



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Efecto de los niveles de catalasa sobre el  
estrés oxidativo, la senescencia replicativa, la  
muerte celular y el envejecimiento del  
organismo**

**TESIS**

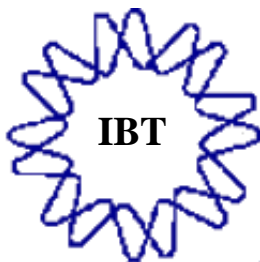
que para obtener el grado académico de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**Osiris Cuevas Benítez**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles



CUERNAVACA, MOR., 2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A mi madre y hermana,  
quienes han sido para mí pilares y ejemplo de vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser un espacio que brinda conocimientos de alta calidad.*

*Expreso mi agradecimiento al Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles, por permitirme formar parte de este proyecto, bajo su dirección y asesoría, por su valiosas enseñanzas durante el desarrollo del mismo.*

*Agradezco también a mis sinodales por su apoyo en la revisión del escrito y por sus sugerencias, observaciones y críticas, que fueron enriquecedoras: al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, a la Dra. Rosa María Uribe, a la Dra. Ana Clorinda Arias y a la Dra. Carmen Beltrán.*

*También quiero agradecer al Dr. Mauricio Díaz Muñoz, a la M en C. Olivia Vázquez, y al M. en C. Adrián Báez, del Instituto de Neurobiología-UNAM, por su amable colaboración y apoyo en el desarrollo de los experimentos de daño oxidativo al tejido de los ratones.*

*Mi agradecimiento también es para la M. en C. Concepción Valencia por enseñarme a trabajar dentro del cuarto de cultivo.*

*Agradezco a Gloria Villa, a Maribel Velasco y al Ing. Jalil Saab por su apoyo y asesoría en los trámites de inscripción de cada semestre y en los trámites de titulación. A Shirley Ainsworth por su asesoría en la búsqueda bibliográfica. A los miembros del centro de cómputo por su servicio y asesoría técnica en cuestiones computacionales.*

*Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico en el proyecto.*

*Agradezco a mis compañeros Agustina Cano, Andrea Mendoza, Yuri Ximello, Brenda Sarquíz, David Hernández, Manuel Baizabal, Rocío Hernández y Rodrigo Osorno, por su disponibilidad de ayuda y por hacer del laboratorio un espacio agradable y motivante.*

*Estoy eternamente agradecida con mi madre, quien ha sido los cimientos de este hogar, por su amor incondicional, por enseñarme que cada quien es responsable de su vida, por sus exquisitos guisos, por estar cuando la he necesitado...por estar. Agradezco a mi padre, por enseñarme a amar el campo y a respetar la tierra, porque con él entendí que nada ni nadie es para siempre, y porque dejar ir también significa amar. A Erika, mi querida hermana, por ser quien me ha enseñado a disfrutar lo que tengo y a reírnos de nosotros mismos aún en las adversidades. A ellos agradezco por enseñarme a amar de esta vida que nada es tan serio como parece.*

*También quiero expresar mi agradecimiento a mis familiares y amigos. A todos, sin excepción: simplemente gracias.*

# ÍNDICE

<b>Agradecimientos.....</b>	<b>3</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>8</b>
<b>Lista de tablas.....</b>	<b>9</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>10</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>11</b>
<b>II. Antecedentes.....</b>	<b>12</b>
II.1 Estrés oxidativo.....	12
II.1.1 Generación de ERO en la cadena respiratoria.....	12
II.1.2 Proteínas antioxidantes.....	13
II.1.3 Estrés oxidativo en la longevidad del organismo (Modificación a DNA, proteínas y lípidos por daño oxidativo).....	15
II.2 Senescencia replicativa.....	16
II.2.1 Respuestas celulares de la senescencia.....	17
II.2.2 Telómeros y senescencia.....	17
II.2.3 Supresores de tumores en respuesta a senescencia.....	17
II.2.4 Papel de la senescencia replicativa en el envejecimiento.....	18
II.3 Muerte celular.....	19
II.4 Longevidad y envejecimiento.....	20
II.4.1 Envejecimiento prematuro.....	20
II.4.2. Algunas vías de señalización involucradas en la longevidad.....	21
II.4.2.1 Importancia de las vías insulina/IGF-1, resistencia al estrés, sirtuinas y supresores de tumores en la longevidad.....	21
II.4.3 Estrés oxidativo y la longevidad (Longevidad y estrés oxidativo).....	22
II.4.4 Función mitocondrial implicada en la longevidad.....	22
II.5 Restricción calórica.....	23

