



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Posgrado en Biología Experimental

**Comparación del Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia en dos
formas distintas de senescencia prematura inducida**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

LUIS ÁNGEL MACIEL BARÓN

Comité Tutorial:

Director: **Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Asesora interna: **Dra. Viridiana Yazmín González Puertos**

Asesora externa: **Dra. Susana Castro Obregón**

México D. F.

Febrero del 2014

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 Patología de la Drexel University, en Filadelfia PA, Estados Unidos de América.

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

Número de registro de la beca otorgada por el CONACYT: 265781.

Número de becario: 265781

CVU: 420075

Miembros del Comité Tesis **Miembros del jurado**

Presidente: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud

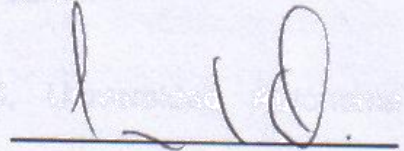
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



Secretaria: Dra. Susana Castro Obregón

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México



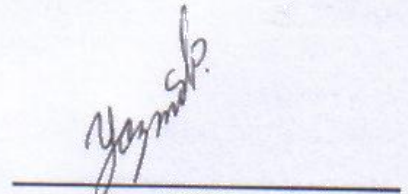
Vocal: Dra. Viridiana Yazmín González Puertos

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México

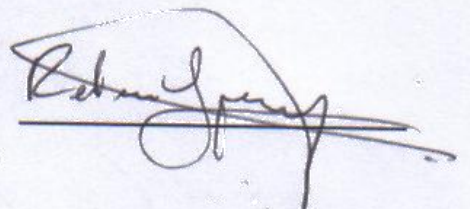
México, D.F. México



Vocal: Dra. Rebeca López Marure

Departamento de Fisiología

Instituto Nacional de Cardiología





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No: 00129

Matricula: 2113801391

COMPARACION DEL FENOTIPO
SECRETOR ASOCIADO A LA
SENESCENCIA EN DOS FORMAS
DISTINTAS DE SENESCENCIA
PREMATURA INDUCIDA

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 28 del mes de febrero del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DRA. VIRIDIANA YAZMIN GONZALEZ PUERTOS
DRA. REBECA LOPEZ MARURE
DRA. SUSANA CASTRO OBREGON



LUIS ANGEL MACIEL BARON
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero 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:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: LUIS ANGEL MACIEL BARON

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

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DRA. VIRIDIANA YAZMIN GONZALEZ
PUERTOS

VOCAL

DRA. REBECA LOPEZ MARURE

SECRETARIA

DRA. SUSANA CASTRO OBREGON

Miembros del Comité Tutoral

Directora: Dra. Mina Königsberg Fainstein

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

Asesora interna: Dra. Viridiana Yazmín González Puertos

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

Asesora externa: Dra. Susana Castro Obregón

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mina Königsberg Fainstein por su invaluable apoyo, tanto en el ámbito profesional como en el personal. Por abrirme las puertas de su laboratorio, confiar en mi trabajo y motivarme para continuar en el apasionante mundo de la ciencia.

A la Dra. Viridiana González Puertos por su instrucción en el manejo de los cultivos celulares y por su aportación intelectual en este trabajo.

A la Dra. Susana Castro Obregón por enriquecer este proyecto con sus comentarios y observaciones.

Al Dr. Armando Luna López del INGER por su apoyo en la realización de las inmunocitoquímicas, por aportar valiosas ideas a este proyecto y por sus “preguntas incómodas”.

Al Dr. Claudio Torres por abrirme las puertas de su laboratorio durante mi estancia en la Drexel University y su valiosa aportación a este proyecto.

A la Dra. Sonia Galván Arzate (INNN) y al Dr. Salvador Tello Solís (Depto. de química, UAM-I) por su apoyo en el uso de su fluorómetro.

Al M. Roberto Lazzarini del laboratorio de Microscopia Confocal de la UAM-I por su apoyo técnico en el uso del microscopio confocal.

A la MVZ Rocío González Vieira del bioterio de la UAM-I por proveer los animales utilizados en este trabajo.

A la Dra. Rebeca López Marure y al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por sus valiosas observaciones a esta tesis.

A todos los profesores que han contribuido a mi formación académica, especialmente a la Dra. Liliana Quintanar Vera y la Dra. Lina Rivillas Acevedo del CINVESTAV-IPN por iniciarme en el mundo de la investigación científica.

A mis compañeros de laboratorio: Adriana, Sandra Lizbeth, Sandra C., René, Gibrán, Pedro, Elisa, Aglae, Alejandro, Stephanie, Elizabeth y Roxana, por hacérmelo pasar tan bien durante el trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos Marcela, Prisca, Guillermo, Ivis, Rebeca, Gaby, Nemi, Deisy, Selene, Alejandra, Tzitzijanik, Danelia, Sara, Tonatiuh, Maetzín, Cony e Ismael, con quienes compartí aula durante la maestría.

A Lorena Barón, mi madre, por todo el sacrificio, por todo su apoyo y amor durante tantos años, espero que estés orgullosa de mí.

A mi hermano Alejandro Maciel por todo su apoyo durante tantos años y esos días inolvidables durante nuestra niñez.

A mi esposa, Nancy Palacios, por estar al pie del cañón a mi lado, por mostrarme su amor y comprensión a cada momento. ¡Tiempos mejores se avecinan!

A mis dos motorcitos: Mi hija Nabiki Maciel y mi hermanita Sayuri Barón por llenarme de alegría con cada sonrisa y cada caricia. Las amo.

A todos los grandes amigos que conocí durante mi estancia en Filadelfia: Natalia, Julián, Jessica, Ferit, Madoka, Hiroki, Mesfer, Kurt, Héctor, Chris, Tim, Julia, Giacomo, Kalbillah, Bo Yen, Tzu-Yuan, Justin, David, Liz, Alejandra, Thomas, Carol, Clara, Amaia y Mary, por los grandes momentos que pasamos juntos. Cheers!

Especialmente a aquellos que han intentado hacerme tambalear: ¡El que tropieza pero no cae, avanza más rápido!

A la memoria de mi padre: Marco Antonio Maciel Guzmán. ¡Te echo de menos, viejo!

INDICE

	Página
1. Resumen.....	1
2. Summary.....	3
3. Introducción.....	4
3.1. Envejecimiento.....	4
3.2. Senescencia celular (SC).....	5
3.3. Marcadores de la senescencia.....	7
3.3.1. Detención del ciclo celular.....	7
3.3.2. Otros mecanismos de inducción de senescencia.....	8
3.3.3. Actividad de la β -Galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -Gal).....	9
3.4. Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP).....	10
3.5. Actividades biológicas de la senescencia a través del SASP.....	11
4. Antecedentes.....	14
5. Justificación.....	17
6. Pregunta de investigación.....	18

7. Objetivo general.....	18
7.1 Objetivos particulares.....	18
8. Hipótesis.....	18
9. Material y método.....	19
9.1. Animales.....	19
9.2. Obtención de los fibroblastos de pulmón de ratón.....	19
9.3. Manejo del cultivo de fibroblastos de pulmón de ratón.....	20
9.4. Técnica de conteo celular.....	21
9.5. Inducción de la senescencia.....	22
9.6. Determinación de los parámetros clásicos de senescencia.....	23
9.6.1. Conteo celular.....	23
9.6.2. Incorporación de [³ H]-Timidina.....	23
9.6.3. Expresión de p16 y β-Galactosidasa por inmunocitoquímica.....	24
9.7. Análisis del Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP)....	25
9.8. Tratamiento estadístico de los datos.....	26
10. Resultados.....	27
10.1. Proliferación celular.....	27
10.2. Expresión de los marcadores de senescencia.....	29
10.3. Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP).....	33

11. Discusión.....	38
12. Conclusión.....	44
13. Referencias.....	46

1. RESUMEN

La senescencia celular es un fenómeno en el que las células cesan su proliferación en respuesta a un número limitado de duplicaciones o a un estrés que induzca senescencia en forma prematura. Este fenómeno está asociado al envejecimiento y a múltiples enfermedades asociadas a la edad como cáncer y enfermedades neurodegenerativas.

Estudios actuales han demostrado que las células senescentes secretan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento con un perfil proinflamatorio que pueden contribuir al deterioro causado por dichas patologías. Al conjunto de éstas moléculas secretadas se le conoce como Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP, por sus siglas en inglés) y se han identificado diversos componentes, tales como la IL-6, IL-7, IL-8, TNF- α , MCP-2, MIP-3 α , GRO y HGF, entre otros.

En este trabajo, se indujo Senescencia Prematura Inducida por Estrés (SIPS, por sus siglas en inglés), Senescencia Prematura Inducida por Inhibición del Proteosoma (SPIIP) y Senescencia Replicativa (SR) en un cultivo de fibroblastos de pulmón de ratón y se caracterizaron mediante los parámetros clásicos de senescencia: Detención de la proliferación y sobreexpresión de p16 y β -Galactosidasa. Además, se evaluaron los componentes del SASP en un estudio comparativo entre los 3 tipos de senescencia.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los marcadores clásicos de senescencia es idéntico en los 3 tipos estudiados, más no así el

SASP, el cual disminuyo notablemente para la SPIIP, sugiriendo que el SASP es dependiente del estímulo que induzca la senescencia.

2. SUMMARY

Cellular senescence is a phenomenon in which cells stop their proliferation in response to limited duplications or a stress that induces premature senescence. This phenomenon is associated to aging and to multiple age-related diseases as cancer or neurodegenerative diseases.

Some current studies have demonstrated that senescent cells secrete cytokines, chemokines and growth-factors with a pro-inflammatory profile, which might contribute to the damage observed in those diseases. All these secreted molecules together are known as Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) and some of its components are: IL-6, IL-7, IL-8, TNF- α , MCP-2, MIP-3 α , GRO and HGF, and others.

In this work, senescence was induced as Stress Induced Premature Senescence (SIPS), Proteasome-Inhibition Induced Premature Senescence (SPIIP) and Replicative Senescence (SR) in mice lung primary fibroblasts. All senescences types were characterized with the classic hallmarks: cease of proliferation and overexpression of p16 and β -galactosidase. Furthermore, the SASP components were evaluated in a comparative study in the 3 types of senescence.

Our data showed that expression of the classic hallmarks of senescence was identical in the 3 types of senescence, but not the SASP, especially in SPIIP, suggesting that SASP is a senescent-stimuli dependent feature of senescent cells.

3. INTRODUCCIÓN

*“...Science is not good or bad
but it can be used in both ways...”*

Tim Burton. Frankenweenie. 2012

3.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno caracterizado por la pérdida progresiva de la integridad fisiológica, resultado de la degeneración de células y tejidos (López-Otín, et al. 2013; Rajawat, et al. 2009). En el caso de los humanos, además de incrementar la vulnerabilidad a la muerte, los individuos envejecidos tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades tales como cáncer, diabetes, desordenes cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (López-Otín, et al. 2013).

Según López-Otín y colaboradores, es posible identificar y categorizar nueve marcadores celulares y moleculares del envejecimiento: Inestabilidad genómica, desgaste telomérico, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis, desregulación en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células madre y comunicación intercelular alterada. Alguno o todos estos marcadores se encuentran presentes en el envejecimiento normal (López-Otín, et al. 2013).

Por un lado, se ha sugerido que el envejecimiento es un proceso genéticamente programado que incluye el desarrollo, la maduración, el envejecimiento y la muerte (Finch, 1997). Pero por el contrario, otras teorías, como las estocásticas, consideran que existen varios factores que causan el

envejecimiento, tales como, el daño al ADN e incapacidad para repararlo, el daño a tejidos u organelos celulares por las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y los radicales libres, principalmente el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) – teoría propuesta por Harman en 1956 (Harman, 1956) –, el entrecruzamiento de proteínas y la incapacidad de los mecanismos celulares para remover tanto estructuras como organelos dañados, y que la suma de todos estos factores causan, en última instancia, el envejecimiento celular. Cabe mencionar que estas teorías no son mutuamente excluyentes (Muller, 2009).

