



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Posgrado en Biología Experimental

**Metabolismo energético, estado redox y parámetros de las células
MCF10A inducidas a senescencia por estrés oxidante**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Biól. Angélica Alejandra Aquino Cruz

Comité Tutorial:

Director: **Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero**

Asesora interna: **Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Asesora externa: **Dra. Rebeca López Marure**

México, Ciudad de México.

Diciembre del 2018

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de 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, número de proyecto 255591.

Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: 615235. Número de becario: 615235 CVU: 615235.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00198

Matrícula: 2163801903

METABOLISMO ENERGÉTICO,
ESTADO REDOX Y PARÁMETROS DE
LAS CÉLULAS MCF10A INDUCIDAS
A SENESCENCIA POR ESTRÉS
OXIDANTE.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 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
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ
DRA. ERIKA OLIVIA GOMEZ GONZALEZ
DRA. REBECA LOPEZ MARURE



ANGELICA ALEJANDRA AQUINO CRUZ
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: ANGELICA ALEJANDRA AQUINO CRUZ

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

REVISÓ

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

VOCAL

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

VOCAL

DRA. ERIKA OLIVIA GOMEZ GONZALEZ

SECRETARIA

DRA. REBECA LOPEZ MARURE

Miembros del Comité Tutorial

Directora: Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero

Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México. México.

Asesora interna: Dra. Mina Königsberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Ciudad de México. México.

Asesora externa: Dra. Rebeca López Marure

Departamento de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Ciudad de México. México.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero por permitirme desarrollar este proyecto y por su apoyo.

A la Dra. Mina Konigsberg por brindarme su apoyo y ser parte de este proyecto.

A la Dra. Rebeca López Marure por recibirme en su laboratorio, sin ello este proyecto no se hubiera realizado y en especial gracias por hacerme sentir parte de su laboratorio.

Al Dr. Armando Luna López porque usted fue quien me encamino en la ciencia, jamás olvidare mis clases de química y “la teoría de Messi”, mi respeto y aprecio para usted siempre.

A la Dra. Erika Olivia Gómez González por las observaciones y comentarios de este trabajo.

A el Mtro. José Luis Ventura por compartir su conocimiento y tiempo en cada duda que surgía en el camino.

A todos los que forman parte del laboratorio de bioenergética: Dra. Adriana, Paola, Pedro, Sandra, Eli, Ana, Moni y Luis por hacer más llevadero los momentos de trabajo y a Rafa por su ayuda con los datos de glutatión.

A mis compañeros de cardiología y en especial a Toño por su paciencia y tiempo al enseñarme técnicas valiosas para la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Concepción por brindarme un espacio en su laboratorio para trabajar y a Sharik por su amable disponibilidad para apoyarme con el uso del Seahorse.

A Verito por acompañarme dentro y fuera del laboratorio, por no despertar 5 años después en nuestros eternos recorridos a cardiología, por tantas buenas pláticas, por cantar conmigo y sobre todo por brindarme tu apoyo y amistad, te quiero “muéganita”.

A mis amigos Roberto y Ulises “Nayarit” por siempre escucharme y tener un buen consejo, por sus pláticas serias y no tan serias, por los buenos momentos de su compañía aun cuando las puertas de Mordor se cerraban temprano y sobre todo por su amistad.

A mis padres por todo el amor que me dan, por su apoyo para estar con mi peque cuando a mí no me era posible y porque sé que se sienten orgullosos de cada uno de mis pequeños triunfos.

A mis hermanas y sobrinos por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi esposo Alejandro por siempre apoyar cada uno de mis proyectos, por toda tu paciencia, por los besos y abrazos cuando sentía que no podía más, eres un hombre maravilloso sé que juntos seguiremos logrando lo que nos proponemos, te amo.

A mi hijo Alexander por entender que algunas veces no podía estar en casa temprano, por regalarme fines de semana para ir a trabajar al laboratorio y por ser mi pequeño ayudante de laboratorio, siempre serás el motivo más grande para alcanzar mis metas.

Querido abuelo, que donde sea que te encuentres
siempre te sientas orgulloso de mí, ¡te extraño!

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. Envejecimiento.....	3
3.2. Senescencia celular.....	4
3.3. Metabolismo energético.....	5
3.3.1. Glucólisis.....	5
3.3.2. Fosforilación oxidativa.....	6
3.3.3. Metabolismo energético en células senescentes.....	6
3.4. Estado redox.....	8
3.4.1. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	9
3.4.2. La mitocondria como fuente de ERO.....	10
3.4.3. Sistemas antioxidantes de las células.....	12
3.4.4. Estrés oxidante.....	13
3.5. Senescencia celular y cáncer.....	13
4. ANTECEDENTES.....	16
5. JUSTIFICACIÓN.....	19
6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
7. OBJETIVO GENERAL.....	20
7.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
8. HIPÓTESIS.....	21
9. MATERIAL Y MÉTODO.....	21
9.1. Cultivo celular.....	22
9.2. Inducción de senescencia prematura por estrés.....	23
9.3. Parámetros de senescencia.....	24
9.3.1 Proliferación celular.....	24

9.3.2. Ensayo de la actividad de la enzima β -galactosidasa.....	25
9.3.3. Expresión de p16, p21, p53 y β -galactosidasa.....	26
9.4. Evaluación del metabolismo energético.....	27
9.4.1. Capacidad de la actividad glucolítica.....	27
9.4.2 Evaluación de la capacidad respiratoria celular.....	28
9.5. Evaluación del estrado REDOX.....	30
9.5.1. Especies Reactivas de Oxígeno intracelular.....	30
9.5.2. Cociente de Glutación.....	30
9.6. Potencial de membrana.....	31
9.7. Tratamiento estadístico.....	31
10. RESULTADOS.....	32
10.1 Validación de estado senescente.....	32
10.1.1. Proliferación celular.....	32
10.1. 2.Porcentaje de células positivas a SA- β -galactosidasa.....	33
10.1.3. Expresión de marcadores de senescencia.....	35
10.2. Evaluación del metabolismo energético.....	39
10.2.1. Capacidad de la actividad glucolítica.....	39
10.2.2. Capacidad respiratoria celular.....	41
10.3. Estado REDOX.....	43
10.3.1. ERO intracelular.....	43
10.3.2. Potencial de membrana.....	44
10.3.3. Cociente de Glutación.....	46
11. DISCUSIÓN.....	47
12. CONCLUSIÓN.....	49
13. PERSPECTIVAS.....	50
14. REFERENCIAS.....	51

1. RESUMEN

La senescencia celular (SC) es un fenómeno biológico que ocurre en respuesta a daño y se ha relacionado con distintos procesos biológicos y patológicos. Gran parte del conocimiento que se tiene de la senescencia celular ha sido descrito en fibroblastos, sin embargo, este no es el único tipo celular en el que se presenta la senescencia. El establecimiento de la senescencia puede darse por estrés oxidante que induce daño en el ADN. Aspectos como el metabolismo energético y el estado redox de células senescentes es poco estudiado. En este trabajo se indujo senescencia en la línea celular MCF10A por estrés oxidante. Se determinó el metabolismo energético de células senescentes midiendo la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR). Así como, el estado redox evaluando la presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el coeficiente de glutatión oxidado y reducido (GSH/ GSSG). Nuestros resultados muestran que las células senescentes MCF10A inducidas a senescencia por estrés oxidante presentan un metabolismo energético preferentemente dirigido hacia la glucólisis, y un estado redox pro-oxidante, debido a una elevación en el contenido de GSSG que coincide con un aumento de las ERO.

2. SUMMARY

Cellular senescence (SC) is a biological phenomenon that occurs in response to damage and has been linked to different biological and pathological processes. Much of the knowledge of cellular senescence has been described in fibroblasts; however, this is not the only cell type in which senescence occurs. The establishment of senescence can occur due to oxidative stress that induces DNA damage. Aspects such as energy metabolism and the redox state of senescent cells are little studied. In this work, senescence was induced in the MCF10A cell line by oxidative stress. The energy metabolism of senescent cells was determined by measuring the rate of oxygen consumption (OCR) and the acidification rate of the extracellular medium (ECAR), as well as, the redox state evaluating the presence of reactive oxygen species (ROS) and the oxidized and reduced glutathione coefficient (GSH/GSSG). Our results determined that senescent MCF10A cells induced to senescence by oxidative stress exhibit an energy metabolism preferentially directed towards glycolysis, and a redox state pro-oxidant, due to an elevation in GSSG content that coincides with an increase in ROS.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno biológico complejo e inevitable que se relaciona con el decaimiento o la pérdida de las capacidades fisiológicas, bioquímicas y estructurales de un organismo (Kirkwood *et al.*, 1992). En los últimos años, la pirámide poblacional mexicana ha cambiado de manera drástica y se espera que para el año 2050 el 28% de nuestra población sea mayor de 65 años (INEGI, 2005). En 2013, López-Otin y colaboradores identificaron y categorizaron nueve marcadores celulares y moleculares del envejecimiento en los que se encuentran: Inestabilidad genómica, el desgaste telomérico, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de la proteostasis, la desregulación en la detección de nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de células madre y la comunicación intercelular alterada.

Aunque el estrés oxidante no está incluido dentro de los marcadores del envejecimiento, se ha reportado de manera experimental, que dicho estrés puede inducir respuestas celulares como la SC. Así, la acumulación de células senescentes contribuye al deterioro en los organismos viejos y a las patologías asociadas a la edad, como el cáncer, los desórdenes neurodegenerativos, las enfermedades autoinmunes y las neoplasias (Blander *et al.*, 2003; Nassour y Abbadie, 2016). De acuerdo con esta idea, se ha observado que las células humanas y de roedores con características senescentes se acumulan *in vivo* con la edad, así como en lesiones hiperplásicas y

pre malignas (Choi *et al.*, 2000; Krtolica y Campisi, 2002; Melk *et al.*, 2003; Paradis *et al.*, 2001; Vasile *et al.*, 2001).

3.2. Senescencia celular

La SC es un fenómeno biológico que consiste en la detención de la proliferación celular cuando una célula se ve sometida a algún tipo de estrés que puede ser el acortamiento de telómeros, la irradiación, la activación de oncogenes y el estrés oxidante.

Existen distintos modelos de inducción de senescencia de manera *in vitro*, aunque se desconoce si todos estos tipos ocurren de manera *in vivo*. La senescencia replicativa (SR) se refiere a la disminución en el potencial de proliferación observada después de múltiples divisiones celulares que finalmente conduce a una detención total debido al acortamiento de telómeros (Hayflick, 1965). Senescencia inducida por oncogenes (OIS) la cual consiste en la activación de oncogenes, como Ras o BRAF, o la inactivación de supresores de tumores, como PTEN, puede llevar a OIS (Sharpless y Sherr 2015), la senescencia prematura inducida por estrés (SIPS) que ocurre después de someter a las células a algún estresor, por ejemplo peróxido de hidrógeno H₂O₂, la hiperoxia, el hidroperóxido de terc-butilo y la radiación. Las células en SR comparten características comunes con las células en SIPS: morfología, actividad de β-galactosidasa asociada a senescencia, regulación del ciclo celular, expresión génica y acortamiento de telómeros, por lo cual es un buen modelo para comprender la senescencia celular (Toussaint *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que el mecanismo en la mayoría de los casos es la respuesta al daño al ADN (Hayflick y Moorhead, 1961; Campisi y D'Adda, 2007). Se ha sugerido que las vías p53-p21 y p16INK4a-pRb son las principales reguladoras de la SC y como son determinantes para iniciar la detención de la proliferación, se utilizan como marcadores del estado senescente.

Al recibir una señal de daño al ADN, p53 se activa e induce la expresión de p21, un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (CDK), que detiene el progreso del ciclo celular (Brown *et al.*, 1997; Sherr y McCormick, 2002). La vía p16INK4a-pRb, funciona al inducir la expresión de p16 que es otro inhibidor de las CDKs. p16 mantiene a pRB en un estado activo y bloquea la proliferación celular al suprimir E2F, un factor de transcripción que regula el ciclo celular, lo que lleva a la detención del crecimiento (Sherr y McCormick, 2002). Ambas vías finalmente actúan sobre el ciclo celular y logran detener la proliferación celular (Campisi y di Fagagna, 2007).

La senescencia celular está acompañada de cambios morfológicos como el aumento de tamaño celular, pues a menudo se duplican en volumen y como son adherentes adoptan una morfología aplanada en un cultivo bidimensional (Rodier *et al.*, 2009). También se consideran como marcadores moleculares para identificar a las células senescentes el secretoma y los focos de daño al ADN (Ohtani *et al.*, 2004). La tinción histoquímica de la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) es un marcador de uso común cuya actividad deriva de la presencia sobreexpresada de la enzima β -galactosidasa lisosomal que es detectable a pH 6 (Dimri *et al.*, 1995).

Las células senescentes presentan un secretoma denominado fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP por sus siglas en inglés) (Hayflick y Moorhead, 1961; Dimri *et al.*, 1995; Kurz *et al.*, 2000; Rodier *et al.*, 2009). El SASP está compuesto por quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento, proteasas y otras moléculas que están implicadas positiva o negativamente en varios procesos biológicos, como la cicatrización de heridas, la regeneración celular, el desarrollo embrionario, así como el desarrollo de patologías como el cáncer (Demaria *et al.*, 2014; Coppé *et al.*, 2008). Los componentes del SASP pueden afectar a las células circundantes al activar varios receptores de la superficie y las correspondientes vías de transducción de señales (Coppé *et al.*, 2008).

Las células senescentes presentan alteraciones en las mitocondrias como: la función disminuida, la desorganización estructural, el aumento de las mutaciones del ADN mitocondrial (mtDNA) y una disminución en el potencial de membrana (Bratic y Larsson, 2013; Cagin y Enríquez, 2015). Estas alteraciones tienen un impacto en el metabolismo energético de las células senescentes (Korolchuk *et al.*, 2017).

3.3. Metabolismo energético

El metabolismo energético es el proceso de generación de energía (ATP) a partir de nutrientes. El metabolismo comprende una serie de vías interconectadas que pueden funcionar en presencia o ausencia de oxígeno. Las células producen ATP a través de dos vías principales: la glucólisis y la fosforilación oxidativa (Zheng, 2012).