II.5.1	Algunas sirtuinas implicadas en la restricción calórica.....	23
II.5.2	El tejido adiposo en el envejecimiento.....	24
<b>III.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>26</b>
<b>IV.</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>V.</b>	<b>Objetivo.....</b>	<b>27</b>
<b>VI.</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
VI.1	Genotipificación de los ratones mutantes de la catalasa.....	28
VI.1.1	Diagnóstico por descomposición del peróxido en sangre de ratones mutantes .....	28
VI.1.2	Diagnóstico por PCR .....	29
VI.2	Daño oxidativo al tejido de los ratones.....	33
VI.2.1	Determinación de dienos conjugados.....	37
VI.2.2	Determinación de lípidos peroxidados mediante el método TBARS..	38
VI.2.3	Determinación de carbonilos.....	40
VI.3	Senescencia replicativa en fibroblastos embrionarios.....	41
VI.3.1	Cultivo y subcultivo de fibroblastos embrionarios de ratón.....	41
VI.3.2	Tinción de células para detectar actividad $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ Gal).....	44
VI.4	Susceptibilidad de células a morir con $H_2O_2$ .....	46
VI.5	Determinación de la curva de supervivencia por el método de Kaplan-Meier.	46
<b>VII.</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>48</b>
VII.1	Diagnóstico del genotipo de los ratones mutantes de la catalasa.....	48
VII.1.1	Diagnóstico por descomposición del peróxido en sangre.....	48
VII.1.2	Diagnóstico por PCR.....	50
VII.1.3	Características fenotípicas de los ratones mutantes.....	55
VII.2	Daño oxidativa a tejido de ratones mutantes.....	57

VII.2.1 Niveles de dienos conjugados (Modificiación a lípidos).....	58
VII.2.2 Niveles de malondialdehído (MDA) (Modificiación a lípidos).....	63
VII.2.3 Niveles de carbonilos (Modificiación a proteínas).....	67
VII.2.4 Conclusiones de los resultados de la determinación de daño oxidativo.....	70
VII.3 Senescencia replicativa.....	70
VII.3.1 Obtención de los fibroblastos embrionarios de ratón.....	70
VII.3.2 Envejecimiento de los fibroblastos.....	71
VII.3.3 Detección de $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia.....	73
VII.4 Susceptibilidad de las células a morir con $H_2O_2$ .....	73
VII.5 Longevidad de los ratones.....	74
VII.6 Ratones transgénicos que sobreexpresan la catalasa.....	76
<b>VIII. Conclusiones.....</b>	<b>77</b>
<b>IX. Perspectivas.....</b>	<b>79</b>
<b>X. Anexos.....</b>	<b>81</b>
VIII.1 Anexo 1: Preparación de soluciones para el PCR.....	81
VIII.2 Anexo 2: Desarrollo del protocolo para la purificación de oligonucleótidos.....	81
VIII.3 Anexo 3: Preparación de soluciones para la determinación de carbonilos.....	83
VIII.4 Anexo 4: Preparación de soluciones para el cultivo de fibroblastos.....	83
VIII.5 Anexo5:Preparación de soluciones para detectar actividad $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia.....	85
VIII.6 Anexo 6: Peso corporal de ratones machos y hembras $Cas^{+/+}$ , $Cas^{+/-}$ y $Cas^{-/-}$ .....	88
<b>XI. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>89</b>

