometa, sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la sugerencia de Collins y colaboradores (1997). Ellos proponen que la técnica del cometa muestra principalmente un desarreglo en la estructura de la heterocromatina y no únicamente rompimientos directos en el ADN como proponían Tice y colaboradores en un inicio (Tice, 1994).

El hecho de que los fibroblastos provenientes de animales viejos, presenten 30 % mas de daño basal que los fibroblastos de ratones jóvenes, sugiere que es poco probable que este porcentaje corresponda a los rompimientos de cadenas sencillas, ya ante esas condiciones experimentales, las células se encontraban vivas y en condiciones estables, como lo muestran los parámetros de

funcionalidad. En cuanto al tratamiento frente al reto de estrés oxidativo, pasados los 30 min, las células aún se encontraban en buen estado debido a que la concentración de peróxido de hidrogeno que se utilizó se había establecido previamente como una concentración no letal. Un daño tan grande como del 42% para las células de animales jóvenes y del 142% para las células de animales viejos con respecto a sus controles, no puede ser explicado únicamente por rompimientos de cadena sencilla. Con estos datos, hubiera sido imposible observar los nucleoides al microscopio además de que las células no se encontrarían vivas. Así mismo se sabe (Chen, 1995), que las células envejecidas poseen menor cantidad de cromatina condensada y el ADN menos protegido que puede ser fácilmente atacado por las ERO. Como consecuencia, existen modificaciones y desarreglos en la condensación de la cromatina (Collins et al., 1997).

Por otro lado, cuando se determinaron las ERO mediante citometría de flujo, se encontraron mayores niveles de especies reactivas de oxígeno en los fibroblastos de ratones jóvenes en comparación con los fibroblastos de ratones viejos. Lo que sugiere que los fibroblastos de animales jóvenes poseen una actividad metabólica mayor de la cadena respiratoria mitocondrial con producción de ERO más elevada (Holmes et al., 1992). Cuando los cultivos se sometieron a un reto agudo con H_2O_2 se encontró que las ERO estaban aumentadas en ambos cultivos, en comparación de sus controles respectivos. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las células de ratones jóvenes y las células de

ratones viejos. Lo anterior indica que posiblemente, la respuesta primaria de producción de ERO ante un reto oxidativo es igual en las células de animales jóvenes y viejos. Sin embargo, al correlacionar estos resultados con los de daño en el ADN, que muestran la existencia de un mayor daño en los fibroblastos de animales viejos (a pesar de haber sido expuestos ambos cultivos a la misma concentración de peróxido de hidrógeno), es posible pensar que en los cultivos de animales jóvenes existe una mejor respuesta compensatoria ante el estrés oxidativo que en las células de animales viejos. Además de que un genoma cuya estructura heterocromatínica se encuentra alterada, es más susceptible al daño, en especial al daño por estrés oxidativo. De modo que es posible pensar que la diferencia en el daño que presentan los fibroblastos de ratones jóvenes y de ratones viejos ante un mismo nivel de estrés oxidativo, pudiera estar dada por una mayor susceptibilidad de estos últimos debida a una descondensación previa en la cromatina. Este dato es muy importante ya que se ha reportado (Faragher (2000), que el daño oxidativo en el ADN puede desencadenar señales que activen la expresión de genes encargados de regular negativamente el crecimiento celular.

Al determinar la incorporación de timidina, se encontró que los fibroblastos de ratones jóvenes tuvieron una mayor incorporación del nucleósido con una diferencia máxima del 30 % en comparación con las células de ratones viejos. Posteriormente ambos cultivos mostraron un decremento paulatino en la incorporación de timidina tritiada, que indico la disminución en la duplicación

celular tanto en las células de ratones jóvenes como de ratones viejos. Con respecto a la proliferación, en los cultivos se observó un comportamiento de crecimiento in vitro, con un número finito de duplicación celular como lo ha refiere Hayflick (1961) en el que los fibroblastos de ratones jóvenes presentaron una proliferación celular más acentuada y vigorosa, a diferencia de los fibroblastos de ratones viejos. La funcionalidad celular de los cultivos tras su obtención in vitro, fue estable y a medida que la poblaciones continuaron creciendo, su funcionalidad mejoró. En el momento de máxima proliferación, las células de ratones jóvenes presentaron un estado funcional 30 % mayor que las células de animales viejos. Tras ese periodo de proliferación vigorosa y de aumento de la funcionalidad, ambos cultivos mostraron una disminución gradual de estos parámetros al final de los mismos. El hecho de que persista un número constante de células en la población, pero que no se dupliquen (no incorporan timidina) y estén deterioradas funcionalmente, indica que están en senscencia replicativa. Este estado fisiológico se caracteriza por presentar inhibición en la proliferación celular aún ante estímulos mitogénicos, morfología aplanada y más grande, resistencia a la muerte por estímulos apoptóticos y cambios en la funcionalidad celular. Los cambios en la funcionalidad pueden ser ocasionados por una alteración en la regulación transcripcional, pues debido al daño existente en el ADN y el desarreglo en la cromatina (Chen et al., 1995), se sobreexpresan y acumulan algunas proteínas que normalmente la célula no produce. Una de estas proteínas que se producen de manera desregulada es la enzima β-galactosidasa, que precisamente se ha usado