3.3.1. Glucólisis

La glucólisis es una serie de reacciones que extraen energía de la glucosa al romperla en dos moléculas de tres carbonos, llamadas piruvato, con una ganancia neta de dos ATP (Berg *et al.*, 2002). La glucólisis comprende dos fases, en la primera fase se utilizan dos moléculas de ATP para convertir la glucosa en fructosa-1,6-bisfosfato a través de reacciones secuenciales catalizadas por hexocinasa, fosfoglucoasa isomerasa y fosfofructocinasa. En la segunda fase, la fructosa-1,6-bisfosfato se convierte adicionalmente paso a paso en piruvato con la producción de cuatro moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. Durante este proceso, se consumen dos ADP y dos NAD⁺. En ausencia de oxígeno, NAD⁺ se regenera a partir de NADH por reducción de piruvato a ácido láctico catalizado por lactato deshidrogenasa (LDH). En condiciones aeróbicas, el piruvato se puede oxidar aún más a CO₂ y H₂O en la mitocondria a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y la cadena respiratoria acoplada a la ATP sintasa, produciendo una gran cantidad de ATP durante la fosforilación oxidativa (Pelicano *et al.*, 2006).

3.3.2. Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa se lleva a cabo en las mitocondrias y combina el transporte de electrones con la respiración celular y la síntesis de ATP. No solo produce la gran mayoría de la energía celular, sino que también participa en la producción de radicales libres y la apoptosis. La fosforilación oxidativa consiste en la cadena de transporte de electrones (CTE), que comprende NADH-deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinona,

complejo bc_1 (complejo III), citocromo *c* (Cyt *c*) y citocromo *c* oxidasa (CcO; complejo IV). La mayoría de los electrones transferidos por la CTE se derivan de NADH y entran en la cadena a través del complejo I. Además, el complejo II alimenta los electrones directamente al conjunto de ubiquinona/ubiquinol, y otras fuentes de entrada incluyen la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF), ubiquinona oxidorreductasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Estos electrones se transfieren a través del CTE al oxígeno, mientras que el potencial de la membrana mitocondrial se genera al bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna. Finalmente, el gradiente de protones es utilizado por la ATP sintasa (complejo V), que acopla el flujo de retorno de los protones previamente bombeados por el CTE a la producción de ATP (Berg *et al.*, 2006; Hüttemann *et al.*, 2007).

3.3.3. Metabolismo energético en células senescentes

La CTE mitocondrial acoplada a la ATP sintasa produce ATP como una fuente importante de energía celular durante la respiración aeróbica. Los defectos en el CTE conducen a una caída en la producción de ATP y pueden resultar en la inducción de la senescencia celular (Stöckl *et al.*, 2006).

Existen pocos estudios sobre el metabolismo de células senescentes y casi exclusivamente se han realizado en cultivos de fibroblastos, en los que se ha visto que adoptan un estado glicolítico, además de un estado menos energético (Bittles y Harper, 1984; James *et al.*, 2015).

En 2001, Omata y colaboradores utilizando ratones de senescencia acelerada (SAMP8) y ratones resistentes a la senescencia acelerada (SAMR1) como control, encontraron en las células senescentes de cerebro de ratón una capacidad amplificada de glucólisis, y no tanto de la fosforilación oxidativa. El conocimiento sobre el metabolismo de células senescentes resulta contradictorio, ya que en 2003, Zwerschke y colaboradores demostraron *in vitro* que en fibroblastos humanos senescentes existe un desequilibrio metabólico, asociado con una fuerte reducción en los niveles de trifosfatos de ribonucleótido, incluido el ATP, que son necesarios para la biosíntesis de nucleótidos y, por lo tanto, para la proliferación. El agotamiento de la ATP en los fibroblastos senescentes se debe a la desregulación de las enzimas glucolíticas, y una incapacidad para mantener los niveles de ATP.

La actividad de AMPK está altamente incrementada en las células senescentes inducidas por oncogenes (Moiseeva *et al.*, 2009). En contraste, se sabe que la inactivación de la vía AMPK promueve el cáncer (Bardeesy *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008; Shackelford y Shaw, 2009), apoyando aún más el papel de AMPK en el establecimiento de la detención del crecimiento y supresión tumoral. Los estudios que enfatizan el impacto del equilibrio bioenergético mitocondrial y la subsiguiente activación de AMPK pueden proporcionar información sobre los mecanismos involucrados en el establecimiento de la senescencia celular y su contribución al envejecimiento y los fenotipos relacionados con la edad.

La disfunción mitocondrial tiene un efecto profundo en la bioenergética celular. El aumento de la masa mitocondrial se refleja en una tasa de consumo de oxígeno

significativamente mayor por célula en la senescencia y la fracción de ATP producida por la fosforilación oxidativa mitocondrial disminuye, mientras que la glucólisis genera relativamente más ATP. Por lo tanto, tanto el aumento en la abundancia mitocondrial como el cambio hacia un modo más glucolítico de producción de ATP aparecen como respuestas compensatorias a la disfunción mitocondrial (Korolchuk *et al.*, 2017), la disfunción mitocondrial también está relacionada con cambios en el estado redox de las células (Jones *et al.*, 2016).

3.4. Estado redox

El estado redox celular es el equilibrio entre las reacciones de oxidación y reducción dentro de la célula. Estas reacciones de oxidación-reducción (redox) desempeñan un papel importante en la salud y la enfermedad humana, pues contribuyen al equilibrio de los sistemas metabólicos como el metabolismo energético, la regulación del ciclo celular, el crecimiento celular, la apoptosis, la expresión génica y el envejecimiento, entre otros (Jones *et al.*, 2016; Moriatry y Jones, 2004). Cuando existe un desbalance en el estado redox normal, se pueden generar efectos tóxicos a través de la producción de ERO que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN.

3.4.1. Especies Reactivas de Oxígeno

Las moléculas que contienen uno o más electrones desapareados y, por lo tanto, dan reactividad a la molécula se llaman radicales libres. Cuando 2 radicales libres comparten sus electrones desapareados, se crean formas no radicales. Las ERO se pueden dividir en 2 grupos: radicales libres y no radicales (Ray *et al.*, 2012). Las

tres ERO principales que son de importancia fisiológica son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), El radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Birben et al., 2012). Una mayor producción de ERO celular puede oxidar la estructura del ADN, modificar proteínas y lípidos, activar varios factores de transcripción inducidos por el estrés y producir citocinas pro inflamatorias y anti inflamatorias (Cross et al., 1987; Finkel, 2011).

Se ha demostrado que el aumento constante en la producción de ERO genera un circuito de retroalimentación positiva manteniendo el daño continuo al ADN, que se considera necesario y suficiente para establecer y mantener la detención del ciclo celular durante el desarrollo temprano del fenotipo de la senescencia (Passos et al., 2010). Sin embargo, esta vía no es necesaria para mantener el fenotipo de detención del crecimiento en los puntos de tiempo posteriores a los 9 días al inicio de la senescencia, lo que sugiere que la producción de ERO es prescindible una vez que el fenotipo senescente esté completamente establecido senescencia (Passos et al., 2010)

Distintos estudios muestran que las ERO pueden inducir senescencia celular. El H_2O_2 , que se considera como una de las principales ERO dentro de la célula, es un potente inductor de senescencia celular en muchos tipos de células (Porath y Weinberg, 2005). Si bien el tratamiento exógeno con H_2O_2 puede promover la senescencia celular, las ERO endógenas (como los superóxidos y los radicales hidroxilo) también están implicadas en el establecimiento y mantenimiento de la detención irreversible de la proliferación. La producción de ERO se asocia con la

implementación de senescencia replicativa, senescencia inducida por oncogenes y senescencia inducida por estrés (Colavitti y Finkel, 2005; Passos *et al.*, 2010; Lu y Finkel, 2008; Moiseeva *et al.*, 2009).

3.4.2. La mitocondria como fuente de especies reactivas de oxígeno

Las mitocondrias generan EROs en forma de superóxidos como subproductos de la transferencia ineficiente de electrones a través de la CTE (Quinlan *et al.*, 2013). Estos superóxidos y otras ERO pueden dañar a las mitocondrias y disminuir aún más la eficiencia de la CTE mitocondrial, lo que resulta en un circuito de retroalimentación positiva de generación de ERO y de daño oxidante en la mitocondria (Balaban *et al.*, 2005).

La mayor parte de los oxidantes mitocondriales se forman predominantemente en el complejo I o el complejo III de la CTE cuando los electrones derivados inicialmente de NADH o FADH₂ pueden reaccionar con el oxígeno para producir aniones superóxido (O₂•). A pesar de que O₂• no es un oxidante fuerte, es un precursor de la mayoría de las otras especies reactivas de oxígeno, y también se involucra en la propagación de reacciones en la cadena oxidativa (Nickel *et al.*, 2014; Murphy, 2009).

Está bien establecido que no solo el tamaño celular sino también la masa mitocondrial aumentan significativamente en las células senescentes. Los estudios cinéticos en la senescencia inducida por estrés demostraron que el aumento de la masa mitocondrial es un proceso rápido pero no inmediato, que se produce con un retraso de 2 a 3 días después del pico en el daño del ADN, pero antes de que se establezca un SASP robusto (Passos *et al.*, 2010). Como con la mayoría de los otros

fenotipos de senescencia, la acumulación mitocondrial se ha estudiado preferentemente en los fibroblastos, pero también ocurre en las células epiteliales senescentes (Hara *et al.*, 2013), hepatocitos (Correia *et al.*, 2016), enterocitos (Jurk *et al.* 2014), y neuronas que desarrollan un fenotipo parecido a la senescencia en respuesta al daño persistente del ADN (Jurk *et al.*, 2012). En células senescentes HUVEC el cambio en la morfología mitocondrial fue causado por la regulación negativa de la expresión de Fis1 y Drp1, dos proteínas que regulan la fisión mitocondrial. (Mai *et al.*, 2010).

En mitocondrias funcionales, el consumo de oxígeno, la producción de ATP, el potencial de membrana y la generación de ERO están estrictamente regulados para mantener el equilibrio redox (Brand, 2016). Si bien no existe una correlación simple entre el potencial de membrana y la producción de superóxido por la cadena de transporte de electrones, las mitocondrias que se acumulan en la senescencia a menudo muestran un potencial de membrana disminuido y al mismo tiempo producen niveles aumentados de ERO, lo que sugiere su disfuncionalidad (Korolchuk *et al.*, 2017; Passos *et al.*, 2007; Moiseeva *et al.*, 2009).

3.4.3. Sistemas antioxidantes

El cuerpo humano está equipado con una variedad de antioxidantes que sirven para contrarrestar el efecto de los oxidantes. Para todos los propósitos prácticos, estos se pueden dividir en 2 categorías: enzimáticos y no enzimáticos. Los principales antioxidantes enzimáticos de la célula son la súper oxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH-Px).

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen compuestos de bajo peso molecular, tales como vitaminas (vitaminas C y E), β -caroteno, ácido úrico, y GSH que es un tripéptido (γ -glutamyl-cysteinyl-glicina) (Birben *et al.*, 2012).

El glutatión reducido (GSH) se considera uno de los eliminadores más importantes de ERO y su relación con el glutatión oxidado (GSSG) se puede usar como marcador de estrés oxidante.

El GSH es muy abundante en todos los compartimentos celulares y es el principal antioxidante soluble. La relación GSH/GSSG es un determinante importante del estrés oxidante. El GSH muestra sus efectos antioxidantes de varias maneras. Desintoxica al peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos a través de la acción de la glutatión peroxidasa (GSH-Px). El GSH dona su electrón al H_2O_2 para reducirlo a H_2O y O_2 . El GSSG se reduce nuevamente a GSH por la GSH reductasa que utiliza NAD(P)H como el donante de electrones. La GSH-Px también es importantes para la protección de la membrana celular de la peroxidación lipídica. El GSH dona protones a los lípidos de la membrana y los protege de los ataques de oxidantes (Masella *et al.*, 2005; Curello *et al.*, 1985).

La proporción de GSH: GSSG dentro de las células se usa a menudo como un marcador de toxicidad celular. En condiciones normales, se sabe que el par redox está presente en células de mamíferos en el rango de concentración de 1 a 10 mM. En una célula en reposo, la relación molar GSH: GSSG supera los 100:1, mientras que en varios modelos de estrés oxidante, se ha demostrado que esta relación disminuye a valores de 10:1 e incluso 1:1 (Zitka *et al.*, 2012).

En 2009, Klimova y colaboradores mostraron que la sobreexpresión del antioxidante superóxido dismutasa mitocondrial 2 (SOD2) y la catalasa dirigida mitocondrial no son suficientes para inhibir el fenotipo de senescencia en células senescentes inducidas por hiperoxia. Debido a que las ERO son producidas por enzimas mitocondriales y no mitocondriales durante la hiperoxia (70% O₂), existe incapacidad de los antioxidantes mitocondriales para revertir la detención del crecimiento en la senescencia inducida por la hiperoxia. Lo anterior sugiere que las ERO presentes en el citosol pueden ser suficientes para inducir la detención del crecimiento. Por lo tanto, los mecanismos involucrados en la vinculación de las ERO mitocondrial y la senescencia celular aún deben ser estudiados más a fondo.

3.4.4. Estrés oxidante

El estrés oxidante, se define como una perturbación en el equilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes, Cuando se produce el estrés oxidante, las células intentan contrarrestar los efectos oxidantes y restaurar el equilibrio redox mediante la activación o el silenciamiento de genes que codifican enzimas defensivas, factores de transcripción y proteínas estructurales (Betteridge, 2000).

3.5. Senescencia celular y cáncer

Como la senescencia está regulada por varios supresores de tumores, puede funcionar como una barrera natural para la tumorigénesis (Serrano *et al.*, 1997), un papel fisiológico del SASP es provocar una respuesta inflamatoria local con efectos complejos, incluida la eliminación de células senescentes por fagocitosis, lo que lleva

a la remodelación del tejido y la resolución del daño (Freund *et al.*, 2010). Sin embargo, su acumulación se ha relacionado con muchos fenotipos asociados con la edad, tanto normal como patológicos (Campisi *et al.*, 2011).

En la mayoría de los casos, se ha demostrado o formulado la hipótesis de que las células senescentes conducen cambios degenerativos en gran parte a través de las proteínas secretadas en el SASP que pueden alterar las estructuras tisulares normales que son esenciales para la función normal del tejido. Además, las células senescentes pueden contribuir en las patologías degenerativas, también pueden hacerlo con el desarrollo de hiperplasias y cáncer (Laberge *et al.*, 2012; Campisi *et al.*, 2011).