3.2 Senescencia Celular (SC)

En la década de 1960's, Hayflick y Moorhead publicaron algunos artículos en los que demostraron que, contrario a lo que se pensaba en aquella época, las células de cultivos primarios tienen un número limitado de duplicaciones (Hayflick, et al. 1961; Hayflick, 1965). Éste fenómeno es conocido hoy como senescencia celular y, al ser un proceso relacionado con la edad del cultivo (número de duplicaciones), se le relacionó únicamente con el fenómeno del envejecimiento. Por eso, cuando un cultivo celular cesa su proliferación se dice que ha alcanzado el "límite de Hayflick".

Aunque la senescencia es un fenómeno que se descubrió *In Vitro*, ya se ha demostrado la presencia de células senescentes *In Vivo* (Dimri, et al., 1995; Cosme-Blanco, et al., 2007); asimismo se ha demostrado que este fenómeno no solo sucede durante el envejecimiento, sino que ocurre de manera natural y constante en los organismos.

En la actualidad, la SC es reconocida primordialmente como un mecanismo supresor de tumores debido a que las células dañadas se detienen en la fase G_0/G_1 del ciclo celular impidiendo así su proliferación aberrante (Wagner et al, 2001); además, esta detención en la proliferación puede ser mediada por dos vías de señalización reconocidas como importantes supresoras de tumores: la vía de p53/p21 y la de pRB/p16INK4a. (Rodier, et al.; 2007, Campisi, et al.; 2007; Chen, et al., 2005).

Una de las características de las células senescentes es que presentan expresión génica alterada, lo cual conlleva a una alteración en la expresión de proteínas, asociado a cambios morfológicos, y una respuesta prácticamente nula a la apoptosis (Muller, 2009). La SC clásica se induce por modificaciones fisiológicas y moleculares en la estructura de los telómeros, que ocurren como respuesta a un número limitado de divisiones celulares y en ese caso se ha llamado senescencia replicativa (SR). Sin embargo, la SC también puede inducirse por algún tipo de estrés, tal como la activación de oncogenes o estrés oxidante, en este caso se le conoce como Senescencia Prematura Inducida por Estrés (SIPS, por sus siglas en inglés).

En mamíferos, la senescencia juega un papel de gran importancia en el mantenimiento de la funcionalidad de los tejidos, especialmente como supresor de tumores, aunque también puede contribuir al fenotipo envejecido. Esta aparente contradicción puede ser explicada mediante el antagonismo pleiotrópico, una de las principales teorías evolutivas sobre el envejecimiento, que establece que ciertos procesos que se seleccionaron por sus efectos benéficos en edades tempranas, presentan efectos dañinos en edades

avanzadas. Esto es difícil verlo reflejado en poblaciones silvestres debido al bajo índice de individuos de edad avanzada, pero es común en los humanos (Kirkwood, et al., 2000). En el caso de la SC, a edades tempranas tiene un efecto benéfico al suprimir células malignas que potencialmente generen tumores, sin embargo, a edades avanzadas, la acumulación de células senescentes contribuye al deterioro del tejido asociado al envejecimiento, y además las secreciones de las células senescentes (de las que se hablará más adelante), pueden promover el cáncer.

3.3 Marcadores de la senescencia

3.3.1 Detención del ciclo celular

La senescencia celular se refiere esencialmente a una detención irreversible en la progresión del ciclo celular (Rodier, et al. 2011). Es bien sabido que con cada duplicación celular ocurre una pérdida gradual de ADN en los extremos cromosómicos, fenómeno conocido como erosión de telómeros (Harley et al., 1990). Esto ocurre durante la fase S del ciclo celular ya que las ADN polimerasas son unidireccionales y no pueden sintetizar la porción de ADN que funciona como molde. El acortamiento de los telómeros genera una respuesta persistente de daño al ADN (DDR, *DNA damage response*) que es importante para evitar la progresión del ciclo celular (Cristofalo, et al., 2004, Rodier, et al., 2009, Rodier, et al., 2010). La senescencia inducida por éste mecanismo es conocida como Senescencia Replicativa (SR).

En mamíferos, la DDR puede ser iniciada por alguna proteína cinasa: ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) o ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*

protein). ATM es reclutada y activada por proteínas que se unen a sitios del ADN donde se ha roto la doble cadena (*DSBs proteins, Double-Strand Breaks*), mientras que ATR es reclutada y activada por la proteína RPA (*Replication Protein A*). Una vez activos, ATM y ATR activan a sus blancos CHK2 y CHK1, respectivamente, cuya función es la activación del factor de transcripción p53 (Jackson, et al., 2009).

La proteína p53 regula la transcripción de distintos tipos de genes en respuesta a una variedad de señales de estrés. Como respuesta al daño al ADN, p53 puede regular procesos tales como la reparación del ADN, detención del ciclo celular, senescencia y apoptosis (Riley, et al., 2008). Uno de los genes blanco de p53 es el inhibidor del ciclo celular p21 (Itahana, et al. 2001) que inhibe los complejos CDK2/ciclina E y CDK4/6/ciclina D, importantes para la progresión del ciclo celular (Coqueret, 2003; Chiu, et al., 2012), induciendo así la detención de la proliferación característica de las células senescentes.

3.3.2 Otros mecanismos de inducción de senescencia

Por otro lado, se ha demostrado que existen diversos estímulos capaces de inducir SC de forma prematura, es decir, independiente del número de duplicaciones y, por lo tanto, del acortamiento de los telómeros (Dimri, 2005). Algunos estímulos capaces de inducir senescencia celular son el estrés oxidante (López-Díazguerrero, et al., 2006), la exposición a radiación UV y gamma (Lee, et al., 2011), la hiperoxia (Toussaint, et al., 2000), el detrimento en la eficiencia de la autofagia (Kang, et al. 2011, Fujii, et al., 2012) y la inhibición del proteosoma (Torres, et al., 2006, Bitto, et al., 2010). A la senescencia

inducida por alguno de estos estímulos se le conoce como senescencia prematura inducida por estrés (SIPS, por sus siglas en inglés). El mecanismo molecular más estudiado para inducir la SIPS es el inducido por estrés oxidante, utilizando dosis subletales de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El daño por estrés oxidante puede activar también la vía de p53, antes mencionada, o bien activar la vía de pRB/p16^{INK4a} (Muller, 2009).

La proteína p16 es un inhibidor del ciclo celular, particular de la fase G1 del ciclo, ya que actúa inhibiendo los complejos CDK4/6/Ciclina D (Suzuki, et al, 2008). Es activada en respuesta a ciertos tipos de estrés por la proteína p38^{MAPK} (Muller, 2009, Ben-Porath, et al., 2005).

Ambas vías de señalización convergen en la inactivación de la proteína del retinoblastoma, (pRb). La progresión del ciclo celular depende de la hiperfosforilación de pRb por los complejos ciclina/CDKs, pero tanto p21 como p16 forman complejos con pRb para mantenerla hipofosforilada (Muller, 2009).

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

La β -Galactosidasa (β -Gal) es una enzima lisosomal que rompe el enlace glucosídico de la lactosa para obtener como producto glucosa y galactosa. En las células senescentes se ha observado un aumento en la actividad de esta enzima, asociado a un aumento en su expresión (Capparelli, et al., 2012), por lo que aún y cuando no se conoce la razón fisiológica de este aumento, se ha empleado como un marcador de senescencia. Es por ello que para determinar si las células en cultivo o en un tejido son senescentes, se ha diseñado una tinción para evidenciar la actividad de dicha enzima asociada a la senescencia

(SA- β Gal), en la cual se utiliza el compuesto 5-bromo-4cloro-3-indolil β -D-galactosidasa (X-Gal) como sustrato de la enzima que, cuando es degradado, produce un precipitado azul que tiñe a las células senescentes cuando se realiza a un pH subóptimo (pH 6) (Dimri, et al., 1995).

3.4 Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP)

Se ha reconocido que las células senescentes secretan diversas moléculas al medio extracelular, entre las que se encuentran factores de crecimiento, proteasas, citocinas y otros factores con actividades paracrinias y autocrinas (Rodier, et al., 2011). A esta característica de las células senescentes se le denomina Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP, por sus siglas en inglés). De los factores que son secretados por las células senescentes destacan las interleucinas (IL) 6, 7 y 8; MCP-2 (*Monocyte Chemoattractant Protein 2*), MIP-3 α (*Macrophage Inflammatory Protein 3 α*), GRO α (*Growth Regulated Oncogene alpha*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) y proteínas IGFbps (*Insuline-like Growth Factor Bindindg Protein*) (Coppé, et al., 2008, Coppé, et al., 2010). De manera que en una forma simplista de verlo, el SASP es el medio por el cual una célula senescente es capaz de comunicar su estado comprometido a otras células dentro de un tejido.

Diversos estudios han sugerido una relación entre la senescencia celular y algunas enfermedades asociadas a la edad (Campisi, et al., 2011) principalmente el cáncer, pero incluyendo enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Bhat, et al., 2012). En dicha relación, el SASP juega un

papel de suma importancia debido a las actividades paracrinas de las moléculas secretadas.

Se ha reportado que bajo ciertas condiciones, el SASP se encuentra conservado entre células humanas y de ratón (Coppé, et al., 2010), además se ha observado que existe el SASP tanto *In Vitro* como *In Vivo* en distintos tipos celulares: fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, astrocitos, etc. (Coppé, et al., 2008, Bhat, et al., 2012). En gran medida, la secreción del SASP se inicia por la inducción transcripcional de la IL-1 α , en su forma unida a membrana y su subsecuente señalización dentro de la membrana al unirse con su receptor (Orjalo, et al., 2009). Posteriormente, el SASP depende principalmente de las vías de señalización intracelular p38MAPK y NF- κ B (Freund, et al., 2011). La secreción del SASP ocurre días después de que las células comienzan a expresar los otros marcadores de senescencia (Rodier, et al., 2011) por lo que, primordialmente, el SASP es considerado como una respuesta retardada al daño genómico o a modificaciones epigenómicas (Rodier, et al. 2009, Rodier et al., 2011).

3.5 Actividades biológicas de la senescencia a través del SASP

Clásicamente la senescencia ha sido vista como un potente mecanismo anti cancerígeno que detiene la proliferación de las células en riesgo de transformación (Rodier, et al., 2011), sin embargo, la senescencia también es un ejemplo claro de antagonismo pleiotrópico, que estipula que un proceso biológico puede ser benéfico o perjudicial en diferentes etapas de la vida de un organismo (Williams, 1957) y, mediante los componentes del SASP, las células

senescentes pueden incluso promover el crecimiento tumoral, la reparación de tejidos y el envejecimiento.

En algunos casos de daño hepático y heridas de piel, se ha observado la inducción de senescencia en ciertas células dentro del tejido que parecen ser importantes para limitar la extensión de la fibrosis durante el proceso de reparación. Además, dentro de los componentes del SASP se encuentran algunas metaloproteinasas de matriz (MMPs, por sus siglas en inglés), que son moléculas importantes para la restauración del material fibrilar (Krizhanovsky, et al., 2008, Jun, et al., 2010). El SASP incluye también ciertas citocinas y quimiocinas que pueden atraer y activar a las células del sistema inmune y, ya que las células senescentes expresan receptores para éstas, el sistema inmune puede eliminar de los tejidos a las células senescentes (Krizhanovsky, et al., 2008). Dentro de los factores del SASP se encuentran también las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-8; PAI-1 (*Protease inhibitor plasminogen Activator inhibitor-1*) y la proteína pleiotrópica IGFBP7 (*Insuline-like Growth Factor Binding Protein-7*), que son capaces de activar vías supresoras de tumores que establecen y mantienen la detención de la proliferación, reforzando así el fenotipo senescente y la misma actividad supresora de tumores de las células senescentes (Campisi, et al., 2011).

No obstante, en individuos de edad avanzada, el sistema inmune presenta una actividad deteriorada (McElhaney, et al., 2009), por lo que es lógico pensar que conforme el individuo avanza en edad, las células senescentes se van acumulando en los tejidos, y el SASP secretado de forma continua por dichas células senescentes acumuladas, provoca un cambio en el microambiente de

todo el tejido, alterando significativamente su estructura (Campisi, et al., 2011). Por ejemplo, se ha sugerido que el SASP de las células endoteliales senescentes está implicado en la calcificación vascular relacionada a la edad, lo cual es el mayor factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares; además, los componentes proinflamatorios del SASP en éste mismo tipo celular, pueden contribuir también en las enfermedades cardiovasculares al iniciar y promover el desarrollo de lesiones arteroescleróticas (Erusalimsky, et al. 2005, Gorenne, et al., 2006, Burton, et al., 2010).