## XII. LISTA DE ABREVIATURAS

age-1, AGEing alteration family member  
ATP, Adenosin Trifosfato  
Bax, Bcl-2 associated X protein, es un gen proapoptótico  
CAT, Catalasa  
clk-1, CLoCK (biological timing) abnormality [*Caenorhabditis elegans*]  
CTE, cadena de transporte electrónico  
Daf-2, abnormal DAuer Formation, codifica para el receptor de insulina/IGF-1 , regula la actividad de Daf-16  
DC, Dienes conjugados  
DMEM, Dubbelco's Modified Eagle's Medium  
DNA, Desoxirribonucleic acid  
DNPH, Dinitrofenilhidrazina  
EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid  
EO, Estrés oxidativo  
ERN, Especies Reactivas de Nitrógeno  
ERO, Especies Reactivas de Oxígeno  
FADH flavín adenin dinucleótido  
FM, Fecha de Muerte  
FOXO, Forkhead box sub-group O  
FS, Fecha de sacrificio  
Gpx, Glutathione peroxidase  
GSH, Glutación en su forma reducida  
IGF-1, Insulin-like growth factor 1  
L•, radical lipídico  
LH, ácido graso poli-insaturado  
LOO•, radical peroxil  
MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase  
MDA, Malondialdehyde  
MEK, MAPK kinase o Erk Kinase family member  
MST1, 2, Macrophage stimulating 1 and 2, the human serine/threonine protein kinase (de las vías JNK y p38 MAPK), comparte homología con Ste20 y p21  
NAD, Nicotinamida adenin dinucleótido  
NADH Nicotinamida adenin dinucleótido (forma reducida)  
NADPH nicotinamida adenín dinucleótido fosfato  
NFK- $\beta$  nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1  
8-OH d-Gua, 8-hidroxideoxiguanosina  
p53, proteína nuclear de 53Kda, es un gen supresor tumoral, llamado el guardián del genoma  
PBS (Phosphate-buffered saline)  
PCR, Polymerase Chain Reaction  
PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase  
PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator activated receptor gamma  
pRB Retinoblastoma protein, proteína supresora tumoral descubierta en retinoblastoma humano



RAS, Rat sarcome (es un oncogen aislado originalmente de ratas con sarcoma)  
 RC, Restricción calórica  
 Rec Q, Recombinase  
 RNA, Ribonucleic acid  
 SFB, Suero Fetal Bovino  
 SOD, Superóxido Dismutasa  
 Ste20, STerile Protein kinasa en *S. cerevisiae*  
 TAB, Tejido Adiposo Blanco  
 TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances  
 TerC, Tellurium resistance protein  
 Tor, Target of rapamycin  
 WRN, Werner syndrome  
 SIR; silent information regulator  
 sir-2.1, yeast SIR related [*Caenorhabditis elegans*]  
 Sirt1, sirtuin 1 ((silent mating type information regulation 2, homolog) 1 (*S. cerevisiae*)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura.1 Producción de ERO en la mitocondria.  
 Figura.2 Escisión del gen *Cas* de ratón.  
 Figura.3 Mapa de restricción parcial del gen *Cas* del ratón para identificar el alelo mutado y el no mutado.  
 Figura.4 Volumen aumentado en la reacción de descomposición del  $H_2O_2$  en sangre de ratones mutantes.  
 Figura.5 Grado de descomposición del  $H_2O_2$  en sangre de ratones mutantes.  
 Figura.6 Diagnóstico, por PCR, del genotipo de algunos ratones mutantes para la catalasa.  
 Figura.7 Mapa genealógico de la oblación de ratones  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$  diagnosticados por PCR y por el ensayo de descomposición de  $H_2O_2$  en sangre.  
 Figura.8 Peso corporal de algunos ratones mutantes y silvestres.  
 Figura.9 Dienos conjugados en tejido de ratones mutantes de diferentes edades.  
 Figura.10 Niveles de MDA, en tejido de ratones mutantes de diferentes edades.  
 Figura.11 Nivel de proteínas modificadas por daño oxidativo en función de la edad.  
 Figura.12 Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratones mutantes  $Cas^{-/-}$  de 12 dpc.  
 Figura.13 Duplicación de la población con respecto al tiempo en fibroblastos de ratones embrionario.  
 Figura 14 Supervivencia de ratones machos (14.A) y hembras (14.B) calculado por el método de Kaplan Meier.  
 Figura 15 Anexo 6. Pesos corporales de animales mutantes machos (barras azules) y hembras (barras rosas)  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$  de diferentes edades.