Se ha reportado que las células senescentes promueven la proliferación celular, migración y angiogénesis de células tumorales epiteliales humanas y de ratón tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Krtolika *et al.*, 2001; Coppé *et al.*, 2006). En 2007, Liu y Hornsby mostraron que los fibroblastos humanos sometidos a SIPS por exposición a bleomicina, un agente dañino del ADN, aumentan el crecimiento de las células cancerosas cotransplantadas (MDA-MB-231) en ratones inmunodeficientes. Los xenoinjertos que contienen fibroblastos senescentes exhibieron daño tisular temprano y un aumento en el tamaño de los tumores. Los factores de SASP pueden estimular fenotipos malignos en cultivo. Uno de estos fenotipos es la transición epitelio-mesénquima. Esta transición morfológica permite que las células epiteliales transformadas invadan y migren a través de los tejidos y es fundamental en el desarrollo del cáncer metastásico. La secreción de IL-6 e IL-8 de los fibroblastos

senescentes inducen esta transición en células epiteliales premalignas y células epiteliales cancerosas no agresivas (Parrinello *et al.*, 2005).

4. ANTECEDENTES

La alteración mitocondrial puede ser una de las causas de la disfunción celular durante el envejecimiento y la senescencia celular. Los defectos más destacados incluyen: la función disminuida, la desorganización estructural, el aumento de las mutaciones del ADN mitocondrial (mtDNA) y una disminución en el potencial de membrana (Bratic y Larsson, 2013; Cagin y Enríquez, 2015). En 2007 Passos y colaboradores usando una sonda fluorescente que detecta específicamente el superóxido dentro de la matriz mitocondrial (MitoSOX) encontraron que las mitocondrias de fibroblastos senescentes (MCR5) producían más superóxido respecto a sus controles acompañada de una disminución en el potencial de membrana mitocondrial.

La disfunción mitocondrial tiene un efecto profundo en la bioenergética celular debido a que existe un aumento de la masa mitocondrial que se refleja en una tasa de consumo de oxígeno absoluto significativamente mayor por célula en la senescencia así también en las células senescentes la fracción de ATP producida por la fosforilación oxidativa mitocondrial disminuye, mientras que la glucólisis genera relativamente más ATP (Korolchuk *et al*, 2017; Hutter *et al*, 2004).

La activación crónica de AMPK, que es un regulador maestro de las respuestas celulares al estrés energético, activa a su vez a p53 y detiene el ciclo celular para

inducir senescencia celular (Jones et al., 2005, Wang et al., 2003) al regular negativamente los genes de pro-proliferación tales como la ciclina A, B1 y E (Efimova et al., 2010), aumentar la expresión de p21 y p27 (Peyton et al., 2012), limitar la actividad glicolítica, y además promover la respiración mitocondrial (Kruiswijk et al., 2015; Puzio-Kuter, 2011) y la expresión del SASP (Coppe et al., 2008). Por disfunción mitocondrial, prevalece la reducción del cociente NAD⁺/NADH así como de AMP: ATP y ADP: ATP, activándose la señalización de AMPK, para inducir senescencia (Lerner et al., 2013; Hardie et al., 2012). Sin embargo, en otros entornos, se ha visto que la activación aguda de AMPK estimula la autofagia y la biosíntesis de NAD⁺ proporcionando resistencia a la senescencia celular inducida por el estrés oxidante (Han et al., 2016).

En un estudio en fibroblastos IMR-90 inducidos a senescencia por el oncogene Ras, se encontró un efecto “anti-Warburg” que involucra la disminución de las enzimas glicolíticas, pero un aumento de las proteínas mitocondriales, particularmente los genes relacionados al metabolismo de piruvato y de la fosforilación oxidativa (Li et al., 2013). También en fibroblastos IMR-90 inducidos a senescencia por oncogenes se ha observado que tanto la glicólisis como el incremento de la acidificación extracelular (Takebayashi et al., 2015) activan la vía NF-κB que permite la sobreexpresión de muchos genes del SASP para activar la señalización pro-inflamatoria.

Dado que las células senescentes aumentan de tamaño después de detener su proliferación y el SASP exige una considerable biosíntesis macromolecular, es posible que las células senescentes, como muchas células metabólicamente sobre-activas

(Vander Heiden *et al.*, 2009), favorecen la glucólisis por su capacidad de proporcionar precursores para una alta demanda de las proteínas, los lípidos y otros componentes celulares.

En las mitocondrias se realiza la producción de ATP y la generación de ERO durante la fosforilación oxidativa. Estas ERO pueden inducir senescencia celular. El H₂O₂, que se considera como una de las principales ERO dentro de la célula, es un potente inductor de senescencia celular en muchos tipos de células (Porath y Weinberg, 2005; Brand, 2016), las mitocondrias que se acumulan en la senescencia a menudo muestran un potencial de membrana disminuido y al mismo tiempo producen niveles aumentados de ERO lo que sugiere su disfuncionalidad (Korolchuk *et al.*, 2017). Passos y colaboradores, en 2007, observaron que en fibroblastos MRC-5 senescentes se mostraba una disminución del potencial de la membrana mitocondrial, un aumento de la biogénesis mitocondrial y un aumento en la producción de ERO intracelular tanto para senescencia replicativa como para senescencia inducida por estrés. Así mismo; Moiseeva y colaboradores en 2009 observan este comportamiento en fibroblastos IMR90 inducidos a senescencia por activación de oncogenes.

En nuestro laboratorio se han realizado distintas investigaciones para conocer diversos tipos de inducción de senescencia con estímulos como la exposición a estrés oxidante (López-Diazguerrero *et al.*, 2006) o la inhibición del proteosoma (Maciel-Barón, *et al.* 2016), y se ha evaluado el fenotipo secretor asociado a la senescencia y se encontró que interleucinas como la IL-6 e IL-8 se presentan en los distintos modelos de inducción de senescencia. Por otra parte, también se ha evaluado la relación de

este SASP con la proliferación y la migración celular (Barajas-Gómez *et al.*, 2017), donde se ha encontrado que el SASP promueve la proliferación de células no senescentes así como la migración celular.

Por otro lado, en 2012 Sherman y colaboradores lograron inducir la senescencia mediada por oncogenes en células epiteliales de mama tanto en cultivo primario (HMEC) como en línea celular MCF10A, que es una línea celular epitelial de mama no tumorigénica. Estos investigadores pudieron observar que 5 días después de la infección, las células MCF10A adquirieron una morfología senescente típica, en la que más del 90% de las células se agrandaron, se aplanaron, se volvieron altamente vacuoladas, y presentaron un aumento en la expresión de la enzima β -galactosidasa que se considera un marcador de este estado.

5. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los estudios sobre las células senescentes se ha realizado en fibroblastos, sin embargo es importante conocer el comportamiento de células senescentes de otros tipos celulares y comprender cómo contribuyen en distintas patologías. Un gran número de neoplasias tienen origen epitelial, y se ha visto la participación de dichas células en el mantenimiento y progresión de los tumores. Sin embargo, existen pocos estudios de inducción de senescencia en este tipo celular por estrés oxidante, y no se ha evaluado el metabolismo energético y el estado redox del estado senescente en células epiteliales.

Un aspecto importante y controversial de las células senescentes en general, es el conocimiento sobre metabolismo energético, pues algunos autores mencionan que es predominantemente glucolítico, y otros mencionan que está más orientado hacia la fosforilación oxidativa (Omata et al., 2001; Bitlles y Harper, 1984; Moiseeva et al., 2009; Zwerschke et al., 2013).

Esclarecer el tipo de metabolismo que predomina en las células epiteliales senescentes puede ser clave para comprender su papel en diversas patologías como el cáncer, además de ser un blanco terapéutico para eliminar o regular farmacológicamente a estas células.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La senescencia celular inducida por estrés oxidante modifica el metabolismo energético mitocondrial?

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el metabolismo energético y el estado redox de las células epiteliales de mama de la línea celular MCF10A inducida a senescencia por estrés oxidante.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer las condiciones para el establecimiento del modelo SIPS en células epiteliales MCF10A.
2. Evaluar marcadores del estado senescente en células epiteliales MCF10A posterior a la inducción de senescencia.
3. Determinar la actividad glucolítica y respiratoria de células epiteliales MCF10A senescentes.
4. Evaluar el potencial de membrana mitocondrial de células epiteliales senescentes MCF10A.
5. Determinar el estado redox en células epiteliales MCF10A senescentes.

8. HIPÓTESIS

Las células epiteliales de mama senescentes inducidas mediante estrés oxidante presentan alteraciones funcionales por lo que se espera que presenten un estado metabólico glucolítico debido a la disfunción mitocondrial.

9. MATERIAL Y MÉTODO

MODELO DE ESTUDIO

En este trabajo se utilizó la línea celular epitelial de mama humana no tumorigénica MCF10A (ATCC ® CRL-10317™) que es el modelo de célula mamaria normal más comúnmente utilizado. Las células se derivaron de tejido mamario proliferativo benigno y se immortalizaron espontáneamente sin factores definidos (Qu *et al.*, 2015).

GRUPOS DE ESTUDIO

MCF10A control

MCF10A células senescentes prematuras inducidas por estrés (SIPS)

9.1. Cultivo celular

Las células MCF10A se cultivaron en medio basal de células epiteliales de mama (ATCC®PCS-600-030™) suplementado con rH-Insulina (5 µg/mL), L-glutamina (6 mM), epinefrina (1 µM), Apo-transferrina (5 µg/mL), rH-TGF-α (5 µg/mL), extracto P (0.4%) e hidrocortisona (100 ng/mL) (Mammary Epithelial Cell Growth kit ATCC ® PCS-600-040™) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. El medio fue removido cada tercer día y sustituido por medio fresco. Las células fueron divididas cuando alcanzaron una confluencia del 80% utilizando tripsina al 0.01% y sembradas en dos cajas nuevas con medio de cultivo fresco para aumentar la población y evitar la inhibición de la proliferación por contacto celular.

- Para los ensayos de proliferación celular y actividad de la enzima β -galactosidasa, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de 3×10^3 células por cada pozo.
- Para evaluar la expresión de los marcadores de senescencia p16, p21, p53 y β -galactosidasa, las células se sembraron en cubreobjetos estériles, 3×10^3 células en cada uno, los cuales se encontraban dentro de cajas Petri de 20 mm de diámetro, y posteriormente se cubrieron con el medio de cultivo.
- Para determinar la tasa glucolítica y el consumo de oxígeno, las células se sembraron a una densidad de 30×10^3 células por pozo en placas Seahorse XF 24[®].
- Para los ensayos de potencial de membrana y determinación de especies reactivas de oxígeno se sembraron a una densidad de 30×10^3 células en cajas Petri de 60mm de diámetro.

Las determinaciones se realizaron 2 días después de la inducción, para evitar la interferencia del efecto del estrés oxidante inmediato y a partir de ahí se estableció como día 1 posterior a la inducción de senescencia (diagrama 1).

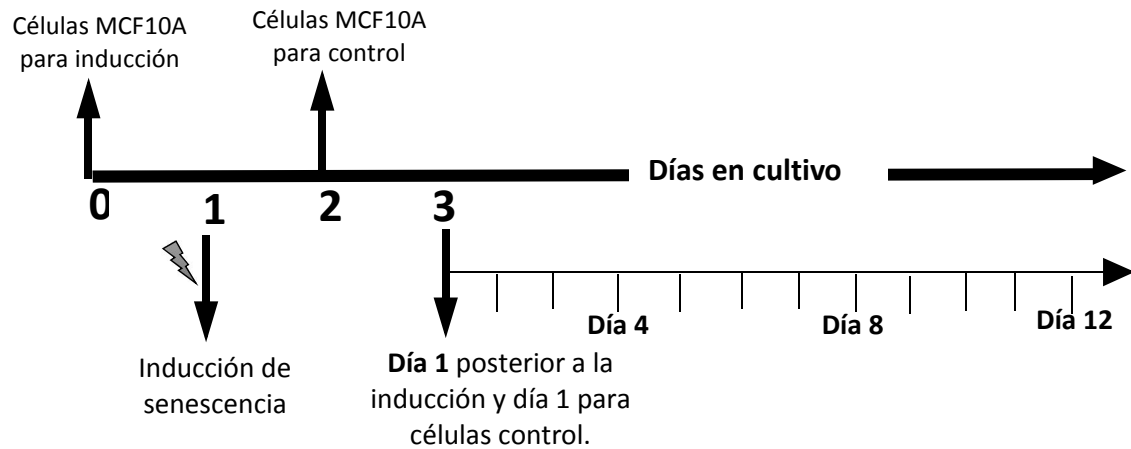


Diagrama 1. Diseño experimental. Se muestran los días de cultivo en los cuales se siembran las células y se realiza la inducción de la senescencia, así como los días posteriores a la inducción de senescencia en la línea celular MCF10A.

9.2. Senescencia prematura inducida por estrés

Para conocer la concentración de H_2O_2 que indujera SIPS, se realizaron curvas de proliferación utilizando 0, 12, 25 y 50 μM de H_2O_2 disuelto en medio basal. Las células fueron expuestas al H_2O_2 durante 2 horas y después de este tiempo, el medio fue retirado, se realizaron dos lavados con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin Ca^{++} / Mg^{+} y se agregó medio fresco (Dumont et al., 2000).

9.3. Parámetros de senescencia

Las determinaciones de los parámetros de senescencia se realizaron los días 1, 4, 8 y 12 posteriores a la inducción de senescencia. Se realizaron ensayos para determinar el número total de células a lo largo del tiempo del cultivo, la actividad de la enzima β -galactosidasa y marcadores de senescencia como β -galactosidasa, p53, p16 y p21. Todas las determinaciones se realizaron en al menos 3 experimentos independientes.

9.3.1. Proliferación celular

La proliferación se determinó realizando conteo celular los días 1, 4, 8 y 12 posteriores a la inducción de senescencia. Para ello, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos. Se despegaron usando 150 μ L de tripsina 0.1%. Una vez que las células fueron despegadas, se añadieron 300 μ L de medio de cultivo para inactivar a la tripsina y se tomó una alícuota de 20 μ L de homogenizado de células resuspendidas en el medio de cultivo y mezclada en una relación 1:1 con el colorante azul de tripano. De esta mezcla se tomaron 10 μ L que fueron cargados 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).

9.3.2. Ensayo de la actividad de la enzima β -galactosidasa (SA- β -gal)

Se preparó una solución de X-gal con 0.1 mL de X-gal (Promega ®), 1 mL de buffer de ácido cítrico/fosfato de sodio 0.2M pH=6, 0.25 mL de ferrocianuro y ferricianuro de potasio (100 mM), 0.15 mL de NaCl (5M), 10 μ L de MgCl₂ (1M) y 3.35 mL de agua estéril para 5 mL de solución.

Se retiró el medio de cada pozo y se realizaron 2 lavados con DPBS, se agregaron 100 μ l de formaldehído al 4% durante 10 min para fijar las células.