Se ha sugerido que el SASP de astrocitos senescentes inicia o contribuye a la neuroinflamación (Bitto, et al. 2010), la cual es una característica de diversas enfermedades neurodegenerativas; además se ha pensado que también causa o contribuye al declive de la función motora y cognitiva asociada a la edad.

En cuanto a su asociación con el cáncer, existe evidencia de que el SASP de las células senescentes puede promover fenotipos propios de células cancerosas, además de favorecer el crecimiento de tumores *In Vivo* (Dilley, et al., 2003, Bavik, et al., 2006, Liu, et al., 2007). En cultivo, los componentes del SASP tienen la potencialidad de inducir la transición epitelio-mesénquima, un paso importante en el desarrollo de carcinomas invasivos y metastásicos (Campisi, et al., 2011). Los principales componentes del SASP asociados a ésta actividad son la IL-6, IL-8 y GRO α ; éste último, al igual que otros componentes del SASP, es un potente mitógeno, en particular para células epiteliales premalignas. Otros factores como las MMPs han mostrado estimular el crecimiento de tumores y su potencial de invasión en estudios de

xenoinjertos en ratón, aunque aún no se han visto estas actividades en tumores naturales (Campisi, et al., 2011. Hasty, et al., 2003).

Finalmente, debido a la acumulación de células senescentes con la edad, se ha sugerido que los efectos del SASP (sobre todo los perjudiciales), pueden ocurrir también a nivel sistémico; se ha sugerido, por ejemplo, que la acumulación de células senescentes en la sangre puede contribuir a la acumulación de citocinas proinflamatorias asociadas a la edad, como IL-6, promoviendo así una variedad de enfermedades crónicas degenerativas, además de cáncer (Campisi, et al., 2011, Kiecolt-Glaser, et al., 2003).

4. ANTECEDENTES

La senescencia celular fue entendida en sus inicios como un fenómeno que ocurría únicamente *In Vitro* (Hayflick, 1965). Hoy sabemos que en los individuos existe una acumulación de células senescentes en función de su edad, por lo que se sugiere que éstas contribuyan activamente en el fenotipo envejecido, y que participen en actividades biológicas tales como la supresión o bien la promoción de tumores y la reparación de tejidos (Rodier, et al., 2011); por lo que es un claro ejemplo de antagonismo pleiotrópico. Una característica clave para entender cómo es que las células senescentes participan en estos procesos es el SASP. La compleja secreción de las células senescentes incluye citocinas proinflamatorias e inmunomoduladoras, quimiocinas y factores de crecimiento que pueden tener actividades paracrinas y autocrinas (Coppé, et al., 2008, Coppé, et al., 2010).

Algunos estudios sobre el SASP han sido enfocados en las citocinas proinflamatorias (Orjalo, et al., 2009, Rodier, et al., 2009), como la IL-6 e IL-8, y se ha asociado tanto la acumulación de células senescentes como la secreción de estos factores con procesos inflamatorios observados en enfermedades asociadas con la edad, entre estas las neurodegenerativas (Bhat, et al., 2012). Otros estudios han sido enfocados en la relación existente entre algunos factores de crecimiento secretados por las células senescentes, tales como $GRO\alpha$, o la secreción de MMPs con la promoción de tumores y por lo tanto del cáncer (Campisi, et al., 2011. Hasty, et al., 2003).

Por otro lado, hoy sabemos que los estímulos capaces de inducir senescencia celular son muy diversos, estos estímulos van desde la exposición a estrés oxidante (López-Diazguerrero, et al., 2006), el deterioro de algunos mecanismos celulares como la autofagia (Kang, et al., 2011, Fujii, et al., 2012) o la actividad del proteosoma (Torres, et al., 2006), y el acortamiento de los telómeros en la senescencia replicativa (Cristofalo, et al., 2004, Rodier, et al., 2009, Rodier, et al., 2010). Sin embargo, poco se ha estudiado acerca de las diferencias entre los componentes del SASP cuando la senescencia celular ha sido inducida por diferentes estímulos. En este sentido, uno de los pocos estudios que existen mostró que el SASP proveniente de células de ratón puede ser diferente cuando las células son sometidas a diferentes concentraciones de oxígeno; utilizando fibroblastos de las líneas mBF y MEF inducidos a senescencia bajo condiciones fisiológicas de oxígeno (3%) o bien bajo condiciones estándar de cultivo (20% de oxígeno). Se observó un SASP más potente a condiciones fisiológicas de oxígeno, mientras que la secreción

de las células senescentes a 20% de oxígeno, mostró un patrón similar al de las células pre-senescentes. Además, en este mismo estudio se observó que el SASP proveniente de los fibroblastos de ratón era muy similar al SASP de los fibroblastos humanos (Coppé, et al., 2010). En otro estudio, el mismo grupo de investigación demostró que cuando se induce senescencia celular en células epiteliales mediante la expresión ectópica de p16INK4A y p21, las células expresan todos los marcadores de senescencia, excepto el SASP (Coppé, et al., 2011). Con base en esto, se ha sugerido que el SASP ocurre cuando las células en las que se induce senescencia han sufrido algún daño genómico o epigenómico y que las funciones primordiales del SASP podrían ser:

- 1) que las células senescentes envíen señales para comunicar su estado comprometido (senescente) a las células adyacentes para preparar al tejido para la reparación, y

- 2) estimular la eliminación de tales células dañadas por el sistema inmunológico (Campisi, 2013).

Sin embargo, en organismos envejecidos estas funciones no siempre podrían llevarse a cabo, por diversas razones como por ejemplo el deterioro del sistema inmune. En este caso la secreción del SASP mostraría los efectos dañinos sugeridos durante el antagonismo pleiotrópico y asociados a las enfermedades de la tercera edad.

Es por ello que en este trabajo se inducirán dos tipos distintos de senescencia prematura, para comparar el SASP proveniente de estas células, con el SASP proveniente de células que llegaron a la senescencia por

senescencia replicativa (SR). En este caso se inducirá senescencia prematura por estrés oxidante (SIPS) usando dosis subletales de H₂O₂ y senescencia prematura inducida por inhibición del proteosoma (SPIIP), empleando la epoxomicina como inhibidor del proteosoma.

5. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a las estimaciones realizadas por el Consejo Nacional de Población (CONAPO), el porcentaje de adultos mayores en la población mexicana aumentará de un 6.2% en 2010 a un 22.6% en 2050 (CONAPO, 2002). El aumento en la proporción de adultos mayores en nuestra población provocará una incidencia mayor de enfermedades relacionadas con la edad, tales como enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer, entre otras; por lo que este aumento en la proporción de adultos mayores puede representar, a corto plazo, no sólo un fenómeno social, sino también un problema de salud pública que deberá ser atendido.

El estudio del envejecimiento a nivel celular, a través de la SC, y particularmente del SASP es importante para entender la relación que existe entre el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad, por lo que la investigación realizada en este trabajo contribuye a generar conocimiento básico que en un futuro pueda servir para la búsqueda de blancos moleculares que contribuyan al tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad con la finalidad de mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. Además, este tipo de trabajos contribuyen también a

entender si la respuesta a un estímulo es comparable entre individuos jóvenes y adultos mayores.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirán diferencias en los componentes del SASP dependiendo del estímulo inductor de senescencia?

7. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar dos tipos de senescencia prematura y comparar el SASP de estas células con el SASP de la senescencia replicativa.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar dos tipos distintos de senescencia prematura utilizando los parámetros clásicos, tales como la tasa de proliferación y la expresión de los marcadores de senescencia p16 y β -galactosidasa.
- Analizar y comparar el SASP proveniente de los distintos tipos de senescencia prematura con el SASP de la SR.

8. HIPÓTESIS

Puesto que el SASP es el medio por el cual las células senescentes envían señales a las células adyacentes, entonces el SASP secretado por las células senescentes dependerá del estímulo por el cual se indujo la senescencia, y se encontrarán diferencias entre el SAPS de la SR y el de la senescencia prematura.

9.MATERIAL Y MÉTODO

9.1 Animales

Para este trabajo se utilizaron ratones neonatos de la cepa CD-1 (de entre 4 y 7 días de nacidos) sin distinción de sexo. Todos ellos fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa y fueron tratados de acuerdo a los principios éticos de la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999.

9.2 Obtención de los fibroblastos de pulmón de ratón

Todo el material empleado para la disección, así como los reactivos utilizados en la obtención de fibroblastos fueron esterilizados previamente a su uso. Para cada cultivo se sacrificaron tres ratones y los pulmones fueron extraídos, colocados en una caja Petri de 10cm de diámetro y lavados 3 veces con PBS suplementado con 2% de antibiótico-antimicótico. Posteriormente, los pulmones se cortaron con bisturí en fragmentos de aproximadamente 1 mm³ y se incubaron en 5mL de solución 3mg/mL de colagenasa tipo IA en PBS a 37°C durante 45 min. La suspensión fue recolectada en un tubo de 15mL y centrifugada a 5,000 x g para eliminar la colagenasa. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en medio de cultivo mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico-antimicótico. El homogenado fue filtrado para retirar los restos de tejido y el resto se colocó en 3 cajas de Petri de 10cm de diámetro. El día del aislamiento de los fibroblastos de pulmón fue considerado como el día cero.

Para todos los experimentos se utilizó Medio Esencial Mínimo (MEM), excepto para las determinaciones del SASP, en el que se utilizó medio de cultivo MCDB105.

9.3 Manejo del cultivo primario de fibroblastos de pulmón de ratón

Cada tercer día el medio de cultivo se removió de las cajas de cultivo, las células fueron lavadas con 2mL de PBS y se añadió medio de cultivo limpio. Cuando las células rebasaban un 70% de confluencia, fueron despegadas con 1mL de tripsina al 0.1% y sembradas en dos cajas diferentes con medio de cultivo fresco para aumentar la población y evitar la inhibición de la proliferación por contacto celular.

Cuando el cultivo llegó al día 7, las células se despegaron como se describió anteriormente y se colectaron en un tubo Falcon de 50mL con 2 mL de medio de cultivo por cada mL de tripsina utilizado para despegar a las células. Las células se contaron, como se describe posteriormente, y se sembraron nuevamente de la siguiente forma:

- Para los experimentos de proliferación celular (Conteo celular e incorporación de [³H]-Timidina), las células se sembraron en cajas de 24 pozos. Se sembraron 5,000 células por pozo, en el número de pozos suficientes para llevar a cabo las determinaciones antes mencionadas en los días 9, 12, 15, 18 y 21 del cultivo. Para cada día se sembraron 3 pozos para realizar las determinaciones por triplicado.
- Para evaluar la expresión de los marcadores de senescencia p16 y β-galactosidasa, las células se sembraron en cubreobjetos estériles, 5,000

células en cada uno, los cuales se encontraban dentro de cajas Petri de 2cm de diámetro, y posteriormente se cubrieron con el medio de cultivo. Para cada día de determinación se utilizaron 3 cubreobjetos por cada tratamiento.

- Para las determinaciones del SASP, las células no se despegaron de las cajas Petri de 10cm de diámetro, sino que se trataron directamente en las mismas.

9.4 Técnica de conteo celular

El conteo celular se llevó a cabo tomando una alícuota de 20 μ L del homogenizado de células resuspendidas en el medio de cultivo; esa alícuota se mezcló con 20 μ L del colorante azul de tripano. La mezcla fue resuspendida nuevamente y se tomó una alícuota de 10 μ L, la cual se colocó en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio óptico 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).