como marcador de la senesencia replicativa (Dimri et al., 1995). Al determinar la presencia de esta proteína en los cultivos, se encontró que los fibroblastos provenientes de ratones viejos presentaron un 10 % de células senescentes desde el inicio del cultivo. El porcentaje de células senescentes fue aumentando considerablemente a lo largo del tiempo del cultivo tanto en fibroblastos de ratones jóvenes como viejos, sin embargo los niveles del marcador se mostraron siempre mas elevados que en las células de ratones viejos. Estos datos se correlacionan con la cantidad de daño basal encontrado en el ADN de células de ratones viejos. Al tener una alteración en la estructura de la cromatina, hace posible que se exprese más enzima β–galactosidasa, así como otras proteínas que pudieran ser capaces de contribuir al deterioro funcional y al fenotipo senescente. El incremento en el número de células senescentes en ambos cultivos, coincide con la disminución en la funcionalidad determinada por el ensayo MTT, lo que apoya la idea de que las células senescentes contribuyen al envejecimiento.

Al determinar la presencia de la molécula antiapoptótica Bcl-2 en los cultivos primarios, se encontró un aumento considerable en el contenido de la proteína en las células de animales viejos en comparación con las células provenientes de animales jóvenes. Este resultado coincide por el reportado por Longo et al. (1997), Schindowski et al. (2000), y Kaufmann et al. (2001). Esta presencia puede explicarse que debido a la acumulación de daño en el ADN y el desarreglo de la cromatina, se liberan factores de transcripción que inducen las señales para la

sobreexpresión de Bcl-2. Otra explicación pudiera ser que las concentraciones de ERO en las células indujeran el aumento en los niveles de Bcl-2 como una protección antioxidante, según se ha reportado con anterioridad (Hockenbery 1993, Myers et al. 1995, Bruce-Keller et al. 1998). Por último, también se ha sugerido que el mismo daño sobre el ADN pudiera inducir la sobreexpresión de Bcl-2 cuya función en la célula podría ser de reparación (Deng et al., 1999). Aún y cuando no se ha determinado la razón por la cual Bcl-2 se encuentra elevada en las células de organismos viejos, Es lógico pensar que posiblemente la presencia elevada de esta molécula, evita que las células mueran por apoptosis a pesar de los niveles de daño en su ADN. De igual manera esto es interesante ya una de las características de las células que se encuentran en senescencia replicativa es que no son sensibles a estímulos apoptóticos (Campisi, 1997).

A manera de conclusión puede decirse que los datos de este trabajo apoyan tanto las hipótesis del envejecimiento por radicales libres (Harman, 1956) como la del antagonismo pleiotrópico (Campisi, 1997). La primera menciona que el envejecimiento es ocasionado por la acumulación de daño en el ADN por estrés oxidativo, a lo largo de la vida de un organismo. Estos daños favorecen las expresiones alteradas en el ADN que conducen a la pérdida de la funcionalidad celular y a la muerte. La hipótesis del antagonismo pleiotropico propone que la senescencia replicativa es un mecanismo de protección en las células eucariotas, que evita el desarrollo de cáncer en etapas tempranas de la vida. Sin embargo, por

el hecho de que las células senescentes presentan un fenotipo alterado y resisten a la muerte por apoptosis, son las responsables del deterioro funcional observado en los organismos envejecidos.

Los resultados de este trabajo confirman que las células senescentes se encuentran considerablemente aumentadas en los organismos viejos, y al final de la vida de los cultivos de fibroblastos de animales jóvenes y de animales viejos in vitro. Dichos cultivos presentan una menor incorporación de timidina tritiada, una inhibición en la proliferación y una disminución en la funcionalidad celular. Todos estos parámetros se relacionan de alguna forma con la presencia de ERO y con mayor daño en el ADN. Si las células a pesar de presentar todas estas características persisten, es que poseen mecanismos que les permiten seguir viviendo, uno de ellos pudiera ser el aumento del contenido endógeno de la proteína antiapoptótica Bcl-2, con una posible función antioxidante o de protección por daño oxidativo.