## LISTA DE TABLAS

- Tabla1 Volumen de PBS 1X utilizado para el proceso de homogenización de los tejidos de ratón.
- Tabla2 Curva patrón de proteína para determinar la concentración de proteína de las muestras de los tejidos homogenizados.
- Tabla3 Procedimiento para realizar el ensayo de cuantificación de la proteína por el método de Lowry.
- Tabla4 Descomposición de  $H_2O_2$  en sangre de ratones mutantes.
- Tabla5 Resumen de los resultados de la determinación de los dienos conjugados.
- Tabla6 Resumen de los resultados de la determinación de lipoperoxidación por el método de TBARS.
- Tabla 7 Resumen de los resultados de la determinación de carbonilos.
- Tabla 8 Sensibilidad de las células a morir con  $H_2O_2$ .

## RESUMEN

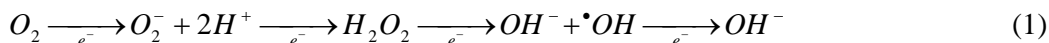
La teoría de los radicales libres sugiere que las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), formadas dentro de la célula, causan una acumulación de daños tal que provoquen una disminución de las funciones celulares y por ende del organismo. Para contener con las ERO existen agentes antioxidantes como la catalasa, que es una enzima que juega un papel muy importante en la descomposición del  $H_2O_2$ , evitando la generación de radicales  $OH^\bullet$  por la reacción de Fenton.

En este trabajo se estudió el efecto de los niveles de la catalasa sobre el daño oxidativo, la senescencia celular y el envejecimiento. Para esto se utilizaron ratones modificados genéticamente por recombinación homóloga en células troncales embrionarias, tal que carecen de esta enzima en todos los órganos (ratones  $cas^{-/-}$ ), y se compararon con ratones silvestres. No se encontraron, a simple vista, anomalías en el desarrollo, morfología y fenotipo de los ratones y fibroblastos embrionarios de ratones  $cas^{-/-}$ , comparado con los silvestres. No hay una diferencia significativa en el peso corporal de los ratones machos mutantes, comparado con los silvestres, analizados de 3 a 10 meses de edad.

Se encontró que los niveles de dienos conjugados y de malondialdehído (MDA), varían según el tejido y la edad, en los ratones mutantes y silvestres. En general, no se encontró mayor daño oxidativo en ratones  $cas^{-/-}$  comparado con los silvestres; es más, sorprendentemente los niveles de dienos conjugados a los 8 meses es mayor en los tejidos de los ratones silvestres que en el de los mutantes. En la mayoría de los tejidos de ratones  $cas^{+/-}$ , los niveles de MDA son menores que en los tejidos de ratones  $cas^{+/+}$  y  $cas^{-/-}$ . Se presentaron cambios ontogénicos en los niveles de carbonilos de tejidos de ratones silvestres, con un aumento significativo a los 8 meses de edad, que no se presentó en los mutantes. El análisis de supervivencia indica que existe una diferencia en el porcentaje de supervivencia de animales  $cas^{-/-}$  en comparación con los silvestres en edades avanzadas y particularmente en las hembras, aproximadamente después de los 20 meses de edad. Estos resultados, aunados con que el doblaje de la población de los fibroblastos de ratones  $cas^{-/-}$  y  $cas^{+/+}$  con respecto al tiempo, se comportan de manera similar, sugieren la posibilidad de que se generen efectos compensatorios por la falta de catalasa que hacen más eficiente la defensa antioxidante, pero que esto depende del tejido, del nivel de la catalasa y de la edad del organismo.