9.5 Inducción de la senescencia

La inducción de la senescencia se llevó a cabo el día 9 del cultivo para todos los experimentos. Para ello, las células sembradas se dividieron en tres grupos:

- a) *Senescencia replicativa (SR)*: Este grupo de células llegó a senescencia de manera natural, las células fueron tratadas solamente con DMSO 0.5% (Vehículo del inhibidor del proteosoma epoxomicina) a partir del día 9 del cultivo.
- b) *Senescencia prematura inducida por estrés (SIPS)*: Para inducir la SIPS, las células se trataron con H_2O_2 75 μM durante dos horas. El H_2O_2 fue disuelto en el medio de cultivo; pasadas las dos horas, se retiró el medio con H_2O_2 y las células se lavaron con PBS; finalmente se les añadió medio de cultivo fresco (López-Dizguerrero et al., 2006)
- c) *Senescencia prematura inducida por inhibición del proteosoma (SPIIP)*: Para inhibir la actividad del proteosoma, las células se trataron con 5nM de epoxomicina, la cual fue previamente disuelta en DMSO para preparar una solución stock 50 μM . Para tratar a las células, un volumen del stock fue tomado y disuelto en medio de cultivo suficiente para alcanzar la concentración deseada. Una vez preparado el medio de cultivo con 5nM de epoxomicina, se le añadió a las células. Para este grupo, el medio de cultivo se retiró y se cambió cada dos días, en cada cambio de medio se mantuvo la concentración de epoxomicina en 5nM (Torres et al., 2008).

9.6 Determinación de los parámetros clásicos de senescencia

9.6.1 Conteo celular

Las células sembradas en cajas 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 tomaron 20 μ L del homogenizado para realizar el conteo celular como se describió previamente. El conteo se realizó los días 9, 12, 15, 18 y 21 del cultivo para los 3 grupos.

9.6.2 Incorporación de [³H]-Timidina

Previamente, se preparó un stock de [³H]-Timidina en medio de cultivo MEM de tal forma que tuviera una actividad de 10 μ Ci/mL de actividad. Para las determinaciones se tomó una alícuota del stock y se disolvió en proporción 1:10 en medio de cultivo para tener una actividad final de 1 μ Ci/mL.

Las células sembradas en cajas de 24 pozos, se lavaron con PBS y se añadieron 200 μ L de la solución con actividad de 1 μ Ci/mL a cada pozo por 3 h. Durante este tiempo, las células se mantuvieron en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con PBS. Se añadieron 200 μ L de metanol al 95% en PBS durante 15 min para fijar las células. El metanol fue retirado y las células se lavaron 2 veces más con PBS. Después se añadieron 500 μ L de NaOH 0.2N durante una noche en la incubadora, para desprender las células adheridas a las placas de cultivo. Finalmente, se retiró el NaOH de cada pozo y se disolvió en 5mL de líquido de centelleo. Se midió la emisión radioactiva, en cuentas por minuto (cpm), en un

contador de centelleo (Beckman LS 6500). Las determinaciones se realizaron los días 9, 12, 15, 18 y 21 para todos los tratamientos.

9.6.3 Expresión de p16 y β -Galactosidasa por inmunocitoquímica

Todos los anticuerpos utilizados para este experimento fueron diluidos en PBS-Tween al 2% .

Las células sembradas en los cubreobjetos e inducidas a senescencia como se mencionó anteriormente, se lavaron varias veces con PBS para remover el medio de cultivo y se fijaron con formalina neutra (Formaldehído al 3% en PBS) durante 15 min. Para remover la formalina neutra las células se lavaron nuevamente con PBS en dos ocasiones y se incubaron con 200 μ L de bloqueador universal de proteínas por 10 min. Posteriormente las células se lavaron una vez con PBS-tween y se añadieron 200 μ L del anticuerpo anti-p16-conejo (*Santa Cruz Biothechnology*[®]), en dilución 1:50 durante 1 h. Pasada la hora, las células se lavaron en 2 ocasiones con PBS-tween y se añadieron 200 μ L del anticuerpo anti- β Galactosidasa-ratón (*abcam*[®]) en dilución 1:200 durante 1 h. Después se hicieron 3 lavados con PBS-tween y un cuarto lavado con agitación, y se añadieron 200 μ L del anticuerpo secundario *Alexa Fluor*[®] 488 anti-conejo en dilución 1:500 durante una h. Se realizaron 2 lavados más con PBS-tween con agitación y se añadieron 200 μ L del anticuerpo secundario *Alexa Fluor*[®] 594 anti-ratón en dilución 1:500 durante 1 h. Pasado este tiempo, se hicieron 3 lavados con PBS-tween con agitación. Se añadieron 20 μ L de solución de montaje con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) y se montaron las muestras en cubreobjetos. Las preparaciones fueron almacenadas en

oscuridad a 4°C hasta su observación, la cual se llevó a cabo en un microscopio confocal *Carl Zeiss* modelo LSM 780 NLO multifotónico. Las preparaciones se realizaron los días 9, 15 y 21 para la SR y los días 9, 12 y 15 para SIPS y SPIIP.

9.7 Análisis del Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP)

Para el análisis del SASP, las células se sembraron desde el inicio en medio MCDB105 suplementado con 10% de SFB en cajas Petri de 10cm de diámetro. Las determinaciones se iniciaron en el día 9, para el control de células pre-senescentes; el día 21 para SR; y el día 15 para SIPS y SPIIP. Cuando las células llegaron al día de la determinación, el medio de cultivo se removió, se lavaron las células con PBS y se les agregó el medio MCDB105 libre de SFB durante 24-48 h. Pasado ese tiempo, el medio condicionado se colectó en tubos de 15 mL y se guardó a -80°C para su análisis posterior. Las células se despegaron con tripsina 0.1% y se contaron como se describió previamente, para la normalización de los datos de SASP.

Para realizar las determinaciones, se descongelaron las muestras y las que eran del mismo día y del mismo tratamiento se juntaron y se concentraron 15 veces para llegar a un volumen final de 1mL, el cual fue analizado siguiendo el protocolo del kit comercial *RayBio*® *Mouse CytokineAntibodyArray*, de la siguiente manera: las membranas contenidas en el kit se bloquearon con buffer de bloqueo (proveniente del kit) durante media hora; posteriormente, se incubaron con 1mL de muestra y se agitaron por 2 h. Pasado ese tiempo, la muestra fue removida y se realizaron cinco lavados con los buffers de lavado

contenidos en el kit. Después se incubó por 2 h con 1ml del *cocktail* de anticuerpos conjugados con biotina contenidos en el kit. Posteriormente se realizaron otros 5 lavados para remover los anticuerpos que no se hubieran unido y se incubó 2 h más con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (*HRP-streptavidine*) y se realizaron otros 5 lavados. Para llevar a cabo la detección de la señal, se añadió 1mL del buffer de detección incluido en el kit durante 2 min y las membranas fueron expuestas a películas de detección de rayos X durante 10-15 min. Las películas se revelaron en un procesador de imágenes Kodak X-Omat 1000A. Para realizar el análisis semicuantitativo de las citocinas presentes, se utilizó el software ImageJ versión 1.47. Los datos se normalizaron empleando el número de células, para poder realizar comparaciones entre los grupos.

9.8 Tratamiento estadístico de los datos

Los experimentos se realizaron por triplicado en al menos 3 eventos independientes. El análisis estadístico se hizo 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.

10. RESULTADOS

10.1 Proliferación celular

El efecto de los tratamientos con H_2O_2 y epoxomicina sobre la proliferación celular fue evaluado mediante conteo celular e incorporación relativa de [3H]-Timidina para síntesis de ADN. Los resultados obtenidos en el conteo celular (Figura 1-A) muestran que las células que no fueron tratadas continúan proliferando hasta el día 15 del cultivo, momento en el que llegan al límite de Hayflick, y a partir de ese día detienen su proliferación alcanzando una población alrededor de 4 veces mayor que las células que sí recibieron algún tratamiento. Las células tratadas con H_2O_2 75 μM (para inducir SIPS) y con epoxomicina 5 nM (para inducir SPIIP) detienen su proliferación después de ser tratadas y no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas en ninguno de los días evaluados, pero ambas son significativamente distintas al grupo control (SR) a partir del día 12 del cultivo ($p < 0.05$). En cuanto a la síntesis de ADN, las gráficas de incorporación de [3H]-Timidina (Figura 1-B), muestran diferencias significativas a partir del día 12 entre las células tratadas en comparación con el grupo control. En el día 12 se observa que la incorporación de [3H]-Timidina es aproximadamente 7 veces mayor en el grupo control que en los grupos tratados, y esa diferencia se va haciendo más pequeña conforme pasan los días, confirmando una disminución de la proliferación en el grupo control después del día 15. Cabe mencionar que para SIPS, se observó un aumento significativo en la incorporación de Timidina al día 15 con respecto a la SPIIP, sin embargo, al no alcanzar los niveles de

incorporación que la SR, este fenómeno podría estar asociado a un proceso de reparación de ADN más que de síntesis.

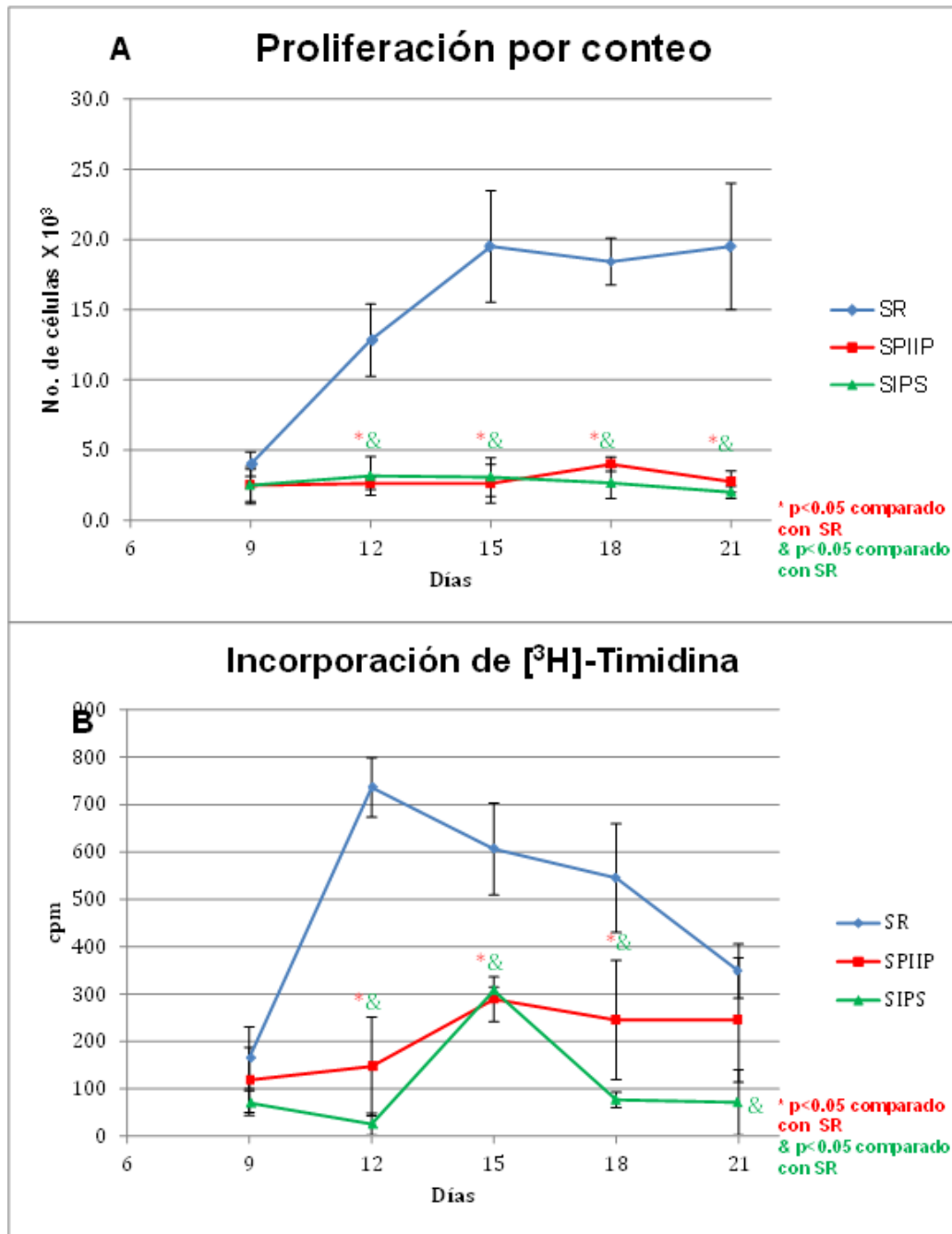


Figura 1. Curvas de proliferación A) por conteo y B) Por Incorporación de [3H]-Timidina. Las gráficas muestran el resultado de tres experimentos independientes. Cada valor corresponde a la media \pm desviación estándar.