Aún quedan muchas dudas por resolver con respecto al funcionamiento de Bcl-2 y su protección contra es estrés oxidativo, y muchas más dudas e incertidumbres para llegar a entender un fenómeno tan complejo, y que hasta ahora sigue y seguirá siendo inevitable, como es el envejecimiento.

8. REFERENCIAS

1. Ames, B.M, Signage, M.K, Hagen, T.M: (1990) Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:7915-7922.
2. Arakaki N., Kahijara, T., Arakaki, T., Kazi, J., Nakashima, H., Dahikuhara, Y. (1999) Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor.J Biol Chem. 1999 May 7;274(19):13541-6.
3. Bruce-Keller, A., Begley, J., Fu, W., Butterfield, A., Bredesen, D., Hutchins, J., Hensley, K., Mattson, M. (1998) Bcl-2 protects isolated plasma and mitochondrial membranes against lipid peroxidation induced by hidrogen peroxide an amiloyd β -peptide. J. Neurochem. 70: 31-39.
4. Cadet, J., Ordonez, S., Ordonez, J. (1997) Methamphetamine induces apoptosis in immortalized Neural cells: protection by the proto-oncogene, bcl-2. SYNAPSE 25: 176-184.
5. Cai, J., Jones, D. (1998) Superoxide in apoptosis. J. Biol. Chem. 273(19): 11401- 11404.
6. Campisi, J. (2000) Cancer, aging and cellular senescence. In vivo 14:183-188.
7. Campisi, J. (1997) Aging and cancer: the double-edge sword of replicative senescence. J Am Geriatr Soc 45:482-488.

8. Carrel, A. (1912) On the permanent life of tissues outside of the organism. J Ep Med 15:516-528.
9. Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S., Chakraborti, S. (1999) Oxidant, mitochondrial and calcium: an overview Cell Sign. 11(2): 77-85.
10. Chen, Q.M., Prowse, K.R., Tu, V.C., Purdom, S., Linskens, M. H. (2001) Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. Exp Cell Res 265(2):294-303.
11. Chen, Q.M., Liu, J., Merret, J.B. (2000) Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. Biochem J 347:543-551.
12. Chen, Q., Fisher, A., Reagan, J.D., Yan, L., Ames, B. N. (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblasts cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4337-4341.
13. Cook, S., Sudgen, P., Clerk, A. (1999) Regulation of Bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocites. Circ. Res. 85: 940- 949.
14. Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 17.
15. Chao, D., Korsmeyer, S. (1998) BCL-2 FAMILY: regulators of cell death. Annu. Rev. Immunol. 16: 395-419.
16. Degli Esposti, M., Hatzinisiriou, I., Mclennan, H. (1999) Bcl-2 and mitochondrial oxigen radicals. J. Biol. Chem. 274(42): 29831- 29837.

17. Denizot, F. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. J. Immunol. Meth.89: 271-277

18. Deng, G., Su, J., Ivins, K., Van Houten, B., Cotman, C. (1999) Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. Exp. Neurol. 159: 309- 318.

19. Doyle, A., Griffiths, J.S., Newell, D.G., (1998), Cell & Tissue, Culture: Laboratory & Procedures, Ed. John Wiley & Sons, New York, 4B:7.

20. Domen, J., Gandy, K., Weissman, I. (1998) Systemic Overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. Blood 91(/): 2272- 2282.

21. Esteve, J., Mompo, J., Garcia de la Asunción, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Viña, J., Pallardo, F. (1999) Oxidative damage to mitochdrial DNA and glutathione oxidation in apaoptosis: studies in vivo and in vitro. FASEB J. 13: 1055- 1064.

22. Faragher, R.G. (2000) Cell senescence and human aging: where´s the link? Biochem Soc Trans 28(2):221-6.

23. Faragher, R., Kipling, D. (1998) How might replicative senescence contribute to human ageing? BioEssays 20:985-991.

24. Hayflick, L., Moorehead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res. 25: 585-621.

25. Fernández.Checa, J. et. al. (1997) GSH Transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect; Am. Physiol. Soc.:G7-G17
26. Fraga,C. G.,Shinenaga, M.K, Park, J.W., Degan, P., Ames, B.N. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87:4533-4537.
27. Freshney, I.R. (1984) Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique, Ed. Alan R. Liss, Inc, New York.
28. Halliwell, B. 1991. How to characterize a biological antioxidant. Free Radic Res Commun;9(1):1-32. Review.
29. Hartman, D. (1954) Ageing: A theory based on free radical and radiation chemistry J. Gerontol. 11:298-300.
30. Hayakawa, M., Torii, K., Sugiyama, S., Tanaka, M., Ozawa, T. (1991) Biochem Biophys Res Commun. 179:1023-1029.
31. Hochman, A., Sternin, H., Korsmeyer, S., Ziv, I., Melamed, E., Offen, D. (1998) Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. J. Neurochem. 71: 741- 748.
32. Hockenbery, D.M., Oltavi, Z., Ying, X., Milliman, C., Korsmeyer, S. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell 75:241-251.
33. Kane, D., Safarian, T., Anton, R., Hahn, R., Gralla, E., Valentine, J., Ord, T., Bredesen, D. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. Science 262:1274- 1277.