Transcurrido este tiempo, nuevamente se realizaron dos lavados con DPBS. Se agregaron 300 μ l de la solución X-gal. Las células fueron incubadas libres de CO₂ durante 24 h a 37°C. Pasado ese tiempo, las células fueron lavadas en una ocasión con DMSO y posteriormente se realizaron dos lavados más con DPBS. Después fueron observadas al microscopio y se contaron campos de 100 células para determinar el porcentaje de células positivas a β -galactosidasa.

9.3.3. Expresión de p16, p21 y β -Galactosidasa por inmunocitoquímica

Las células fueron sembradas en cubreobjetos, las células se lavaron con DPBS 2 veces antes de ser fijadas con formalina neutra (Formaldehído 4% en DPBS) durante 10 min. La formalina fue removida y las células fueron lavadas nuevamente con DPBS e incubadas durante 15 min con 300 μ L de bloqueador universal de proteínas. Posteriormente las células fueron lavadas con DPBS-tween; todos los anticuerpos fueron diluidos en DPBS-tween.

- p16 y p53

Se añadieron 100 μ L del anticuerpo anti-p16-conejo (*Santa Cruz Biotechnology*®), en dilución 1:100 durante 1 h. Posterior a la hora, las células fueron lavadas 2 veces con DPBS-tween y se añadieron 100 μ L del anticuerpo anti-p53-ratón (*abcam*®) en dilución 1:200 durante 1 h. Seguido de 4 lavados con DPBS-tween; se añadieron 100 μ L del anticuerpo secundario *Alexa Fluor*® 488 anti-conejo en dilución 1:500 durante 1 h. Se realizaron 3 lavados con DPBS-tween y se añadieron 100 μ L del anticuerpo secundario *Alexa Fluor*® 594 anti-ratón en dilución 1:500 durante 1 h.

Transcurrida la hora nuevamente se realizaron 4 lavados más con DPBS-tween. Las células fueron montadas en portaobjetos con 20 μ L de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) en glicerol. Las laminillas fueron analizadas en un microscopio confocal *Carl Zeiss* modelo LSM 780 NLO.

- p21 y β -gal

Se añadieron 100 μ L del anticuerpo anti-GLB-conejo (*Santa Cruz Biotechnology*[®]), en dilución 1:100 durante 1 h. Posterior a la hora, las células fueron lavadas 2 veces con DPBS-tween y se añadieron 100 μ L del anticuerpo anti-p21-ratón (*abcam*[®]) en dilución 1:200 durante 1 h. Seguido de 4 lavados con DPBS-tween ; se añadieron 100 μ L del anticuerpo secundario *Alexa Fluor*[®] 488 anti-conejo en dilución 1:500 durante 1 h. Se realizaron 3 lavados con DPBS-tween y se añadieron 100 μ L del anticuerpo secundario *Alexa Fluor*[®] 594 anti-ratón en dilución 1:500 durante 1 h. Transcurrida la hora nuevamente se realizaron 4 con DPBS-tween. Las células fueron montadas en portaobjetos con 20 μ L de DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) en glicerol. Las laminillas fueron analizadas en un microscopio confocal *Carl Zeiss* modelo LSM 780 NLO.

9.4. Evaluación del metabolismo energético

9.4.1. Capacidad de la actividad glucolítica

Las determinaciones de la tasa glucolítica se realizaron el día 9 posterior a la inducción de senescencia. El ensayo se realizó en el analizador de flujo extracelular Seahorse XF 24.

Un día antes del ensayo se hidrató el cartucho (XF24 sensor cartridges100850-001) con 1 mL de medio calibrante y se incubó a 37°C sin CO₂ (Seahorse XF Calibrant Solution 100850-001).

El día del ensayo se retiró el medio de las células y fueron lavadas en dos ocasiones con medio de ensayo (Seahorse XF Base Medium 103335-100) suplementado con 400 µL de Glucosa, 1 mL de Piruvato, 1mL de L-Glutamina y 500 µL de HEPES por cada 100 mL de medio, posteriormente se agregaron 500 µL de medio de ensayo e incubadas durante 45 min sin CO₂. Pasado este tiempo se retiró el medio y se agregó nuevamente medio de ensayo.

Después de la incubación se midió la tasa glucolítica utilizando el kit Agilent Seahorse XF Glycolitic Rate Assay que que cuantifica la acidificación del medio celular (H⁺). Los resultados fueron normalizados por µg/mL de proteína por pozo.

9.4.2. Evaluación de la capacidad respiratoria celular

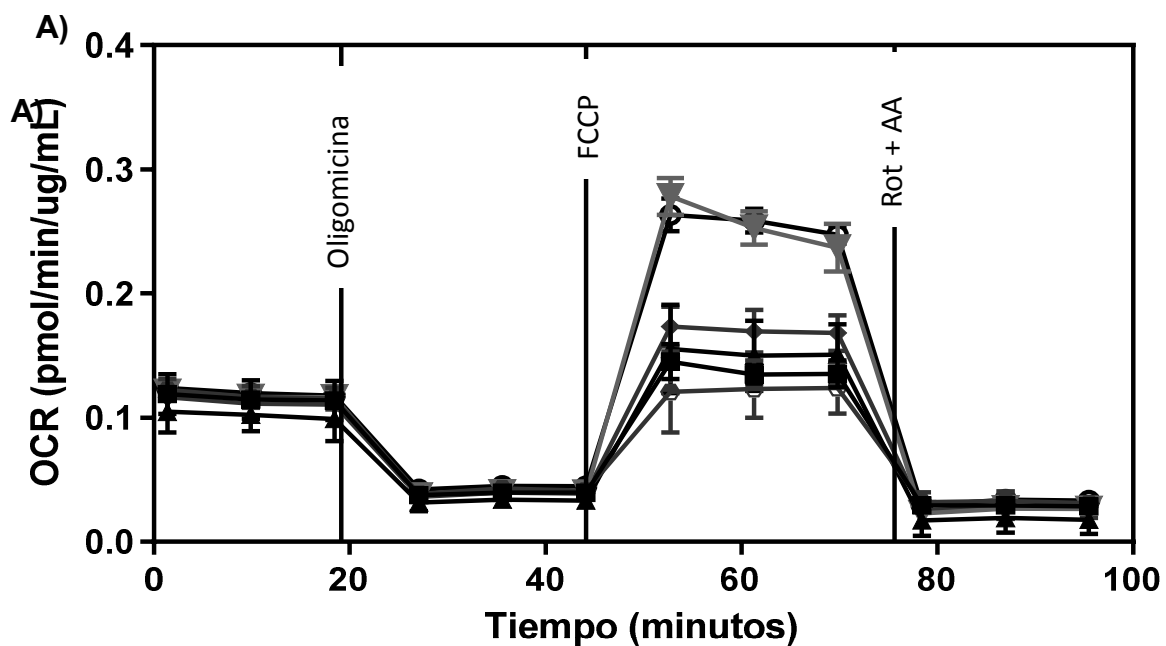
La determinación de la capacidad respiratoria celular se realizó el día 9 posterior a la inducción de senescencia. El ensayo se realizó en el analizador de flujo extracelular Seahorse XF 24.

Un día antes del ensayo, se hidrató el cartucho (XF24 sensor cartridges100850-001) con 1 mL de medio calibrante y se incubó a 37°C sin CO₂ (Seahorse XF Calibrant Solution 100850-001).

El día del ensayo se retiró el medio de las células y fueron lavadas en dos ocasiones con medio de ensayo (Seahorse XF Base Medium 103335-100)

suplementado con 400 μL de Glucosa, 1 mL de Piruvato, 1 mL de L-Glutamina por cada 100 mL de medio, posteriormente se agregaron 500 μL de medio de ensayo e incubadas durante 45 min sin CO_2 .

Para el análisis de la capacidad respiratoria mitocondrial se utilizó el kit comercial Seahorse XF Cell Mito Stress (103015-100) según las indicaciones del fabricante. Para determinar la concentración de FCCP y el número de células necesarias para este ensayo, se realizó la estandarización previa al ensayo. Se sembraron 30,000 células en las placas Seahorse XF 24 (figura 1). Este ensayo mide el consumo de Oxígeno celular y los resultados fueron normalizados por $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína.



Número de células y concentración de FCCP

- | | | |
|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| ■ 3x10 ⁴ 0.25 μM | ▲ 3x10 ⁴ 0.5 μM | ▼ 3x10 ⁴ 1 μM |
| ● 4x10 ⁴ 0.25 μM | ◆ 4x10 ⁴ 0.5 μM | ⊖ 4x10 ⁴ 1 μM |

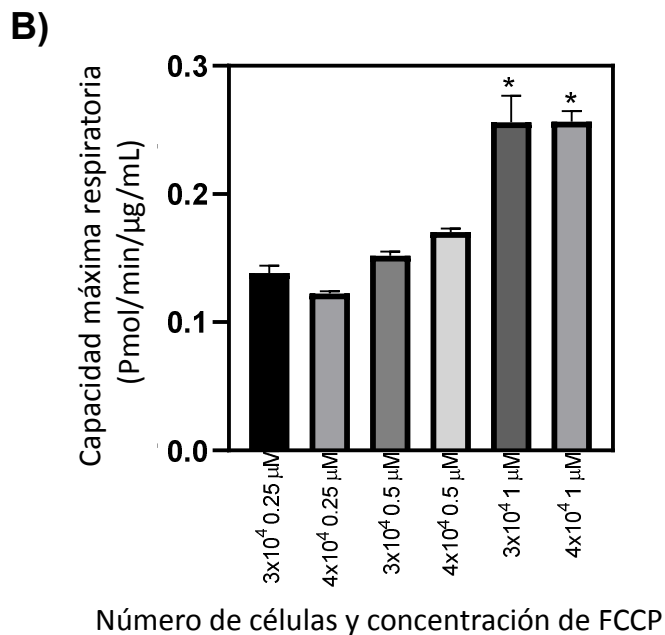


Figura 1. Estandarización de la concentración de FCCP y Número de células. A) Tasa de consumo de oxígeno que muestra la condición basal y los cambios posteriores a las adiciones secuenciales de: oligomicina (para bloquear la síntesis de ATP), el desacoplador FCCP (para estimular la respiración) y antimicina A (para bloquear la cadena de transporte de electrones en el complejo III). B) Comparación de la respiración máxima con las distintas concentraciones de FCCP. La grafica muestra el resultado de tres experimentos independientes, n=9. Los datos se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$. * diferencias significativas entre grupos.

9.5. Evaluación del Estado REDOX

9.5.1. ERO intracelular

Se utilizó 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) que penetra en las células. Se trata de una forma de fluoresceína reducida químicamente que se utiliza como indicador de ERO en las células. Tras la disociación de los grupos de acetato por parte de las esterasas intracelulares y la oxidación, el H₂DCFDA no fluorescente se convierte en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente. Las determinaciones se realizaron en el día 9 posterior a la inducción.

Se retiró el medio de las células y fueron lavadas en dos ocasiones con 3 mL de DPBS, posteriormente se agregó 1 mL de tripsina durante 5 min. Pasado este tiempo, se neutralizó la tripsina con 2 mL de medio y las células fueron recuperadas

en un tubo de 15 mL estéril. Las células fueron centrifugadas a 1700 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de DPBS. Las células fueron homogenizadas y cargadas con $1\mu\text{M}$ H₂DCFDA durante 45 min, seguido de varios lavados con DPBS. La intensidad de fluorescencia del DCF oxidado se midió usando un citómetro de flujo FACS Calibur de Becton Dickinson. La intensidad de la fluorescencia se calculó multiplicando el número de eventos por la media de la fluorescencia en un área seleccionada, mediante el programa Cell Quest de Becton Dickinson.

9.5.2. El cociente GSH/GSSG

El cociente GSH/GSSG se midió mediante cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC) (Farris y Reed, 1987). Para estas determinaciones se utilizaron 3×10^6 células en suspensión. Posteriormente, se homogenizaron en 1 mL de ácido perclórico/BPDS y centrifugados a 10,000 g a 4°C por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y fue diluido en una proporción de 1:10 en PBS. 100 μL de cada muestra fueron inyectadas en el sistema de HPLC (Waters 1525), y fueron separadas usando la columna Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 μm . Como fase móvil se utilizó un buffer de fosfato de potasio (KH_2PO_4) 20 Mm y acetonitrilo al 1% con un pH de 2.7. La elución fue analizada por medio de un detector ultravioleta (Waters 2489) a 210 nm. El área bajo la curva se determinó mediante una curva patrón con estándares comerciales de GSH y GSSG (10, 25, 50, 100, 200 y 400 μM). Los datos fueron normalizados mediante cuantificación de proteína y reportados como el cociente entre el glutatión reducido y oxidado.

9.6 Potencial de membrana mitocondrial

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó MitoTracker™ Green FM (Invitrogen®) que se acumule selectivamente en la matriz mitocondrial donde se une covalentemente a las proteínas mitocondriales al reaccionar con grupos tiol libres de residuos de cisteína. Se retiró el medio de las células y fueron lavadas en dos ocasiones con 3 mL de DPBS, posteriormente se agregó 1 mL de tripsina durante 5 min, pasado este tiempo se neutralizó la tripsina con 2 mL de medio y las células fueron recuperadas en un tubo de 15 mL estéril. Las células fueron centrifugadas a 1700 rpm durante 5 min y se retiró el sobrenadante. Al botón celular se le agregó 1 mL de DPBS, las células fueron homogenizadas y cargadas con 1 μ M MitoTracker™ Green FM durante 45 min, seguido de varios lavados con DPBS. El potencial de membrana se midió usando un citómetro de flujo FACS Calibur de Becton Dickinson. La intensidad de la fluorescencia se calculó multiplicando el número de eventos por la media de la fluorescencia en un área seleccionada, mediante el programa Cell Quest de Becton Dickinson.

9.7. Tratamiento estadístico de los datos

Los experimentos se realizaron por triplicado en al menos 3 eventos independientes.

El análisis estadístico cuando se compararon más de dos grupos se realizó por análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$ como criterio mínimo de significancia.

Para la comparación solo entre células senescentes y control, se realizó la prueba t de Student. Las diferencias de $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

10. RESULTADOS

10.1. Validación del estado senescente

10.1.1. Proliferación celular

Para determinar si el tratamiento con H_2O_2 tenía efectos en la proliferación celular, se realizaron curvas dosis-respuesta evaluadas mediante conteo celular. Los resultados obtenidos en el conteo (Figura 2) muestran que las células control presentan una proliferación continua.