En conjunto, estos datos muestran que tanto el estrés oxidante como la inhibición parcial del proteosoma, son estímulos capaces de inhibir la proliferación celular a las concentraciones usadas de H₂O₂ y epoxomicina respectivamente, y dicha respuesta celular ocurre desde el inicio de los tratamientos.

10.2 Expresión de los marcadores de senescencia

Con la finalidad de confirmar que la inhibición de la proliferación estaba asociada con el fenómeno de senescencia, se evaluó la expresión de dos marcadores clásicos de éste fenómeno, el inhibidor del ciclo celular p16 y la enzima β -galactosidasa, empleando la técnica de inmunocitoquímica. Las imágenes obtenidas por microscopia confocal (Figura 2) muestran un aumento gradual tanto de p16 como de β -galactosidasa en el grupo control (SR) en función de los días del cultivo, comenzando a ser evidente a partir del día 18. Los grupos tratados con H₂O₂ y con epoxomicina muestran un aumento en la expresión de ambos marcadores desde el día 12, además, se observa una colocalización evidente de p16 con el DAPI, sugiriendo la translocación de p16 hacia el núcleo, sitio en el que p16 ejerce su actividad de inhibición de los complejos CDK4/6 – Ciclina D y, por lo tanto, de la proliferación celular.

Al analizar las imágenes obtenidas por microscopia confocal, se realizó un conteo de las células positivas a los marcadores de senescencia para cada grupo de estudio. Se consideraron células senescentes cuando éstas fueron positivas a ambos marcadores simultáneamente: p16 en el núcleo y β -galactosidasa en el citosol. Cabe mencionar que se contaron al menos 100

células de distintas preparaciones y en campos aleatorios para cada grupo de estudio. En la figura 3 se muestra que en los grupos tratados con H_2O_2 y con epoxomicina se tiene alrededor del 80% y el 65 % de células senescentes a los 12 días de cultivo, respectivamente; y un 85% a los 15 días, para ambos tratamientos. En cuanto a la SR, se observa apenas un 20% de células senescentes a los 15 días de cultivo y se alcanza un 75% hasta el día 21.

Estos datos demuestran que la inhibición de la proliferación celular al tratar los fibroblastos con H_2O_2 o con epoxomicina está asociada con el fenómeno de senescencia celular, y que tanto el H_2O_2 como la epoxomicina son agentes causantes de senescencia prematura. Por lo que de aquí en adelante a estas células se les llamará SIPS y SPIIP respectivamente.

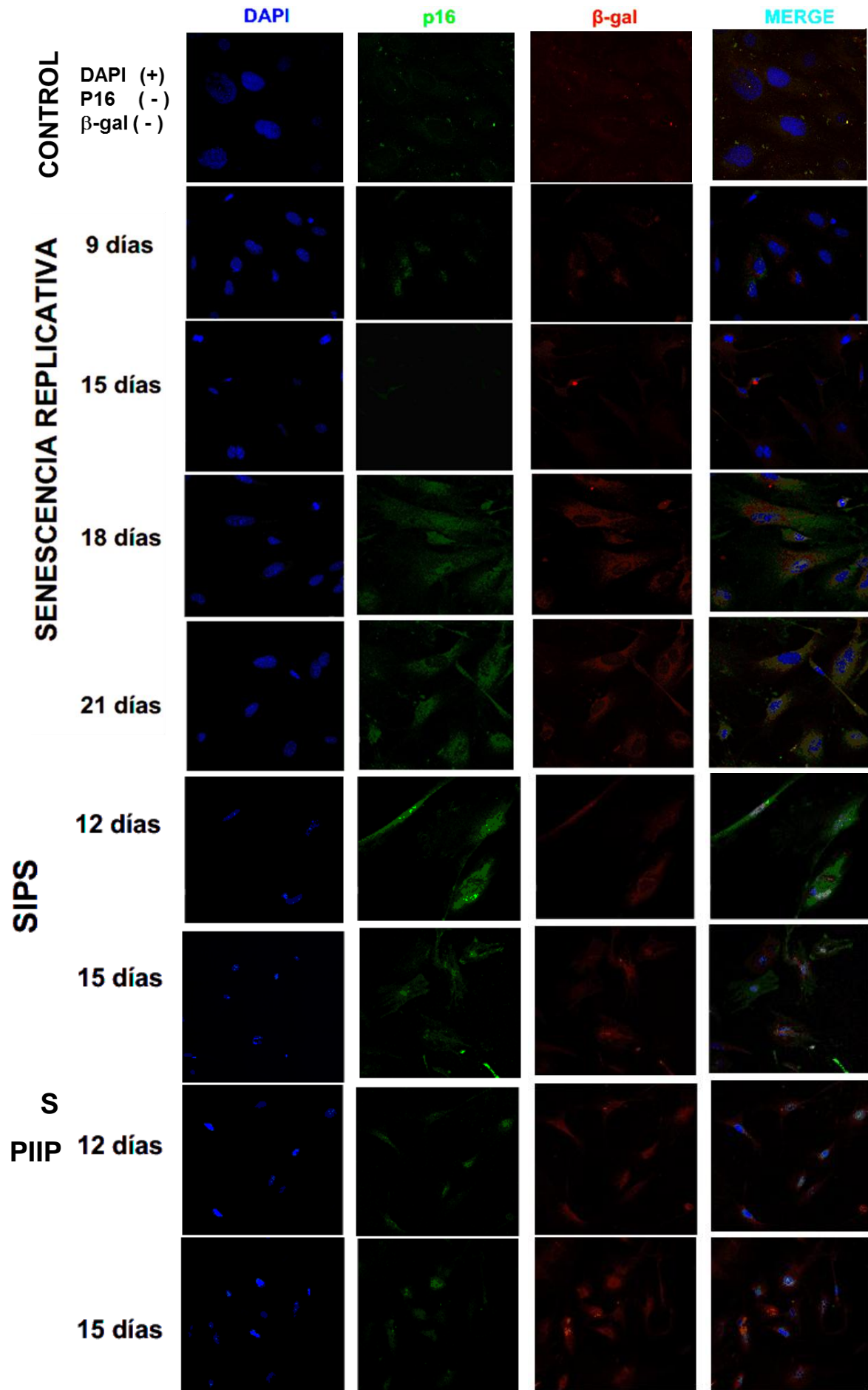


Figura 2. Inmunocitoquímicas de los cultivos primarios de fibroblastos para los marcadores de senescencia p16 y β -galactosidasa. Los núcleos fueron marcados con DAPI. Se muestran imágenes representativas de cada experimento.

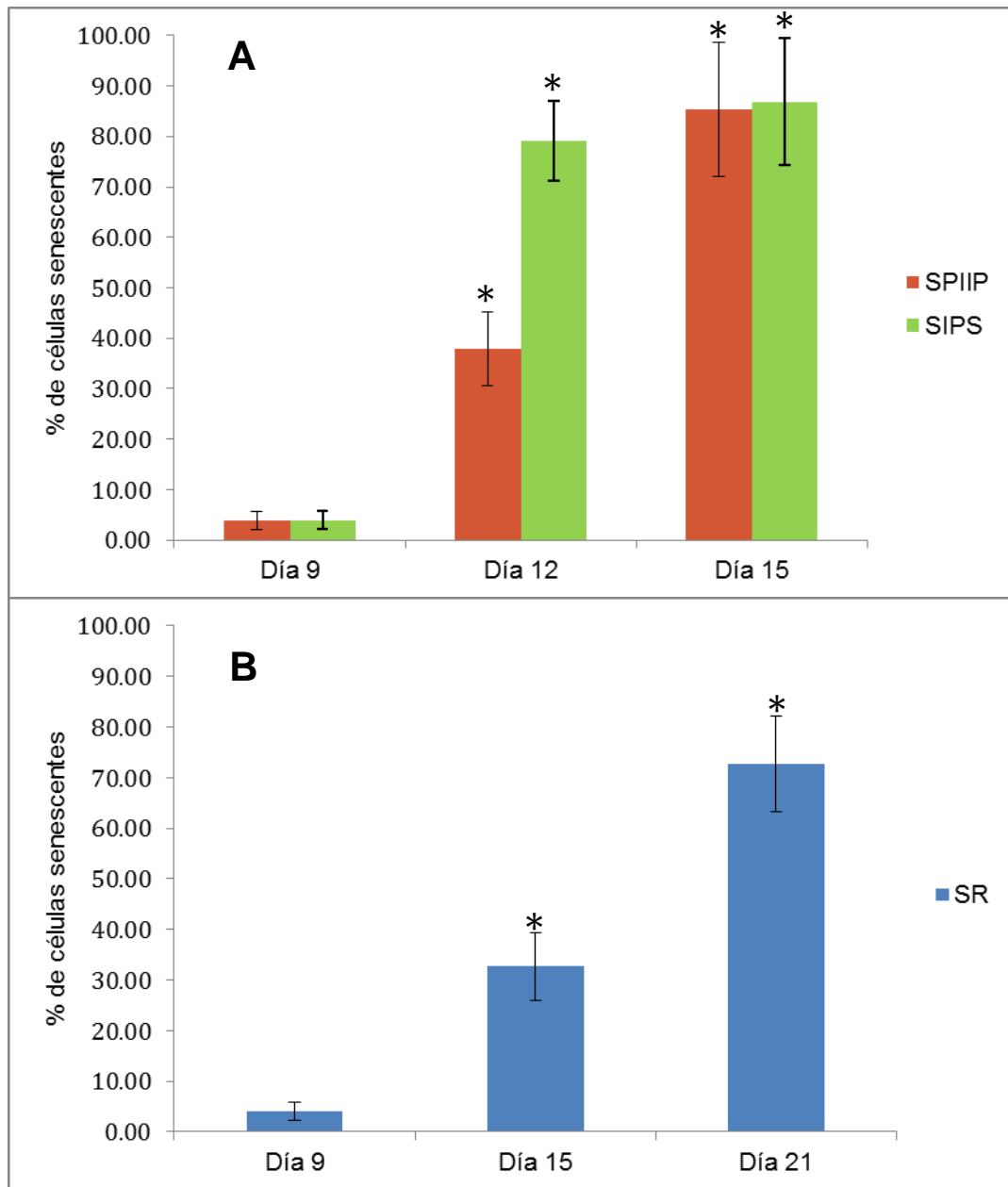


Figura 3. Porcentaje de células senescentes en función del tiempo para los 3 tratamientos analizados en los fibroblastos de pulmón de ratón. A. Para la SPIIP y la SIPS alcanzan un 80-85% de células senescentes a los 15 días. B. Para la SR se obtuvieron alrededor del 75% de células senescentes al día 21.
* $p < 0.05$ comparado con las células pre-senescentes (día 9).

10.3 Fenotipo Secretor Asociado a la Senescencia (SASP)

De acuerdo al porcentaje de células senescentes obtenidas para cada día (Figura 3) y a que el SASP es una característica de las células senescentes que se manifiesta a etapas relativamente tardías, se decidió analizar el SASP el día 15 para los grupos de senescencia inducida SIPS y SPIIP y el día 21 para la SR. Se empleó el estuche comercial *RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array* para analizar 64 citocinas provenientes del SASP de los medios condicionados, de SIPS, SPIIP y SR como se describió en materiales y métodos.