34. Kirkwood, T.B. (1989) Mutat Res. 219:1-7.

35. Korsmeyer S. J., Yin X. M., Oltvai, Z. N., Veis-Novack D. J., Linette, G. P. (1995) Biochim Biophys Acta 1271, 63-66.

36. Laderman, K.A. (1996) Aging-dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts transferred into mtDNA-less cells J Biol Chem 271(27):15891-15897.

37. liu, Y., Hernandez, A., Shibata, D., Cortopassi, G. (1994) BCL-2 translocation frequency rises with age in human. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8910-8914.

38. Longo, V., Ellerby, L., Bredesen, D., Valentine, J., Gralla, E. (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. J. Cell Biol. 137(7): 1581- 1588.

39. Longoni, B., Boschi, E., Demontis, G., Marchiafava, L., Mosca, F. (1999) Regulation of Bcl-2 protein expression during oxidative stress in neuronal and in endothelial cells Biochem. Bophys. Res. Comm. 260: 522-526.

40. McDonell, T., Deane, N., Platt, F., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J., Korsmeyer, S. (1989) bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demostrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation Cell. 57: 79-88.

41. Marnett L.J., Hurd, H., Hollstein, M.C., Esterbauer, D.E., Ames, B.N. (1985) Mutat Res. 148:25-34.

42. Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koomtz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C., Beal, M.F. (1993) Ann Neurol 34:609-616.

43. Myers, K., Fiskum, G., Liu, Y., Siemmens, J., Bredesen, D., Murphy, A. (1995) Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycmia-induced lipid oxidation, mitocondrial injury, and loss of viability. J. Neurochem. 65: 2432-2440.
44. Richter C., Scheveizer M., Cossarizza A., Franchesi, C. (1996) FEBBS Lett 378, 107-110.
45. Rikans, L.E., Hornbrook, K.R. (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging Biochim Biophys Acta 1362:116-127.
46. Roberfroid, M.B., Buc, C.P.(1995)Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
47. Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. PNAS 95(4): 1455-1459.
48. Satoh, T., Yamagata, T., Ishikawa, Y., Yamada, M., Uchiyama, Y., Hatanaka, H. (1999) Regulation of reactive oxyg species by nerve growth factor but not Bcl-2 as a novel mechanism of protection of PC12 cells from superoxide anion-induced death. J. Biochem. 125: 952-959.
49. Shimohama, S., Fujimoto, S., Sumida, Y., Tanino, H. (1998) Differential expressing of rat Bcl-2 family proteins in development and aging.
50. Shoffner, J.M. (1993) Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. Genomics 17:171-184.

51. Stadtman, E.R.(1992) Science 257:1220-1224.

52. Steinman, H. (1993) The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. J. Biol. Chem. 270(8):3487-3490.

53. Suscchek, Ch., Krishel, V., Bruch-Gerharz, D., Berendji, D., Krutmann, J. (1999) Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 ip-regulation. J. Biol. Chem. 274(10): 6130- 6137.

54. Tice, R.R. (1994) The single cell gel/comet assay: a microgel electroforetic technique for the detection of ADN damage and repair in individual cells. Mutat. Res. 271: 243-252.

55. Veis, D., Sorenson, Ch., Shutter, J., Korsmeyer, S. (1993) Bcl-2-t mice demostrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. Cell 75: 229-240.

56. Wallace, D.C., Ye, J.H., Neckelman, S.N., Singh, G., Webster, K.A., Greenberg, B.D. (1987) Curr Genet 12:81-90.

57. Wiseman, H., Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer Biochem J 313:17-29.

58. Yang, L., Matthews, R., Schulz, B., Klockgether, T., Liao, A., Martinou, J., Penney, J., Hyman, B., Beal, F. (1998) 1- methyl-4 –phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyride neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. J. Neurosc. 18(29): 8145- 8152.

59. Yau-Huei, W. (1998 Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging.) Proc Soc Exp Biol Med 217(1):53-63.