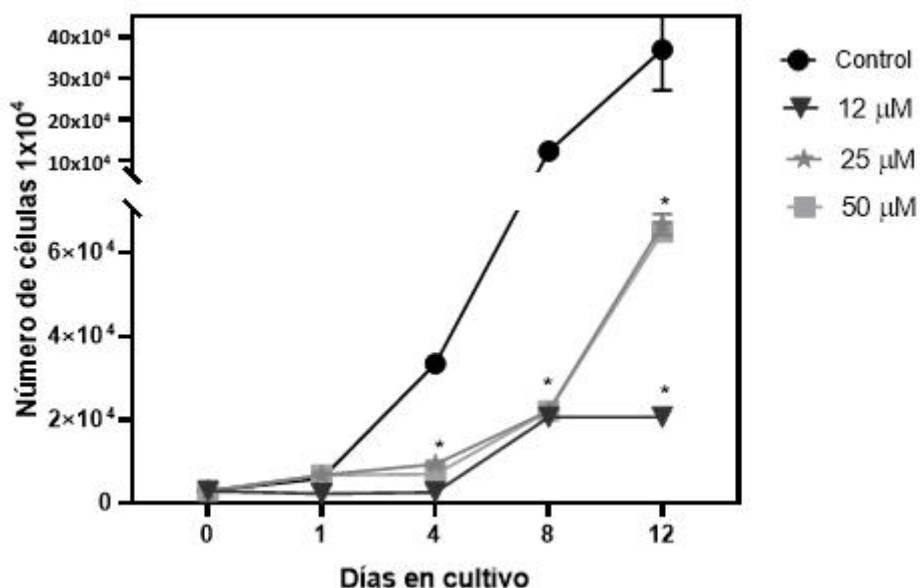


Figura 2. Proliferación celular. Se muestra la proliferación de la línea celular MCF10A comparada con las células expuestas a distintas concentraciones de H_2O_2 en distintos días de cultivo. La gráfica muestra el resultado de tres experimentos independientes, $n=9$. Los datos se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$.

Las células tratadas con 25 y 50 μM de H_2O_2 no mostraron aplanamiento en la curva, aunque la proliferación fue significativamente menor que el control en los días 4 y 8 posteriores a la inducción. Para el día 12, las células tratadas con 25 y 50 μM de H_2O_2 mostraron nuevamente proliferación alcanzando más de 6×10^4 células.

Las células tratadas con 12 μM de H_2O_2 detuvieron su proliferación en octavo día posterior a ser tratadas, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control y con respecto a las concentraciones de 25 y 50 μM de H_2O_2 en el día 12 posterior a la inducción ($p < 0.05$).

10.1.2. Porcentaje de células positivas a β -galactosidasa

Para determinar si las distintas concentraciones de H_2O_2 inducían senescencia celular, se evaluó el porcentaje de células positivas a β -galactosidasa en los días 1, 4, 8 y 12 posteriores a la inducción (Figura 3A). Se observaron diferencias significativas con las distintas concentraciones respecto al control en distintos días de cultivo.

Para el día 1 posterior a la inducción, y de manera estadísticamente significativa, la concentración de 12 μM de peróxido indujo un aumento del 30% de células senescentes en comparación con el control. En el día 4 las concentraciones de 12 y 25 μM presentaron una diferencia de más del 50% de células senescentes respecto al control.

En el día 8 posterior a la inducción, el porcentaje de células senescentes para la concentración de 25 μM disminuyó 20% respecto a sí misma, mientras que la concentración de 12 μM de peróxido aumentó un 5%. Para el día 12 posterior a la

inducción las tres concentraciones de peróxido mostraron diferencias significativas respecto al control. Así mismo, se observaron cambios en la morfología de las células tratadas (Figura 3B) donde se puede observar un aumento en el tamaño de las células senescentes, así como una morfología vacuolar que evidencian un fenotipo senescente en las células tratadas con 12 μM de H_2O_2 .

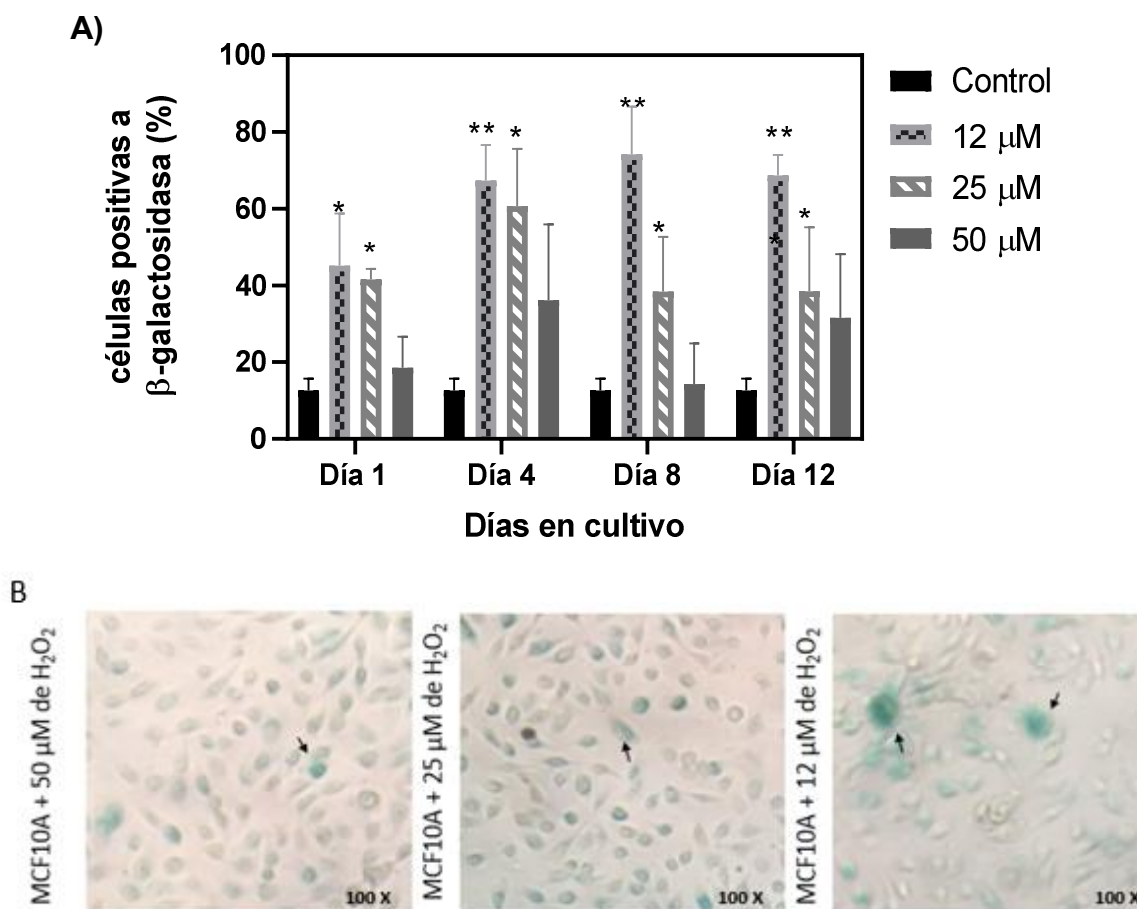


Figura 3. Células positivas a SA- β -galactosidasa. A) Porcentaje de células positivas a β -galactosidasa en tres experimentos independientes, *, ** diferencias significativas respecto al control, $p > 0.05$. B) Células positivas a β -galactosidasa posterior a la inducción de senescencia a distintas concentraciones en la línea celular MCF10A en el día 8 de cultivo, las flechas muestran células positivas al ensayo SA- β -galactosidasa.

Con estos resultados, se decidió usar la concentración de 12 μM para inducción por SIPS y continuar con los demás análisis.

10.1.3. Expresión de marcadores de senescencia

Para confirmar si la inhibición de la proliferación y la expresión de la enzima β -galactosidasa con 12 μM de H_2O_2 estaba asociada con el fenómeno de senescencia, se evaluó la expresión de marcadores clásicos de éste fenómeno: los inhibidores de ciclo celular p16 y p21, la proteína p53 y la enzima β -galactosidasa, utilizando la técnica de inmunocitoquímica. En las imágenes obtenidas por microscopia confocal (Figura 3A y 3B) se observa un aumento gradual de p21, p53 y β -galactosidasa en las células senescentes inducidas por SIPS con respecto al tiempo de cultivo. Además, se observa una colocalización de p21 con DAPI, sugiriendo la translocación de éste en el núcleo. Pero no así para p16 pues las imágenes no muestran la presencia del inhibidor.

Estos datos muestran que la concentración de peróxido para inducir senescencia en la línea celular MCF10A es 12 μM durante 2 horas, ya que presenta claramente los marcadores del estado senescente. Debido a que el establecimiento de la senescencia era evidente al día 8 de cultivo, se determinó realizar los siguientes experimentos un día después, el día 9, posterior al establecimiento de la senescencia.

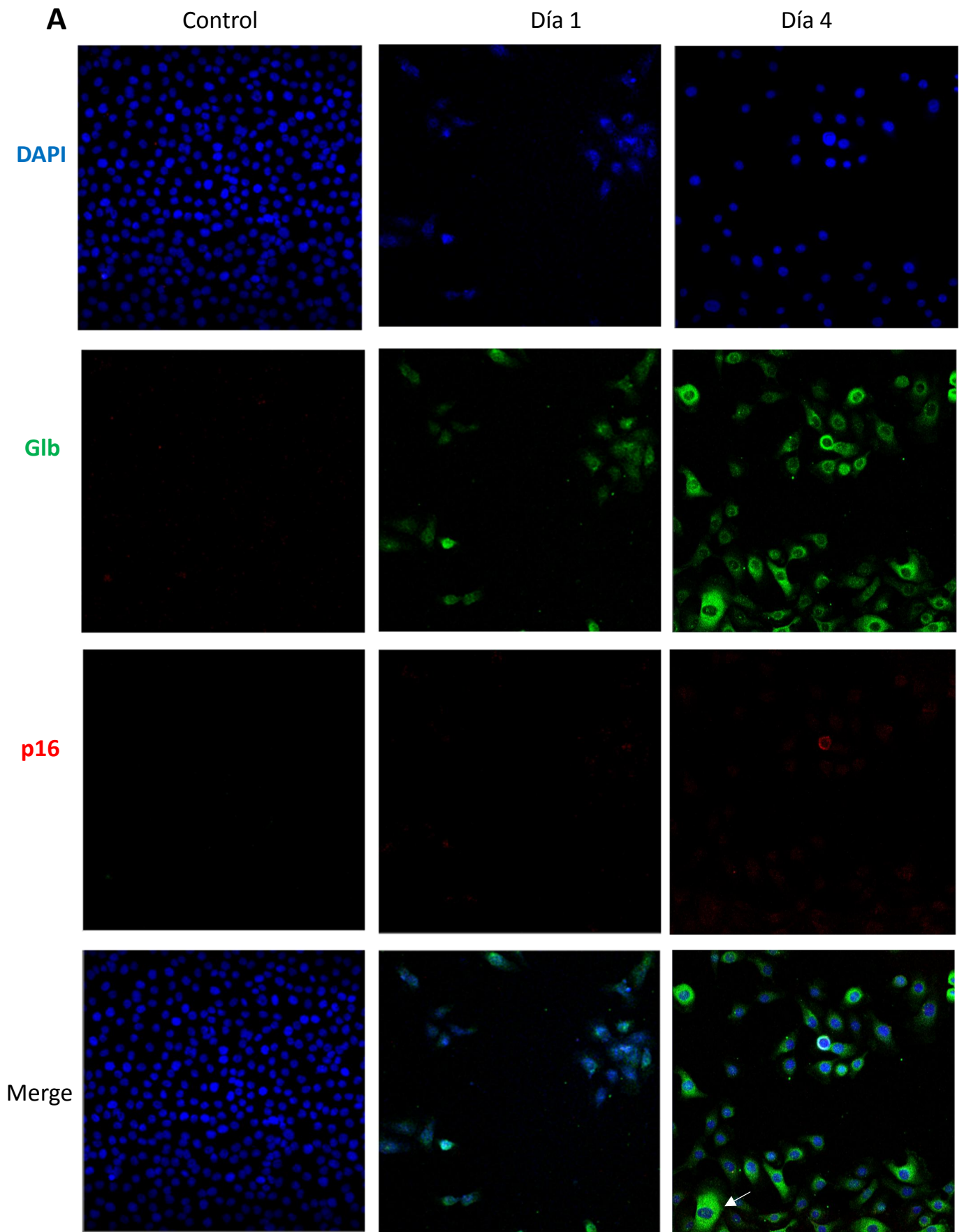


Figura 4A. Inmunocitoquímicas para validar el estado senescente en la línea celular MCF10A inducida con 12 μ M de peróxido. Evaluación de p16 (rojo), Glb (verde) y los núcleos con DAPI (azul). Las imágenes se encuentran en un aumento 200X.