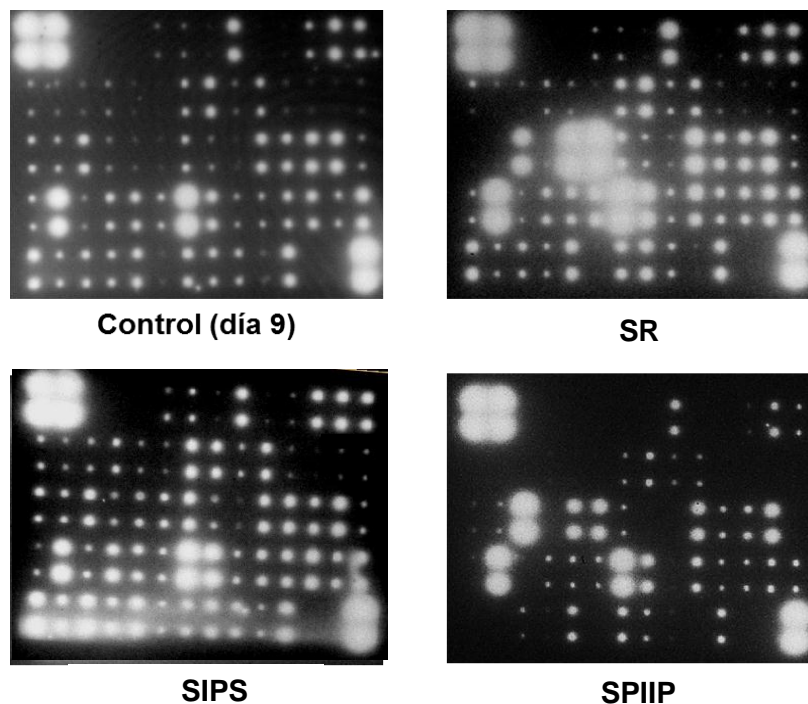


Figura 4. Análisis del SASP para las distintas formas de senescencia. Se muestran membranas representativas del análisis de 62 citocinas. Cada marca corresponde a una citocina específica.

La Figura 4 muestra cuatro membranas representativas del análisis del SASP. En estas imágenes, cada marca corresponde a la secreción relativa de una citocina en particular (por duplicado). Al analizar las membranas se observan diferencias entre los patrones de secreción de los tres grupos de estudio, además de diferencias en cuanto a la intensidad relativa de citocinas específicas en cada uno de ellos. El cambio más sorprendente fue el del grupo tratado con epoxomicina (SPIIP), en donde se observa que muchas de las citocinas secretadas por las células pre-senescentes no son secretadas por esas mismas células al llegar a la etapa de senescencia. Para cuantificar la secreción de la citocina de manera individual, se analizó la densidad óptica relativa (D.O.R.) de cada mancha utilizando el software ImageJ, normalizando contra el control positivo de cada membrana y el número de células obtenidas para cada muestra.

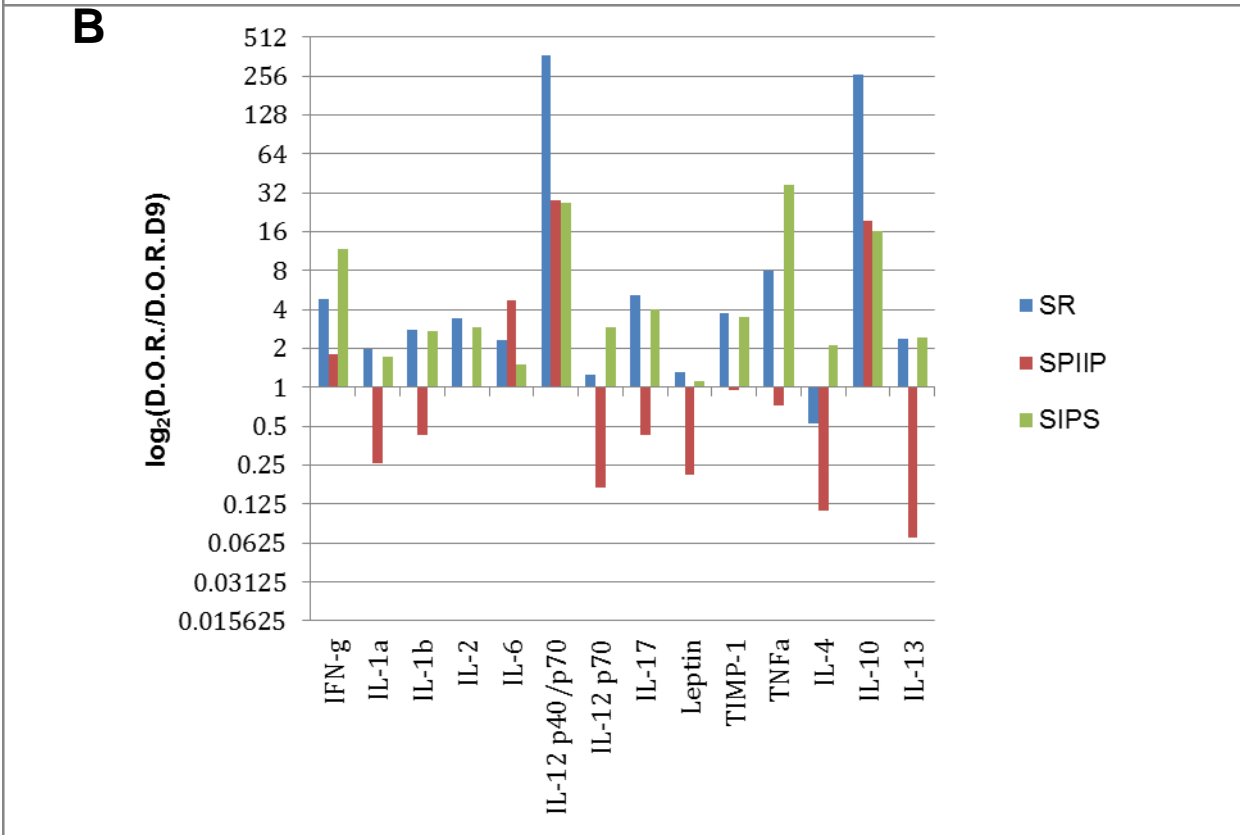
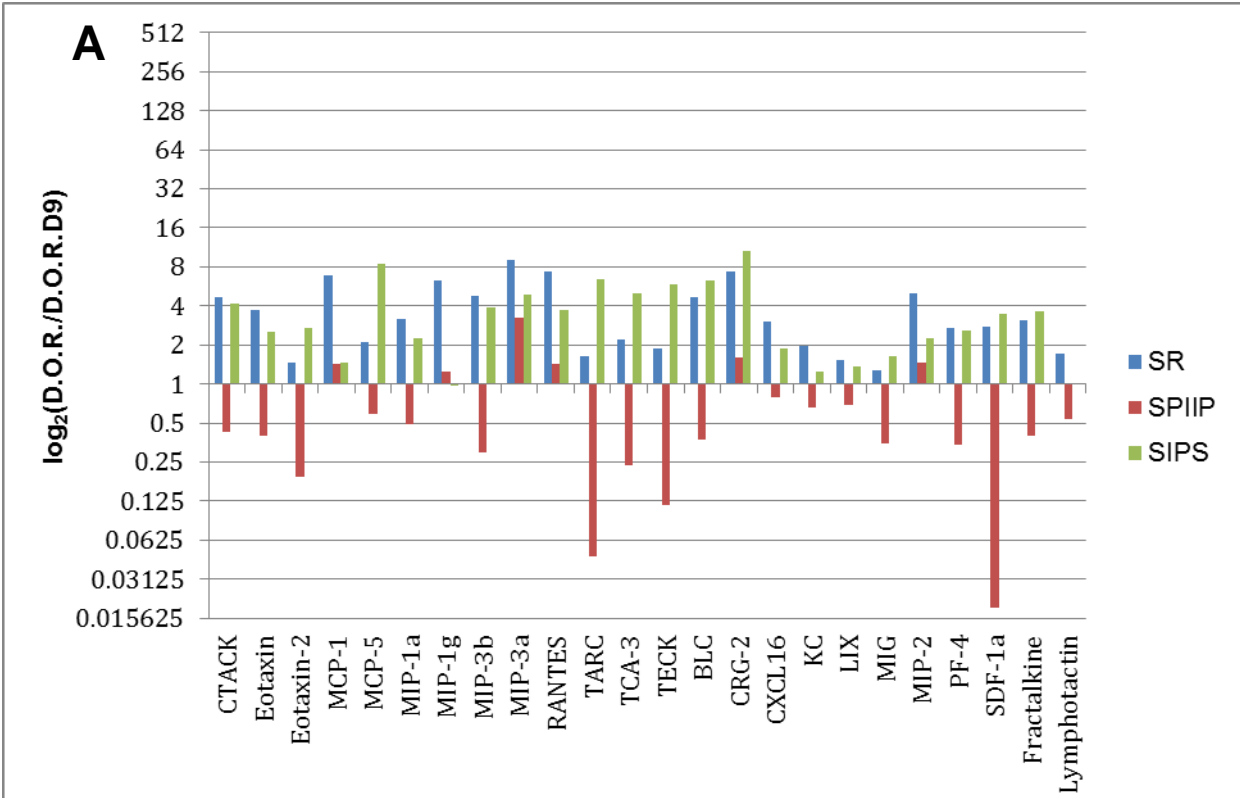
La figura 5 muestra el análisis semicuantitativo de las citocinas del SASP analizadas en este trabajo. Para un mejor entendimiento de los datos, las citocinas analizadas se dividieron en 4 grupos: 1) Quimiocinas (Figura 5-A), 2) Citocinas inflamatorias (Figura 5-B), 3) Factores de crecimiento (Figura 5-C) y 4) Otras citocinas y receptores solubles (Figura 5-D).

Tomando en cuenta todos los datos, se observa que en el grupo SR y SIPS, existe un aumento notable en la secreción de prácticamente todas las citocinas, con excepción de Fas L, IL-4 e IL-9 para el caso de la SR, para las cuales disminuyó su secreción. En cambio, en el grupo de SPIIP disminuyó la secreción de la mayoría de las citocinas, con excepción de CD30 L, CD40, ORG-2, IFN- γ , IL-3, IL-6, IL-10, IL-12/p40/p70, MCP1, MIP1- γ , MIP2, MIP3- α y

RANTES, para las cuales hubo un incremento en la secreción. El cambio más evidente en cuanto a secreción se obtuvo en la IL-10 e IL12/p40/p70, con un incremento aproximado de 256 veces (en escala \log_2) para el grupo de la SR y entre 16 y 32 veces para los otros 2 grupos. Por otro lado, la secreción de $\text{TNF}\alpha$ aumentó unas 32 veces para SIPS, comparado con unas 8 veces para SR. El incremento promedio de las demás citocinas fue de unas 8 veces.

En cuanto a la disminución de la secreción del grupo SPIIP, el cambio más notable se obtuvo en SDF1- α con aproximadamente 0.015625 veces, seguido de la IL-13, L-Selectina, TARC y TPO con 0.625 veces. El decremento promedio de las demás citocinas para el grupo SPIIP fue menor a 0.125 veces la secreción comparada con el grupo control.

En conjunto, estos datos sugieren una expresión diferencial del SASP dependiente del estímulo senescente que, en este estudio, se vio aminorado notablemente en la inducción de senescencia por inhibición del proteosoma.