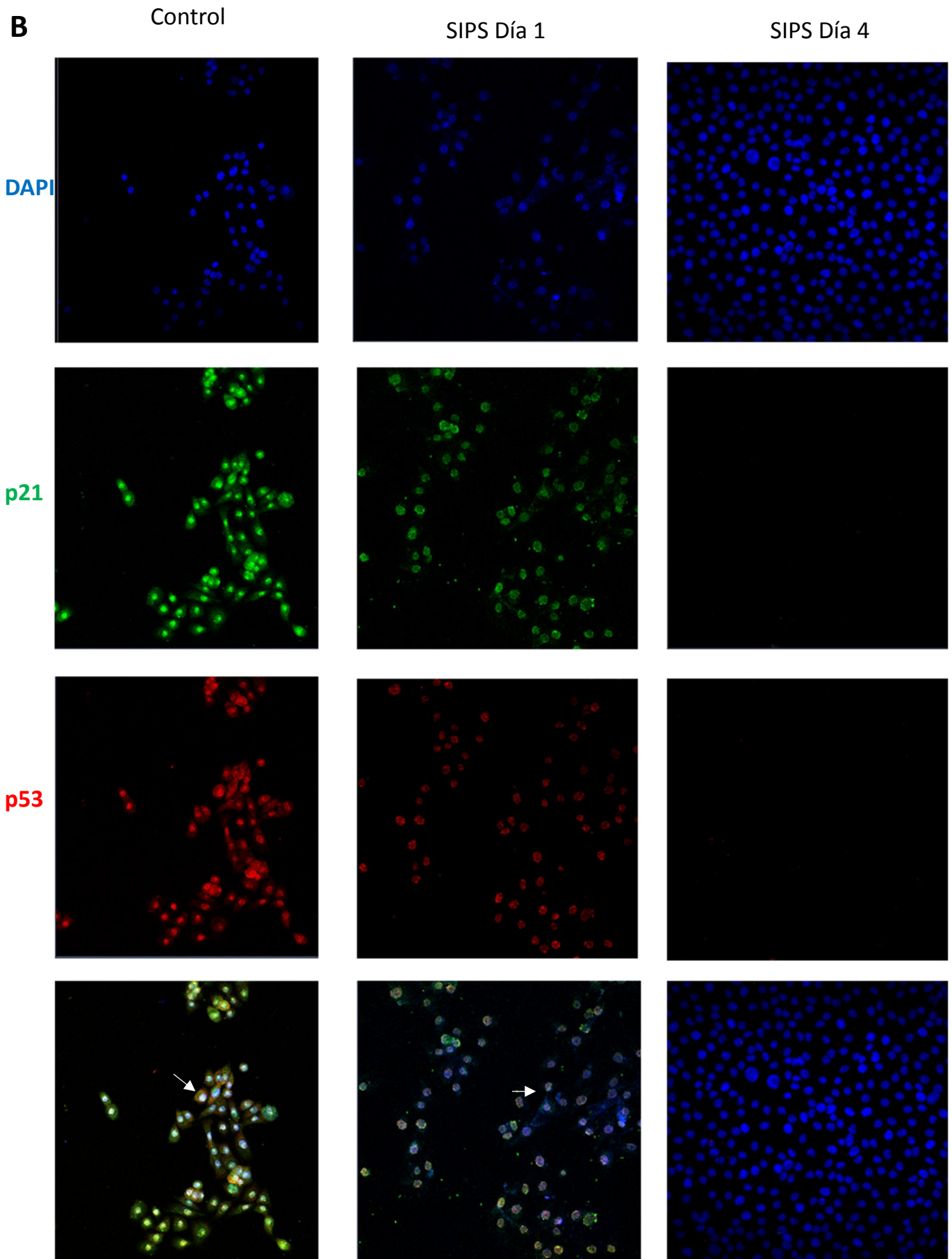


Figura 4B. Inmunocitoquímicas para validar el estado senescente en la línea celular MCF10A inducida con 12 μ M de peróxido. Evaluación de p53 (rojo), p21 (verde) y los núcleos con DAPI (azul). Las imágenes se encuentran en un aumento 200X.

10.2. Evaluación del metabolismo energético

10.2.1. Capacidad de la actividad glucolítica

Las células fueron incubadas en medio rico en glucosa para que las células a través de la ruta glucolítica la convierte en piruvato, produciendo ATP, NADH, agua y protones.

La extrusión de protones en el medio circundante provoca un rápido aumento de la acidificación del medio. Esta respuesta inducida por la glucosa se informa como la tasa de glucólisis en condiciones basales. En la figura 5A podemos observar que la inyección de oligomicina, que es un inhibidor de la ATP sintasa, Inhibe la producción mitocondrial de ATP, y cambia la producción de energía a la glucólisis, con el aumento subsiguiente en la ECAR que revela la capacidad glucolítica máxima celular.

La ECAR fue calculada y registrada automáticamente por el software Seahorse. La inyección final fue 2-desoxi-glucosa (2-DG), un análogo de la glucosa, que inhibe la glucólisis a través de la unión competitiva a la glucosa hexoquinasa que es la primera enzima en la vía glucolítica. ECAR, antes de la inyección de glucosa, se denomina acidificación no glucolítica; causada por procesos en la célula distintos de la glucólisis.

Podemos observar (figura 5B) que existe una diferencia significativa en la tasa glucolítica de células senescentes respecto al control, con un aumento de más del 10% sugiriendo que las células senescentes tienen predilección por la vía glucolítica para la producción de ATP.

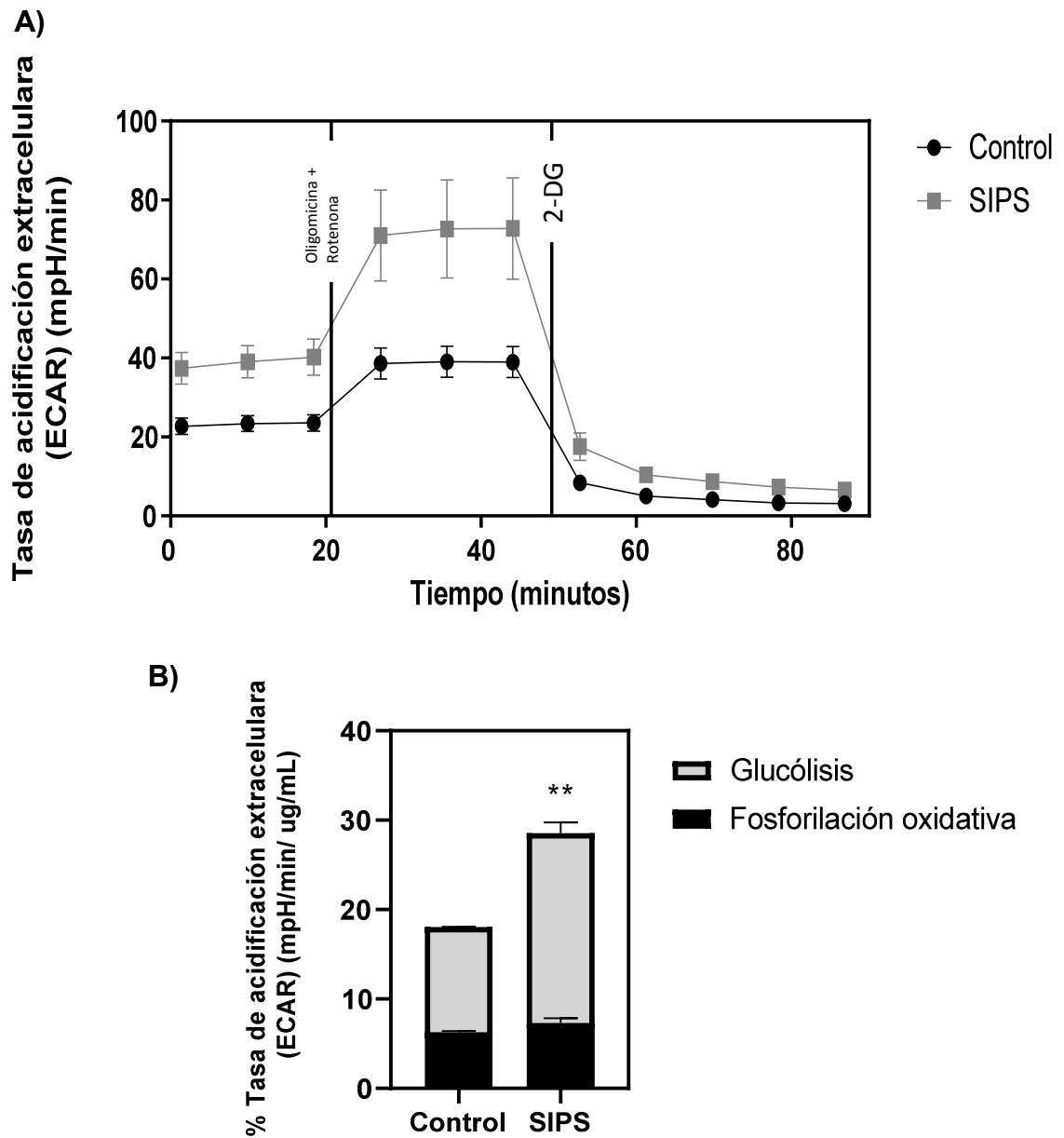


Figura 5. Evaluación de la tasa glucolítica medida por el analizador de flujo extracelular Seahorse. A) Diagrama representativo de un ensayo de la tasa glucolítica; B) Las tasas de acidificación del medio se midió utilizando los datos generados en la Fig. 5A. La acidificación producida por la fosforilación fue la medida antes de la inyección de Oligomicina + Rotenona y la glucolítica posterior a su inyección. Los datos son la media \pm desviación estándar $n=10$ en 2 experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se evaluaron con una prueba t de Student. Las diferencias de $p < 0.05$ se consideran significativas; * Diferencias respecto al control.

10.2.2. Evaluación de la capacidad respiratoria celular

La capacidad respiratoria de las células senescentes se determinó midiendo la tasa de consumo de oxígeno de estas células. La figura 6A muestra un ensayo representativo del el consumo de oxígeno respecto al tiempo. El equipo realiza inyecciones secuenciales de compuestos que miden la respiración basal, la producción de ATP, la fuga de protones, la respiración máxima, la capacidad respiratoria reserva y la respiración no mitocondrial.

La primera inyección fue de oligomicina, que es un inhibidor del complejo V de la cadena de transporte de electrones, provocando la disminución de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) luego de la inyección que se correlaciona con la respiración mitocondrial asociada con la producción de ATP celular. Este efecto se observa claramente en la figura 6A.

La segunda inyección consistió de encarbonil-cianuro-4(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), un agente de desacoplamiento que colapsa el gradiente de protones y abate el potencial de membrana mitocondrial, produciendo un aumento en el consumo de oxígeno. Como resultado, el flujo de electrones a través de la CTE no está inhibido y el complejo IV consume el oxígeno al máximo, podemos observar que el FCCP tiene efectos sobre el consumo de oxígeno tanto en las células control como en las células senescentes.

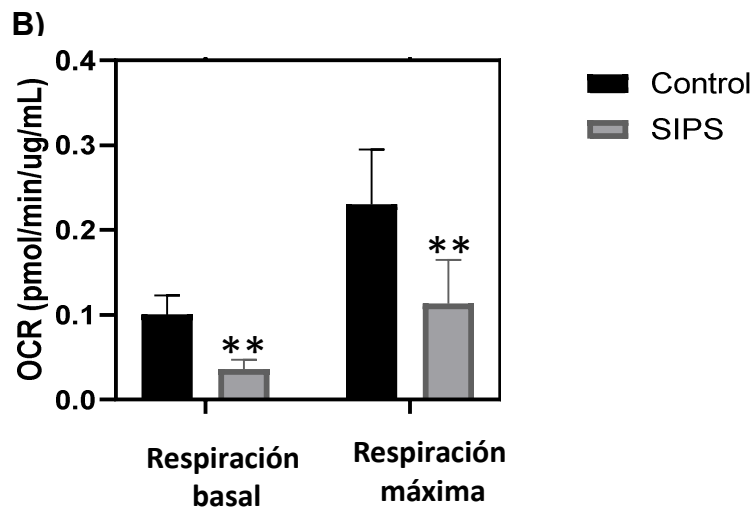
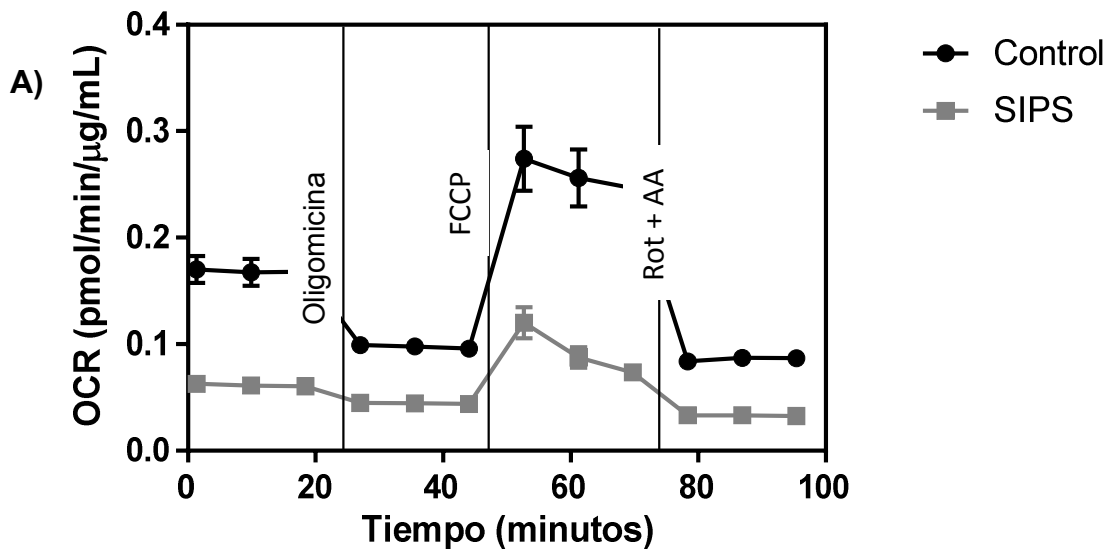


Figura 6. Evaluación de la tasa de consumo de oxígeno medida por el analizador de flujo extracelular Seahorse. A) Diagrama representativo de un ensayo de consumo de oxígeno; B) Se muestra del lado derecho la respiración basal de las células MCF10A y SIPS y del lado izquierdo la respiración máxima celular. Las diferencias estadísticas se evaluaron con una prueba t de Student. Las diferencias de $p < 0.05$ se consideran significativas; ** Diferencias respecto al control.

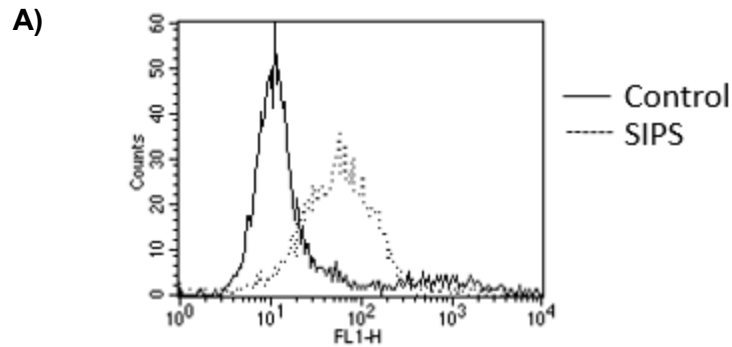
El consumo de oxígeno basal de células epiteliales MCF10A senescentes se encontró disminuido 0.005 pmoles más bajo que el control. Cuando se evaluó la capacidad máxima de consumo de oxígeno posterior a la inyección de FCCP, las células senescentes mostraron una tasa 0.1 pmoles más baja que el control, esto nos indica que la capacidad de consumo de oxígeno en las células senescentes se encuentra disminuido (Figura 5B).

10.3. Estado redox

10.3.1. ERO intracelular

La figura 7A muestra un esquema representativo del ensayo de oxidación de H₂DCFDA. Tras la escisión de los grupos acetato por esterasas intracelulares y oxidación, el H₂DCFDA no fluorescente se convierte en DCF altamente fluorescente al ser oxidado y donar su electrón al H₂O₂. Dado que la emisión del colorante fluorescente es de aproximadamente 529 nm, se midió en el canal FL-1 mediante citometría de flujo.

Podemos observar que la intensidad de fluorescencia de las células senescentes es mayor que las células control debido al desplazamiento hacia la derecha observado en la figura 7A, Las células senescentes muestran una producción intracelular de ERO 300% mayor respecto al control (Figura 7B).



DCF

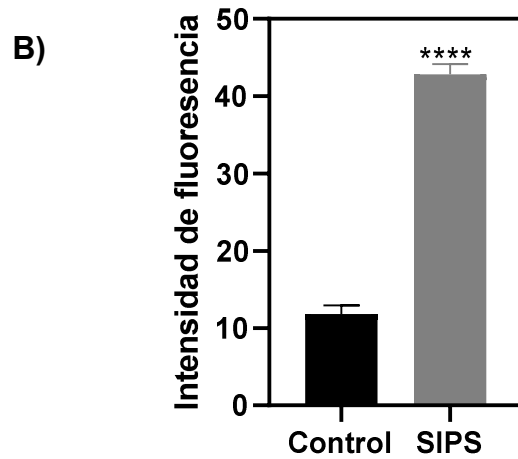


Figura 7. Evaluación de ERO intracelulares. A) Imagen representativa de un ensayo de oxidación de H₂DCFDA; B) Se muestran las diferencias en la producción de ERO intracelulares de células senescentes comparadas con el control. Las diferencias estadísticas se evaluaron con una prueba t de Student. Las diferencias de $p < 0.05$ se consideran significativas; **** Diferencias respecto al control

10.3.2. Potencial de membrana mitocondrial

La figura 8A muestra una imagen representativa del ensayo, las mitocondrias que no tienen dañada la membrana retienen la fluorescencia verde, cuando se pierde la integridad se observa una disminución en la intensidad de la fluorescencia, esto se

observa como un desplazamiento hacia la izquierda en el canal FL-1H del citómetro, esto es evidente en la figura 8A donde podemos observar este desplazamiento.

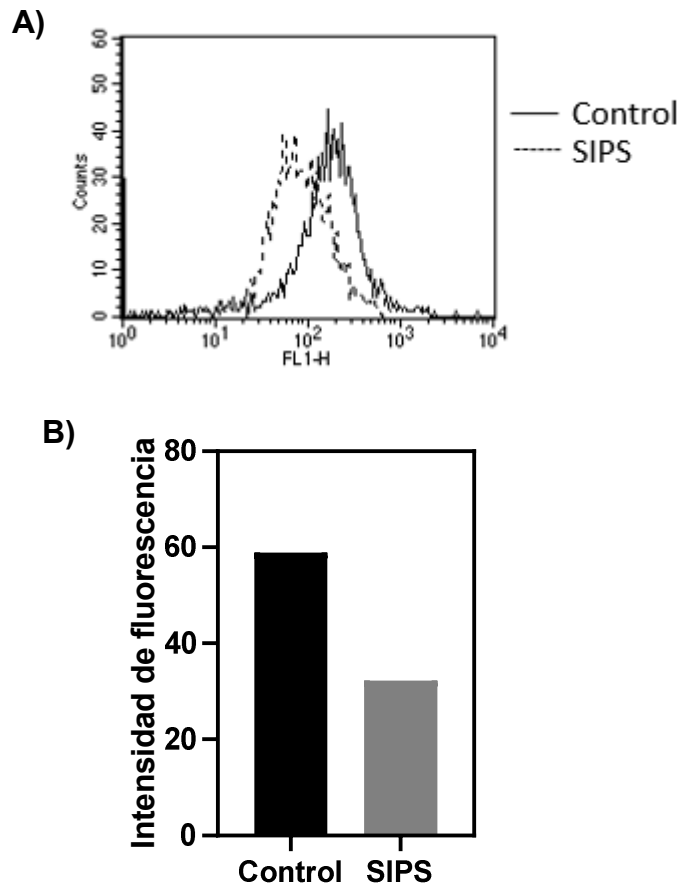


Figura 8. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial. A) Imagen representativa de un ensayo Mitotracker Green en citometría de flujo; B) Se muestran las diferencias en el potencial de membrana de células senescentes comparadas con el control. No se muestran diferencias significativas debido a que se muestra un experimento por unplicado con una n=4.

La pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial, se relaciona con la disminución en la capacidad de la mitocondria para mantener el potencial de la membrana, en la figura 8B se observa que las células senescentes aparentemente disminuyen su potencial de membrana.

10.3.3. Cociente de Glutación

Se determinó la relación glutación reducido/glutación oxidado (GSH/GSSG) tanto en células control como en células SIPS. No hubo diferencias al comparar GSH y GSSG entre el grupo control y las células senescentes (Figura 9A y 9B), pero al evaluar el cociente tal como se muestra en la figura 9C si se observó diferencia estadísticamente significativa. El paso de GSH a GSSG se da durante la conversión de peróxido a agua en la célula.

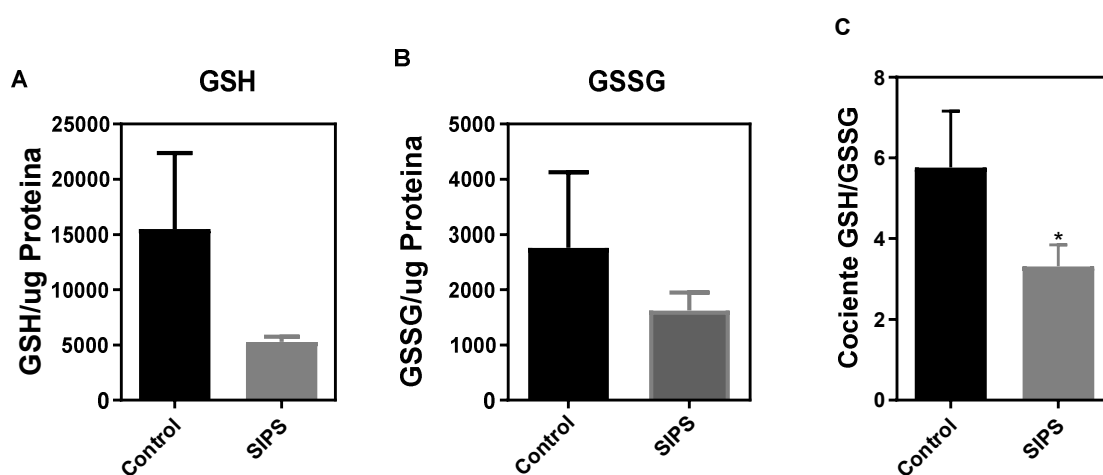


Figura 9. Glutación. A) Glutación reducido. B) Glutación oxidado. C) Coeficiente de glutación oxidado y reducido, se muestran las diferencias respecto al control. Las diferencias estadísticas se evaluaron con una prueba t de Student. Las diferencias de $p < 0.05$ se consideran significativas; * Diferencias respecto al control.

El GSH/GSSG de las células senescentes es menor en casi un 50% respecto al control, lo que puede interpretarse como una baja capacidad de las células senescentes para mantener un equilibrio en el estado redox y favorecer un estado pro-oxidante.

11. DISCUSIÓN

La senescencia *in vitro* puede ser inducida por diferentes estímulos (Muñoz y Serrano, 2014). Los agentes oxidantes del metabolismo celular o los agentes oxidantes conocidos (por ejemplo, H₂O₂) pueden causar senescencia (Hernández, 2017; Dumont *et al.*, 2000) ejerciendo su efecto en parte a través del daño en el ADN, además de que otros componentes y procesos celulares también se ven afectados. La inducción de senescencia con H₂O₂ es utilizado como un modelo de inducción de senescencia, SIPS, para distintos tipos celulares (Maciel-Barón *et al.*, 2016; Marazita *et al.*, 2016; Kiyoshim *et al.*, 2012). En este estudio se encontró que la concentración de 12 µM de H₂O₂ indujo senescencia en la línea de células epiteliales de mama MCF10A. Esta concentración es baja si se compara con 75µM de H₂O₂ en estudios previos con fibroblastos de pulmón de ratón (López-Diazguerrero *et al.*, 2006). Existen diferencias en la respuesta al estrés entre los diferentes tipos celulares, sin embargo se desconoce por qué las células epiteliales pareciera que son menos resistentes al estrés oxidante que los fibroblastos, lo que pudiera explicar su participación en diversas patologías como el cáncer.

A medida que el estrés de bajo grado se vuelve crónico, pueden aparecer células senescentes en los tejidos como parte de la remodelación del tejido para evitar su destrucción por apoptosis (Muñoz y Serrano, 2014). En la figura 2 podemos observar que concentraciones de H₂O₂ como 25 y 50 µM no lograron inducir senescencia, sin embargo, el cambio en la proliferación puede deberse a que las

células epiteliales sometidas a estrés oxidante elevado presentaron muerte por apoptosis para evitar posibles efectos perjudiciales (Georgakopoulou *et al.*, 2016; Thompson, 1995), y las células que resistieron fueron las que eventualmente proliferaron de manera similar al control.

El H₂O₂ causa daño al ADN, que es reconocido por las proteínas sensoras que reclutan cinasas que luego activan reguladores como p53, lo que en última instancia produce una regulación a la alza de los efectores posteriores de la detención del ciclo celular, como p21 (el objetivo principal de p53) (Herbig *et al.*, 2004, Rodríguez y Meuth, 2006). En nuestro trabajo debido a la presencia de p21 y p53 evidenciada por inmunocitoquímicas podemos decir que el establecimiento de la senescencia de la línea epitelial MCF10A es por la vía p53-p21, a diferencia de lo reportado en fibroblastos dónde se ha observado una expresión de p53 que está acompañada con un aumento en la expresión de p16 (Rudolf *et al.*, 2012). Además de la presencia de estos marcadores en las células senescentes, también se evidenció una morfología característica y la actividad de la enzima β -galactosidasa (Hayflick y Moorhead, 1961; Dimri *et al.*, 1995; Kurz *et al.*, 2000; Rodier *et al.*, 2009).

El papel de p53 en la regulación del metabolismo celular es complejo dados los muchos genes que están bajo su control transcripcional. Más allá de establecer la detención proliferativa de las células senescentes, p53 también juega un papel importante en la regulación de la glucólisis (Kruiswijk *et al.*, 2015; Puzio-Kuter, 2011). p53 antagoniza la captación de glucosa al disminuir la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4) y promueve la fosforilación oxidativa

mitocondrial al inducir la expresión de la síntesis de citocromo c oxidasa 2 (SCO2), inhibiendo la piruvato deshidrogenasa quinasa 2 (PDK2) a través de la activación de Parkin (PARK2) y promoviendo la oxidación de ácidos grasos (Ide *et al.*, 2009; Matoba *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011). Por lo tanto, p53 probablemente actúa para limitar la actividad glucolítica de las células senescentes, y en particular, p53 también limita la extensión del SASP (Coppe *et al.*, 2008), sugiriendo que el SASP está al menos parcialmente regulado por la glucólisis.

Sin embargo la actividad de p53 es mucho más compleja pues puede promover la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Esta complejidad puede deberse a la capacidad de p53 para regular muchas vías celulares diferentes, y por lo tanto su pérdida puede causar alteraciones en el metabolismo que pueden tener efectos en casi todos los aspectos del comportamiento celular (es decir, la proliferación, el crecimiento y la supervivencia) en condiciones de aumento y disminución. Además, la diferencia entre los niveles basales de p53 frente a los niveles aumentados de p53 durante el estrés severo o sostenido podría permitir la transcripción de diferentes conjuntos de genes, así como contextos específicos de la célula

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, observamos que las células epiteliales de mama senescentes tienen un aumento en la glucólisis, con una disminución en el consumo de oxígeno. A pesar de que el establecimiento de la senescencia inducida por estrés oxidante en MCF10A pareciera es por la vía p53-p21.

Durante el establecimiento de la senescencia se han observado cambios en la masa mitocondrial así como el cambio hacia un estado más glucolítico de producción

de ATP que aparecen como respuestas compensatorias a la disfunción mitocondrial (Hutter et al, 2014). Evidentemente, la aparición temprana de disfunción mitocondrial durante la inducción de la senescencia celular podría desencadenar una serie de respuestas celulares y vías de señalización diferentes, así como reducir la capacidad para responder a las demandas de energía.(Dorr *et al.*, 2013; Aird *et al.*, 2013; Mazurek *et al.*, 2001; Zwerschle *et al.*, 2003). Por ejemplo, hay quienes reportan que las células senescentes tienen preferencia por un metabolismo más glucolítico, y otros que van más hacia la fosforilación oxidativa (Bittles and Harper, 1984; James *et al.*, 2015; Omata *et al.*, 2001; Kondoh *et al.*, 2007) y esto en gran parte puede depender del tipo celular y el modelo de inducción de senescencia, La disfunción mitocondrial tiene un efecto profundo en la bioenergética celular debido a que existe un aumento de la masa mitocondrial que se refleja en una tasa de consumo de oxígeno absoluto significativamente mayor por célula en la senescencia así también en células senescentes la fracción de ATP producida por la fosforilación oxidativa mitocondrial disminuye, mientras que la glucólisis genera relativamente más ATP (Korolchuk *et al.*, 2017; Hutter *et al.*, 2004).Nuestros resultados mostraron una disminución en el consumo de oxígeno de las células MCF10A senescentes, pero un estado más glucolítico respecto al control, por lo que es importante evaluar la fisiología mitocondrial de las celuklas senescentes MCF10A para hacer una relación entre el tamaño mitocondrial y el consumo de oxígeno.

Por otra parte se han observado cambios en la función mitocondrial de las células senescentes, con producción elevada de ERO (Yoon *et al.*, 2006; Ishihara *et*

al., 2006; Blagosklonny 2006; Gems 2013). En mitocondrias funcionales, el consumo de oxígeno, la producción de ATP, el potencial de membrana y la generación de ERO están estrictamente regulados para mantener el equilibrio redox (Brand, 2016). Si bien no existe una correlación simple entre el potencial de membrana y la producción de superóxido por la cadena de transporte de electrones, las mitocondrias que se acumulan en la senescencia a menudo muestran un potencial de membrana disminuido y al mismo tiempo producen niveles aumentados de ERO. Al evaluar la producción intracelular de ERO pudimos observar que las células senescentes tenían una producción mayor, y a su vez una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial que corresponde con lo reportado por otros autores ((Passos *et al.*, 2007; Korolchuk *et al.*, 2017).