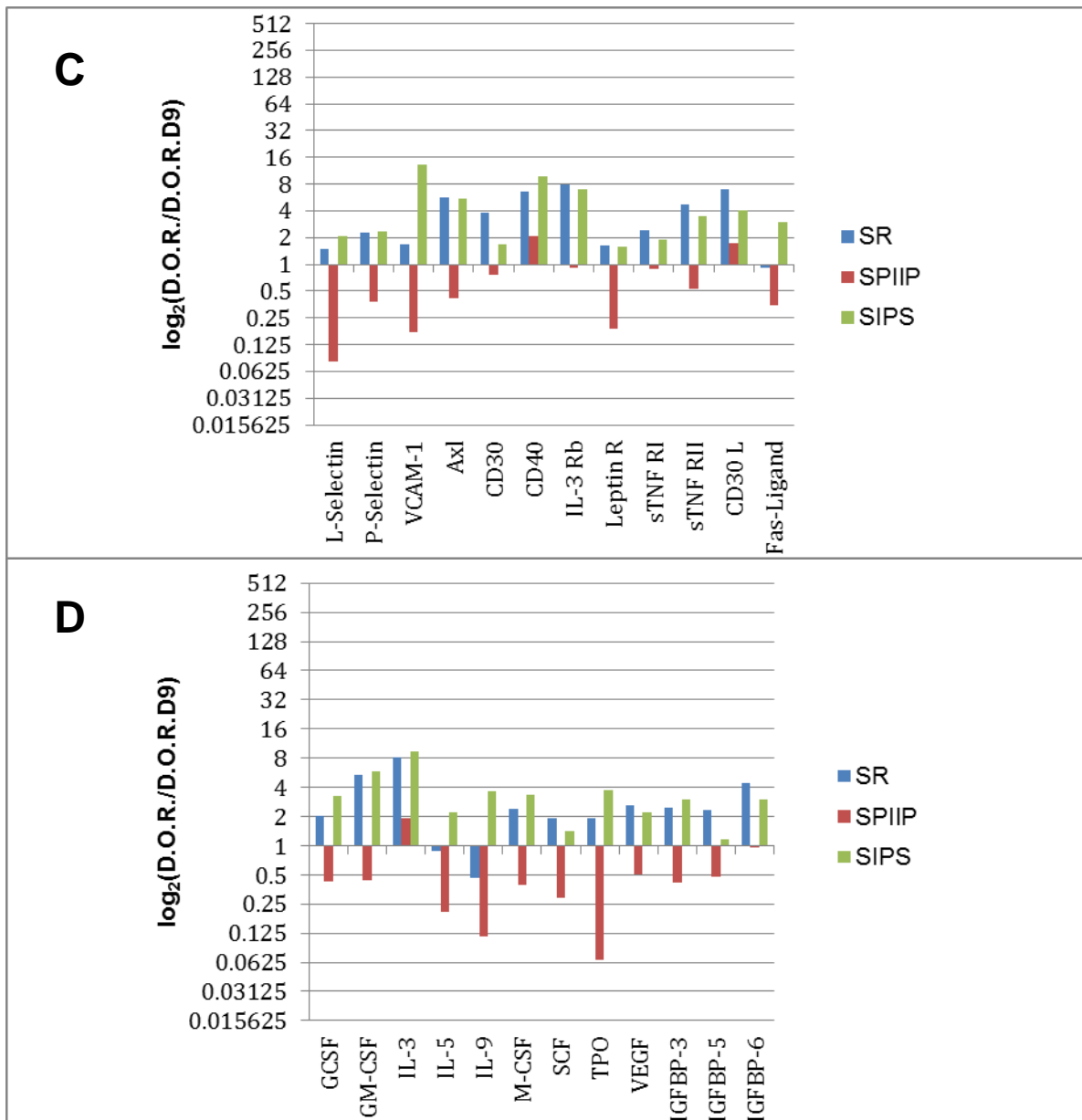


Figura 5. Secreción semicuantitativa del SASP de fibroblastos de pulmón de ratón inducidos a senescencia por distintos estímulos. Los datos están normalizados con respecto a la secreción de las células pre-senescentes (Día 9). A. Quimiocina. B) Citocinas inflamatorias. C) Factores de crecimiento. D) Otras citocinas y receptores solubles.

11. Discusión

La senescencia celular puede ser inducida por diversos estímulos, entre los que destacan el acortamiento de los telómeros (Cristofalo, et al., 2004, Rodier, et al., 2009, Rodier, et al., 2010), el estrés oxidante (López-Diazguerrero, et al., 2006), la inhibición de la autofagia (Kang, et al. 2011, Fujii, et al., 2012), la inhibición del proteosoma (Torres, et al., 2006, Bitto, et al., 2010) y la exposición a radiación (Lee, et al., 2011). En este trabajo se indujo senescencia prematura en un cultivo primario de fibroblastos de pulmón de ratón por medio de estrés oxidante, usando dosis subletales de H₂O₂ (75μM), y al inhibir parcialmente la actividad del proteosoma, utilizando epoxomicina (5nM); estas dos formas de inducir senescencia fueron comparadas con la SR. La figura 1 muestra una detención de la proliferación después de 15 días en cultivo para la SR y también muestra que al tratar las células con H₂O₂ o con epoxomicina la proliferación celular se detiene desde el día en que se añaden los reactivos. Esto concuerda con los experimentos de incorporación de [³H]-Timidina, en los que se observa un incremento en los días 9 y 12 seguido de una disminución en la incorporación a partir del día 15 en la SR, mientras que para la SIPS y la SPIIP se observa solamente un pequeño aumento en el día 15, pero no alcanzan los niveles de incorporación de la SR, por lo que ese aumento podría estar asociado a un mecanismo de reparación del ADN y no su replicación. La inducción de la SIPS en cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón ya ha sido reportada previamente por nuestro grupo de investigación (López-Diazguerrero, et al., 2006, Triana-Martinez, et al., 2013) y los resultados aquí mostrados acerca de la inducción de la senescencia por

SIPS concuerdan con los reportados. En cuanto a la SPIIP, Torres, et al. (2006) han reportado varios trabajos en los que se ha inducido senescencia prematura al inhibir el proteosoma con epoxomicina en diferentes tipos celulares, como fibroblastos humanos WI-38 y astrocitos humanos y de roedor; las concentraciones de epoxomicina utilizadas en estos reportes han sido desde 1 hasta 10 nM (Torres, et al., 2006, Bitto, et al., 2010). En este estudio, se observó una detención de la proliferación utilizando 5nM de epoxomicina.

Para determinar si la detención de la proliferación observada estaba asociada al fenómeno de senescencia evaluamos la expresión de 2 marcadores: p16 y β -galactosidasa. Aunque clásicamente se evidencia la actividad de la β -galactosidasa mediante una tinción (actividad SA- β -galactosidasa) (Dimri, et al., 1995), éste aumento en la actividad de la enzima está asociado a un aumento en su expresión (Capparelli, et al., 2012). Por esta razón, en este trabajo se decidió ensayar el aumento de la expresión de la enzima y del regulador del ciclo celular, p16, por medio de inmunocitoquímica, teniendo en cuenta que en el mismo experimento es posible evaluar la expresión relativa de las 2 proteínas, así como su localización celular. Es importante mencionar que esta forma de evaluar a dos marcadores de senescencia aún no ha sido reportada en la literatura. En la figura 2 se muestra que la detención de la proliferación observada en los fibroblastos estaba asociada a un aumento gradual de la expresión de la β -galactosidasa y de p16, para la senescencia replicativa, y a un aumento en las células inducidas a SIPS y SPIIP, en las cuales se observa una sobreexpresión de ambas proteínas desde el día 12 del cultivo, es decir, 3 días después de que fueron tratadas. Además, se observó una colocalización

de p16 con DAPI, lo que sugiere que éste regulador del ciclo celular se ha trasladado al núcleo y ejerce su acción sobre el complejo CDK4/6/Ciclina D, inhibiendo así la proliferación celular. Estos experimentos dan evidencia de que el tratamiento con dosis subletales de H₂O₂ y del inhibidor del proteosoma, epoxomicina, inducen senescencia prematura en los fibroblastos de pulmón de ratón.

Una de las características más interesantes de las células senescentes es su fenotipo secretor o SASP. Las células senescentes presentan un SASP sumamente complejo que incluye una gran variedad de citocinas y quimiocinas, además de factores de crecimiento (Coppé, et al., 2008; Coppé, et al., 2012; Rodier, et al., 2011; Bhat, et al., 2012) y se ha sugerido que las moléculas secretadas por las células senescentes pueden promover algunas actividades biológicas desfavorables, tales como la proliferación de células tumorales, la metástasis, o inducir inflamación relacionada a algunas enfermedades crónicas degenerativas (Campisi, et al., 2011, Kiecolt-Glaser, et al., 2003). En éste estudio, el objetivo principal fue evaluar si existían diferencias en las moléculas secretadas por las células senescentes cuando fueron inducidas a entrar en senescencia por distintos estímulos; se observó un patrón de secreción diferente en cada una de las distintas formas de senescencia con el cambio más sorprendente para la SPIIP, comparada con la SR.

En los primeros estudios comparativos acerca del SASP, (Coppé, et al., 2010), se ha reportado que la secreción del SASP en fibroblastos de ratón depende de la concentración de oxígeno a la que se incuben las células, además en un estudio posterior demostraron que el SASP no está presente en células que

sobreexpresan p16^{INK4a} y expresan los marcadores clásicos de senescencia. Los autores sugieren que el SASP es una característica presente en células inducidas a entrar en senescencia por algún mecanismo que incluya daño genómico o algún cambio epigenómico (Coppé, et al., 2010; Coppé, et al., 2011, Campisi, 2013). En nuestro trabajo la variable fue el estímulo que indujo senescencia y encontramos también variaciones en los componentes del SASP. Una hipótesis que podría explicar la notable disminución en la secreción de citocinas para la SPIIP (Figuras 5) tendría que ver con la inhibición parcial de la actividad del proteosoma: hay estudios que demuestran en diversos tipos celulares que la inhibición del proteosoma induce apoptosis debido a la acumulación de proteínas ubiquitinadas (Lopes, et al. 1997; Pandit, et. al., 2011; Cheng, et. al., 2011); sin embargo, una inhibición parcial utilizando dosis subletales induce senescencia celular en forma prematura (Torres, et al., 2006, Bitto, et al., 2010); ésta inhibición parcial de la actividad del proteosoma aumenta también la cantidad de proteínas ubiquitinadas pero en cantidades subletales para la célula (Cheng, et. al., 2011) y podría inducir un decremento en la tasa de síntesis de proteínas normal para evitar su acumulación a mediano plazo. Si esto es así, los componentes del SASP se verían también afectados en cuanto a su síntesis y las células inducidas a SPIIP conservarían sólo ciertos componentes del SASP con los que puedan comunicar su estado comprometido a las células adyacentes.

En este estudio, las citocinas que se encontraron más aumentadas fueron la IL-10 e IL-12, ya que se incrementaron aproximadamente 256 veces para SR y entre 16-32 veces en SIPS y SPIIP. La IL-10 es una citocina clave en la

regulación de la respuesta inflamatoria; su acción inmunosupresora actúa en macrófagos, monocitos, células T, B, NK (*Natural Killer cells*), mastocitos DC (*Dendritic Cells*) y granulocitos (Akdis, et. al., 2011). En células que expresan el receptor, la IL-10 a su vez inhibe la expresión de otras citocinas, tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF y TNF- α ; además de quimiocinas incluyendo MCP-1, MPC5, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e IL-8. Si las células inducidas a SPIIP expresan el receptor para IL-10 se presentaría una comunicación autocrina para éstas células; esto podría explicar parcialmente el decremento en la secreción de algunos de los componentes del SASP, sin embargo, se requiere un mayor conocimiento de las vías de señalización involucradas en la secreción del SASP y que pudieran afectarse diferencialmente en los distintos tipos de senescencia.

La IL-12 es una citocina heterodimérica constituida por dos subunidades: la cadena ligera p35 y la cadena pesada p40, codificadas en cromosomas distintos. Al unirse las dos subunidades, constituyen a la forma activa IL-12p70 (Akdis, et. al., 2011). Con el kit empleado en este trabajo se puede detectar en un pozo a IL-12p40/70 y en otro pozo diferente específicamente a IL-12p70 (Figura 5). Aquí obtuvimos un incremento muy pequeño de la forma activa IL-12p70, que estimula la respuesta inmune. El bajo nivel de la forma IL-12p70 sugiere que el incremento de IL-12 es prácticamente en la forma IL-12p40. El incremento de IL-12p40, y no de IL-12p70, puede deberse a una desregulación diferencial en la expresión de las 2 subunidades, p40 y p35, que al codificarse en distintos cromosomas poseen mecanismos de regulación específicos.

Otras citocinas relevantes en este estudio son las proinflamatorias IL-6 y $TNF\alpha$, las cuales ya han sido reportadas como principales componentes del SASP en diversos estudios en diferentes tipos celulares (Bhat, et. al., 2012; Coppé, et al., 2010; Coppé, et al., 2011). Aquí, se encontraron también aumentadas en los 3 tipos de senescencia, excepto $TNF\alpha$ para la SPIIP. Otras citocinas proinflamatorias analizadas en este trabajo fueron la $IL1\alpha/\beta$, IL-4, IL-17, KC, MIP-1 α/γ , MIP-2, MIP-3 β , MIP-3 α y PF-4, que junto con factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas que promueven la proliferación y la migración, tales como Axl, BLC, CD30, CXCL16, Eotaxina, GCSF, IGFBP's, IL-2, IL-9, M-CSF y VEGF, podrían favorecer la progresión de tumores y/o metástasis (Raman, et. al., 2011; Rostène, et. al., 2011). Debido a la disminución en la secreción de la mayoría de las citocinas, en la SPIIP estas actividades biológicas no serían tan favorecidas, comparada con los otros dos tipos de senescencia. Por otro lado, algunas citocinas que podrían atenuar esta respuesta, debido a su actividad antiinflamatoria, tales como la IL-4 e IL-10, tuvieron diferentes patrones de secreción, por ejemplo la IL-4 sólo aumentó en la SR, mientras que la IL-10 aumentó notablemente en los 3 tipos de senescencia; esto podría deberse a un efecto compensatorio para mantener la homeostasis entre la secreción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, pero el efecto fisiológico dependerá de las células que reciban los estímulos enviados por las células senescentes.

El perfil proinflamatorio del SASP es típico en la literatura (Coppé, et al., 2010; Coppé, et al., 2011), aunque sus efectos en conjunto *In Vivo* aún no han sido bien estudiados, por lo que hasta ahora sólo se han hipotetizado las

actividades biológicas potenciales que podría tener. Ya que se sabe que las citocinas tiene efectos distintos sobre los diferentes tipos celulares, el siguiente paso en el estudio del SASP debería ser el tratar de analizar células están siendo afectadas por el SASP y cómo. Aunado a esto, en estudios posteriores también se deberá considerar algunas otras propiedades de las citocinas, tales como la sinergia que presentan entre ellas para llevar a cabo sus funciones y su carácter pleiotrópico, lo cual aumentaría la complejidad del estudio del SASP.

12. Conclusión

La senescencia celular es un fenómeno caracterizado primordialmente por la detención de la proliferación, por lo que clásicamente es entendido como un mecanismo supresor de tumores. Sin embargo, la acumulación de células senescentes en los tejidos de los organismos contribuye al fenotipo envejecido y puede favorecer la progresión de enfermedades asociadas a la edad. Ésta característica pleiotrópica de las células senescentes es explicada por el SASP, cuyos componentes pueden inducir actividades biológicas favorables o desfavorables al individuo dependiendo de las células que reciban las señales enviadas por las células senescentes.

En este trabajo se caracterizó la SPIIP y se comparó con otros tipos de senescencia reportadas previamente: SIPS y SR, en cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de ratón. Aquí demostramos que la inhibición de la actividad del proteosoma induce senescencia prematura y que la expresión de los marcadores de senescencia p16 y β -galactosidasa, así como la

característica detención de la proliferación, es similar a la SIPS. Para la SR se obtienen resultados similares pero hasta el día 21 de iniciado el cultivo.

Por otro lado, en este trabajo se evaluó la secreción de citocinas por las células senescentes. De manera interesante, se observaron diferencias en los patrones de secreción de éstas moléculas, principalmente en la SPIIP. Por lo que en resumen, demostramos que, aunque los marcadores clásicos de senescencia sean similares sin importar el estímulo que la induzca, el SASP de las células senescentes sí es dependiente del estímulo que reciban las células para volverse senescentes. Estos datos abren un campo de estudio muy interesante en el que el principal objetivo será reconocer los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de los componentes del SASP para cada tipo de senescencia y posteriormente buscar moléculas que puedan participar en ésta regulación para inhibir principalmente a los componentes del SASP que pudieran favorecer la progresión de enfermedades relacionadas con la edad sin afectar la secreción de moléculas que pudieran resultar benéficas para el individuo.

13. Referencias

- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C. 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferón- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127. 701-721.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J., Knudsen, B., Plymate, S., Nelson, P. 2006. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 66. 794-802.
- Bhat, R., Crowe, E., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C., Garcia, F., Johnson, F., Trojanowski, J., Sell, C., Torres, C. 2012. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS ONE.* 7. e45069.
- Bitto, A., Sell, C., Crowe, E., Lorenzini, A., Malaguti, M., Hrelia, S., Torres, C. 2010. Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp. Cell Res.* 316. 2961-2968.
- Ben-Porath, I., Weinberg, R. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *The Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 37. 961-976.
- Burton, D., Matsubara, H., Ikeda, K. 2010. Pathophysiology of vascular calcification: pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells. *Exp. Gerontol.* 45. 819-824.
- Campisi, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75. 685-705.
- Campisi, J., Andersen, J., Kapahi, P., Melov, S. 2011. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin. Cancer Biol.* 21. 354-359.
- Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8. 729-740.
- Capparelli, C., Chiavarina, B., Whitaker-Menezes, D., Pestell, T., Pestell, R., Hult, J., Andò, S., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U., Sotgia, F., Lisanti, M. 2012. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle.* 11. 3599-3610.
- Chen, Z., Trotman, L., Shaffer, D., Lin, H., Dotan, Z., Niki, M., Koutcher, J., Scher, H., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 436. 725-730.

- Cheng, B., Maffi, S., Martínez, A., Villareal, Y., Morales, L., Roberts, J. 2011. Insulin-like Growth Factor-I mediates neuroprotection in proteasome inhibition-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Mol Cell Neurosci.* 47. 181-190.
- Chiu, J., Dawes, I. 2012. Redox control of cell proliferation. *Trends in Cell Biol.* 22.592-601.
- Coppé, J., Patil, C., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C., Parrinello, S., Hodgson, J., Chin, K., Desprez, P., Campisi, J. 2010. A Human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE.* 5. e9188.
- Coppé, J., Rodier, F., Patil, C., Freund, A., Desprez, P., Campisi, J. 2011. The tumor supresor and aging biomarker p16^{INK4a} induces celular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* 286. 36396-36403.
- Coqueret, O. 2003. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biol.* 13. 65-70.
- Cosme-Blanco, W., Shen, M., Lazar, A., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A., Chang, S. 2007. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis *in vivo* by initiating p-53 cellular senescence. *EMBO reports.* 8. 497-503.
- Dilley, T., Bowden, G., Chen, Q. 2003. Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity. *Exp. Cell Res.* 290. 38-48.
- Dimri, G. 2005. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell.* 7. 505-512.
- Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., Campisi, J. 1995. A biomarker than identifies senescent human cells in culture and in aging skin *In Vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92. 9363-9367.
- Erusalimsky, J., Kurz, D. 2005. Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp. Gerontol.* 40. 634-642.
- Finch, C., Tanzi, R. 1997. Genetics of aging. *Science* 278. 407-4011.
- Freund, A., Patil, P., Campisi, J. 2011. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 30. 1536-1548.
- Fujii, S., Hara, H., Araya, J., Takasaka, N., Kojima, J., Ito, S., Minagawa, S., Yumino, Y., Ishikawa, T., Numata, T., Kawaishi, M., Hirano, J., Odaka, M., Morikawa, T., Nishimura, S., Nakayama, K., Kuwano, K.

2012. Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncolmmunology*. *1*. 630-641.
- Gorenne, I., Kavurma, M., Scott, S., Bennett, M. 2006. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc.Res.* *72*. 9-17
 - Hayflick, L. 1965. The limited *In Vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *37*.614-636.
 - Hayflick, L. Moorhead, P. 1961. The serial cultivation of human cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*.585-621.
 - Harley, C., Futcher, A., Greider, C. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*.*345*. 458-460.
 - Harman, D. 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* *11*. 298-300.Hasty, P., Campisi, J., Hoeijmakers, J., van Steeg, H., Vijg, J. 2003. Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science*.*299*. 1355-1359.
 - Itahana, K., Dimri, G., Campisi, J. 2001. Regulation of celular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.* *268*. 2784-2791.
 - Kiecolt-Glaser, J., Preacher, K., MacCallum, R., Atkinson, C., Malarkey, W., Glaser, R. 2003.Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc. Nat. Acad. USA.* *100*. 9090-9095.
 - Jackson, S., Bartek, J. 2009.The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature rev.* *461*.1071-1078.
 - Jun, J., Lau, L. 2010. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* *12*. 675-685
 - Kang, H., Lee, K., Kim, S., Choi, H., Park, S. 2011. Autophagy impairment induces premature senescence through a ROS- and p53-dependent manner in primary human fibroblasts. *PLoS ONE*.*6*. e23367
 - Kirkwook, T.,Austad, S. 2000. Why do we age? *Nature**408*. 233-238.
 - Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R., Hearn, S., Simon, J., Miething, C. 2008. Senescence of activated stellate cells limit liver fibrosis. *Cell* *134*.657-667.
 - Lee, J., Kim. B., Park, M., Lee, Y., Kim, Y., Lee, B., Lee, J. 2011. PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation. *Cell Death Different.* *18*.666-677.

- Liu, D., Hornsby, P. 2007. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* 67. 3117-3126.
- Lopes, U., Erhardt, P., Yao, R., Cooper, G. 1997. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J. Biol. Chem.* 272. 12893-12896.
- López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell* 153. 1194-1217.
- López-Diazguerrero, NE., López-Araiza, H., Conde-Perezprina, J., Bucio, L., Cárdenas-Aguayo, M., Ventura, J., Covarrubias, L., Gutiérrez-Ruiz, M., Zentella, A., Königsberg, M. 2006. Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Rad. Biol. Med.* 40. 1161-1169
- Muller, M. 2009. Cellular Senescence: Molecular mechanisms, *In Vivo* Significance and Redox Considerations. *Antioxid. Redox Signal.* 11. 59-98.
- Pandit, B., Gartel, A. 2011. Proteasome inhibitors induce p53-independent apoptosis in human cancer cells. *Am. J. Pathol.* 178. 355 - 360.
- Rajawat, Y., Hilioti, Z., Bossis, I. 2009. Aging: Central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res. Rev.* 8. 199-213.
- Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A. 2011. Chemokines in health and disease. *Exp. Cell Res.* 317. 575-589.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., Levine, A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9. 402-412.
- Rodier, F., Campisi, J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 192. 547-556.
- Rodier, F., Campisi, J., Bhaumik, D. 2007. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res.* 35. 7475-7484.
- Rodier, F., Coppé, D., Patil, C., Hoeijmakers, W., Muñoz, D., Raza, S., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A., Campisi, J. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11. 973-979.
- Rodier, F., Muñoz, D., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J., Campeau, E., Beauséjour, C., Kim, S., Davalos, A., Campisi, J. 2011. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. of Cell Scien.* 124. 68-81.

- Rostène, W., Guyon, A., Kular, L., Godefroy, D., Barbieri, F., Bajetto, A., Banisadr, G., Callewaere, C., Conductier, G., Rovère, C., Mèlik-Parsadaniantz, S., Florio, T. 2010. Chemokines and chemokine receptors: New actors in neuroendocrine regulations. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 32. 10-24.
- Shay, J., Pereira-Smith, O., Wright, W. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 196.33-39.
- Torres, C., Lewis, L., Cristofalo, V. Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescence-like phenotype of human fibroblasts. *J. CellPhysiol.* 207.845-853.
- Toussaint, O., Medrano, E., von Zglinicki, T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* 35. 927-945.
- Triana-Martínez, F., López-Diazguerrero, N., Maciel-Barón, L., Morales-Rosales, S., Galván-Arzate, S., Fernández-Perrino, F., Zentella, A., Gómez-Quiroz, L., Königsberg, M. 2013. Cell proliferation arrest and redox state status as part of different stages during senescence establishment in mouse fibroblasts. *Biogerontology*. EN PRENSA. DOI 10.1007/s10522-013-9488-6
- Wagner, M., Hampel, B., Bernhard, D., Hala, M., Zwerschke, W., Jansen-Durr, P. 2001. Replicative senescence of human endothelial cells *in vitro* involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp. Gerontol.* 36. 1327-1347.
- Wang, W., Chen, J., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J., Huang, S., Sun, P. 2002. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic *ras*-induced premature senescence. *Mol. Cell. Biol.* 22. 3389-3403.
- Williams, G. 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution*. 11. 398-411.