La función antioxidante de glutatión se debe a su participación en las vías enzimáticas que las células han desarrollado contra las ERO. El GSH y las enzimas dependientes de GSH actúan en cooperación para eliminar ERO y/o neutralizar su efecto oxidante tóxico. Bajo condiciones de estrés oxidante, el GSH se oxida a GSSG; por lo tanto, la relación GSH/GSSG se altera (Zitca *et al.*, 2012). El coeficiente de Glutatión observado en nuestras células senescentes fue menor respecto al control lo cual nos habla de una disminución en la eficiencia del glutatión para actuar como un agente reductor. Por lo cual la célula se ve sometida a un estrés oxidante mayor ya que igual observamos que la producción de ERO esta elevada en estas células.

12. CONCLUSIÓN

Se logró tener un modelo de inducción prematura por estrés oxidante, SIPS, en células MCF10A con una concentración baja de 12 μM de H_2O_2 . La inducción de senescencia de manera prematura, pareciera es por la vía p53-p21. También se determinó en nuestro modelo la detención de la proliferación celular, la sobreexpresión de la enzima β -galactosidasa y el aumento en el tamaño de estas células.

Una vez establecido el estado senescente, estas células presentaron una tasa glucolítica elevada acompañada de un consumo de oxígeno por debajo del control.

Las células epiteliales de mama senescentes presentan una producción elevada de ERO, esta producción pudiera relacionarse con la disminución del potencial de membrana mitocondrial, así como con la disminución en la capacidad antioxidante del glutatión.

13. PERSPECTIVAS

Evaluar el metabolismo energético de distintos tipos celulares inducidos a senescencia y compararlos con los obtenidos en este trabajo.

Evaluar enzimas antioxidantes de células epiteliales de mama senescentes para evaluar si existe diferencia con los niveles de glutatión.

Evaluar la dinámica mitocondrial para relacionar la producción de ERO y potencial de membrana observados en este trabajo.

14. REFERENCIAS

1. Aird, K. M., Zhang, G., Li, H., Tu, Z., Bitler, B. G., Garipov, A., Zhang, R. (2013). Suppression of Nucleotide Metabolism Underlies the Establishment and Maintenance of Oncogene-Induced Senescence. *Cell Reports*, 3(4), 10.1016/j.celrep.2013.03.004.
2. Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *cell*, 120(4), 483-495.
3. 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.
4. Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A. F., Signoretti, S., Hathaway, N. A., Sharpless, N. E., ... & DePinho, R. A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature*, 419(6903), 162.
5. Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(5), 961-976.
6. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Glycolysis is an energy-conversion pathway in many organisms. *Biochemistry*. 5th ed. New York: WH Freeman.
7. Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress?. *Metabolismo*, 49(2), 3-8.
8. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
9. Bittles, A. H., & Harper, N. (1984). Increased glycolysis in ageing cultured human diploid fibroblasts. *Bioscience reports*, 4(9), 751-756.
10. Blagosklonny, M. V. (2006). Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell cycle*, 5(18), 2087-2102.

11. Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M., & Guarente, L. (2003). Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38966-38969.
12. Brand, M. D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 14-31.
13. Brown, J. P., Wei, W., & Sedivy, J. M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, 277(5327), 831-834.
14. 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.
15. Campisi, J., Andersen, J. K., Kapahi, P., & Melov, S. (2011, December). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? In *Seminars in cancer biology* (Vol. 21, No. 6, pp. 354-359). Academic Press.
16. Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., Peehl, D., Buttyan, R., Ikeguchi, E. F.,... & Benson, M. C. (2000). Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology*, 56(1), 160-166.
17. Colavitti, R., & Finkel, T. (2005). Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB life*, 57(4-5), 277-281.
18. 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 biology*, 6(12), e301.
19. Correia-Melo, C., Marques, F. D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J.,... & Rushton, M. D. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO journal*, 35(7), 724-742.
20. Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*, 107(4), 526-545.

21. Curello, S., Ceconi, C., Bigoli, C., Ferrari, R., Albertini, A., & Guarnieri, C. (1985). Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia*, 41(1), 42-43.
22. Dalle Pezze, P., Nelson, G., Otten, E. G., Korolchuk, V. I., Kirkwood, T. B., von Zglinicki, T., & Shanley, D. P. (2014). Dynamic modelling of pathways to cellular senescence reveals strategies for targeted interventions. *PLoS computational biology*, 10(8), e1003728. doi:10.1371/journal.pcbi.1003728
23. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Hoeijmakers, J. H. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell*, 31(6), 722-733.
24. 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.
25. Dörr, J. R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J. H. M., Kratzat, S. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*, 501(7467), 421.
26. Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, 194(1), 7-15.
27. Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in molecular medicine*, 16(5), 238-246.
28. Gems, D., & de la Guardia, Y. (2013). Alternative perspectives on aging in *Caenorhabditis elegans*: reactive oxygen species or hyperfunction? *Antioxidants & redox signaling*, 19(3), 321-329.
29. Georgakopoulou, E., Evangelou, K., Havaki, S., Townsend, P., Kanavaros, P., & Gorgoulis, V. G. (2016). Apoptosis or senescence? Which exit route do epithelial cells and fibroblasts preferentially follow? *Mechanisms of ageing and development*, 156, 17-24.

30. Hara, H., Araya, J., Ito, S., Kobayashi, K., Takasaka, N., Yoshii, Y., Kawaishi, M. (2013). Mitochondrial fragmentation in cigarette smoke-induced bronchial epithelial cell senescence. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(10), L737-L746.
31. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 37(3), 614-636.
32. Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25(3), 585-621.
33. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular cell*, 14(4), 501-513.
34. Huang, J., Gan, Q., Han, L., Li, J., Zhang, H., Sun, Y., Zhang, Z.,... Tong, T. (2008). SIRT1 overexpression antagonizes cellular senescence with activated ERK/S6k1 signaling in human diploid fibroblasts. *PloS one*, 3(3), e1710. doi:10.1371/journal.pone.0001710
35. Huang, X., Wulschleger, S., Shpiro, N., McGuire, V. A., Sakamoto, K., Woods, Y. L., ... & Alessi, D. R. (2008). Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice. *Biochemical Journal*, 412(2), 211-221.
36. Hüttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., & Doan, J. W. (2007). Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(12), 1701-1720.
37. Hüttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T. H., Kagan, V. E., Samavati, L., Doan, J. W., ... Lee, I. (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, 11(3), 369-81.
38. Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stöckl, P., Jansen-Dürr, P., y Gnaiger, E. (2004). Cambios asociados a la senescencia en la respiración y la fosforilación

oxidativa en fibroblastos humanos primarios. La revista bioquímica , 380 (Pt 3), 919-28.

39. Ide, T., Brown-Endres, L., Chu, K., Ongusaha, P. P., Ohtsuka, T., El-Deiry, W. S., Aaronson, S. A.,... Lee, S. W. (2009). GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress. *Molecular cell*, 36(3), 379-92.
40. Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., & Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO journal*, 25(13), 2966-2977.
41. James, E. L., Michalek, R. D., Pitiyage, G. N., de Castro, A. M., Vignola, K. S., Jones, J., ... & Parkinson, E. K. (2015). Senescent human fibroblasts show increased glycolysis and redox homeostasis with extracellular metabolomes that overlap with those of irreparable DNA damage, aging, and disease. *Journal of proteome research*, 14(4), 1854-1871.
42. Jones IV, A. R., Meshulam, T., Oliveira, M. F., Burritt, N., & Corkey, B. E. (2016). Extracellular redox regulation of intracellular reactive oxygen generation, mitochondrial function and lipid turnover in cultured human adipocytes. *PloS one*, 11(10), e0164011.
43. Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tsolou, A., von Zglinicki, T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging cell*, 11(6), 996-1004.
44. Jurk, D., Wilson, C., Passos, J. F., Oakley, F., Correia-Melo, C., Greaves, L., Hewitt, G. (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nature communications*, 5, 4172.
45. Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. A., Mackay, G., Gottlieb, E. (2013). A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*, 498(7452), 109.
46. Kirkwood, T. B. L., & Franceschi, C. (1992). Is aging as complex as it would appear?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 663(1), 412-417.

47. Kiyoshima, T., Enoki, N., Kobayashi, I., Sakai, T., Nagata, K., Wada, H., Sakai, H. (2012). Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts. *International journal of molecular medicine*, 30(5), 1007-1012.
48. Klimova, T. A., Bell, E. L., Shroff, E. H., Weinberg, F. D., Snyder, C. M., Dimri, G. P., Schumacker, P. T., Budinger, G. R., Chandel, N. S. (2009). Hyperoxia-induced premature senescence requires p53 and pRb, but not mitochondrial matrix ROS. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(3), 783-94.
49. Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B., & von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine*, 21, 7-13.
50. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (21), 12072-7.
51. Kruiswijk, F., Labuschagne, C. F., & Vousden, K. H. (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(7), 393.
52. Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 113(20), 3613-3622.
53. Laberge, R. M., Awad, P., Campisi, J., & Desprez, P. Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenvironment*, 5(1), 39-44.
54. Li, M., Durbin, K. R., Sweet, S. M., Tipton, J. D., Zheng, Y., & Kelleher, N. L. (2013). Oncogene-induced cellular senescence elicits an anti-Warburg effect. *Proteomics*, 13(17), 2585-96.

55. Liu, D., & Hornsby, P. J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer research*, 67(7), 3117-3126.
56. López-Díazguerrero, 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.
57. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.
58. Lu, T., & Finkel, T. (2008). Free radicals and senescence. *Experimental cell research*, 314(9), 1918-22.
59. Maciel-Barón, L. A., Morales-Rosales, S. L., Aquino-Cruz, A. A., Triana-Martínez, F., Galván-Arzate, S., Luna-López, A., González-Puertos, V. Y., López-Díazguerrero, N. E., Torres, C.,... Königsberg, M. (2016). Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 38(1), 26.
60. Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J., & Jendrach, M. (2010). Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *Journal of cell science*, jcs-059246.
61. Marazita, M. C., Dugour, A., Marquioni-Ramella, M. D., Figueroa, J. M., & Suburo, A. M. (2016). Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. *Redox biology*, 7, 78-87.
62. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesì, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(10), 577-586.

63. Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O.,... & Hwang, P. M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*, 312(5780), 1650-1653.
64. Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P., & Eigenbrodt, E. (2001). Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene*, 20(47), 6891.
65. Melk, A. (2003). Senescence of renal cells: molecular basis and clinical implications. *Nephrology dialysis transplantation*, 18(12), 2474-2478.
66. Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., & Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Molecular and cellular biology*, 29(16), 4495-4507.
67. Moriarty-Craige, S. E., & Jones, D. P. (2004). Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 481-509.
68. Munoz-Espin, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(7), 482.
69. Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(Pt 1), 1–13.
70. Nassour, J., & Abbadie, C. (2016). A novel role for DNA single-strand breaks in senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Molecular & cellular oncology*, 3(5), e1190885.
71. Nickel, A., Kohlhaas, M., & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 26-33.
72. Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., & Hara, E. (2004). The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *The Journal of Medical Investigation*, 51(3, 4), 146-153.
73. Omata, N., Murata, T., Fujibayashi, Y., Waki, A., Sadato, N., Yoshimoto, M.,... & Yonekura, Y. (2001). Age-related changes in energy production in fresh senescence-accelerated mouse brain slices as revealed by positron autoradiography. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 12(2), 78-84.

74. Paradis, V., Youssef, N., Dargère, D., Bâ, N., Bonvoust, F., Deschatrette, J., & Bedossa, P. (2001). Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Human pathology*, 32(3), 327-332.
75. Parrinello, S., Coppe, J. P., Krtolica, A., & Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Journal of cell science*, 118(3), 485-496.
76. Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B., von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular systems biology*, 6, 347.
77. Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M. J., Harold, G., Schaeuble, K., Birch-Machin, M. A., Kirkwood, T. B., von Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS biology*, 5(5), e110.
78. Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. A., & Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, 25(34), 4633.
79. Puzio-Kuter, A. M. (2011). The role of p53 in metabolic regulation. *Genes & cancer*, 2(4), 385-391.
80. Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B. Y.,... & Cui, X. (2015). Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. *PLoS One*, 10(7), e0131285.
81. Quinlan, C. L., Perevoschikova, I. V., Goncalves, R. L., Hey-Mogensen, M., & Brand, M. D. (2013). The determination and analysis of site-specific rates of mitochondrial reactive oxygen species production. *Methods in enzymology*, 526, 189-217.
82. Quinlan, C. L., Perevoschikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria

- oxidizing different substrates. *Redox biology*, 1(1), 304-12.
doi:10.1016/j.redox.2013.04.005
83. Ray, P. D., Huang, B. W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.
84. 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), 973.
85. Rodriguez, R., & Meuth, M. (2006). Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Molecular biology of the cell*, 17(1), 402-412.
86. Rudolf, E., John, S., & Cervinka, M. (2012). Irinotecan induces senescence and apoptosis in colonic cells in vitro. *Toxicology letters*, 214(1), 1-8.
87. Ryan, M. T., & Hoogenraad, N. J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 701-722.
88. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593-602.
89. Shackelford, D. B., & Shaw, R. J. (2009). The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature reviews. Cancer*, 9(8), 563-75.
90. Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, 15(7), 397.
91. Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*, 2(2), 103-112.
92. Stöckl, P., Zankl, C., Hütter, E., Unterluggauer, H., Laun, P., Heeren, G.,... Jansen-Dürr, P. (2007). Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces

- premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(6), 947-958.
93. Takebayashi, S., Tanaka, H., Hino, S., Nakatsu, Y., Igata, T., Sakamoto, A., Narita, M.,... Nakao, M. (2015). Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. *Aging cell*, 14(4), 689-97.
94. 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.
95. Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L. F., Kocher, O., & Dvorak, H. F. (2001). Differential expression of thymosin β -10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: Evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *The FASEB Journal*, 15(2), 458-466.
96. Xiao, B., Deng, X., Zhou, W., & Tan, E. K. (2016). Flow cytometry-based assessment of mitophagy using MitoTracker. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 76.
97. Yoon, Y. S., Yoon, D. S., Lim, I. K., Yoon, S. H., Chung, H. Y., Rojo, M., .Yoon, G. (2006). Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *Journal of cellular physiology*, 209(2), 468-480.
98. Zhang, C., Lin, M., Wu, R., Wang, X., Yang, B., Levine, A. J.,... & Feng, Z. (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(39), 16259-16264.
99. Zheng, J. I. E. (2012). Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Oncology letters*, 4(6), 1151-1157.
100. Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T.,... Kizek, R. (2012). Redox status

expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters*, 4(6), 1247-1253.

101. Zwerschke, W., Mazurek, S., Stöckl, P., Hütter, E., Eigenbrodt, E., & Jansen-Dürr, P. (2003). Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *The Biochemical journal*, 376(Pt 2), 403-11.