# I. INTRODUCCIÓN

El organismo, desde su formación, sufre diversos cambios bioquímicos necesarios para su desarrollo o función, pero éstos también pueden ser deletéreos tal que le provoquen un mal funcionamiento y eventualmente la muerte. El organismo en general, tiene un tiempo de vida promedio que pudiera depender en parte de un programa genético, pero también del medio ambiente al que es expuesto, entre otras causas. Por ejemplo, el oxígeno captado en la respiración por un organismo, en las células es reducido a agua en un proceso donde se generan intermediarios altamente reactivos. Cuando el oxígeno molecular capta un electrón proveniente de un agente reductor, se genera el anión superóxido ( $O_2^-$ ); la adición de otro electrón conduce a la formación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que es una molécula reactiva por tener enlaces débiles; la ganancia de otro electrón genera la formación del radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ), que es una molécula muy reactiva con un electrón libre no apareado; finalmente la incorporación de un cuarto electrón conduce a la formación de agua. Así, estas especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas por el metabolismo, por ser reactivas, son capaces de oxidar moléculas orgánicas, y pueden generar inestabilidad genética y muerte celular entre otros, especialmente si los mecanismos de defensa son insuficientes (Johnson, 1999). Al estado en el cual la concentración de las especies reactivas de oxígeno es tal que pueda dañar a las macromoléculas de la célula se le denomina estrés oxidativo.



Para contender con el estrés oxidativo, existen en los organismos diferentes clases de defensas antioxidantes, que son moléculas capaces de prevenir o neutralizar los efectos de los radicales libres, pueden ser agentes enzimáticos o no enzimáticos, generados en el organismo o provenientes de las dietas. Entre los enzimáticos se encuentran las enzimas superóxido dismutasas (SODs), las catalasas y las peroxidasas.

Sin embargo, la acción de los agentes antioxidantes no es perfecta y su efecto se puede ver disminuido por altas concentraciones de las especies reactivas de oxígeno (ERO), estimulada por la contaminación (por ejemplo, en la adición de óxido de nitrógeno), por el efecto de la radiación ultravioleta, y por el paso del tiempo, entre otras causas. Las consecuencias moleculares del estrés oxidativo incluyen modificación a proteínas, lípidos y DNA.

Se ha visto que los fibroblastos de ratón en cultivo expuestos a diferentes porcentajes de oxígeno, muestran cambios en la tasa de proliferación celular, y experimentan una mayor acumulación del daño al DNA con un 20% de  $O_2$  que con 3% de  $O_2$  (Parrinelo *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere que la proliferación de células dañadas por agentes oxidantes está relacionada con el número de veces que un fibroblasto en cultivo puede replicarse, y que el daño al DNA limita la proliferación de fibroblastos de ratón en 20% de oxígeno. Por otro lado, el daño causado al DNA es mutagénico, y cuando es irreparable puede provocar alteraciones cromosómicas que den lugar a pausa en el crecimiento celular.

A la pérdida de la capacidad de replicarse que tiene una célula se le denomina senescencia replicativa. Mientras que la longevidad de un organismo está definida como el tiempo de vida máximo, y comúnmente se determina por el envejecimiento paulatino del organismo. El envejecimiento de un organismo a su vez pudiera estar vinculado con la senescencia replicativa.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el proceso de envejecimiento, sin embargo los mecanismos aún son desconocidos. También se han reportado algunos marcadores biológicos del envejecimiento, sin embargo la mayoría de los marcadores que muestran cambios asociados con la edad, son el resultado del envejecimiento, no la causa.

En el presente proyecto estudiaremos el fenómeno de envejecimiento, senescencia replicativa, y muerte celular a través de modificar el estado de estrés oxidativo mediante la variación de los niveles de expresión de la enzima catalasa en ratones modificados genéticamente.

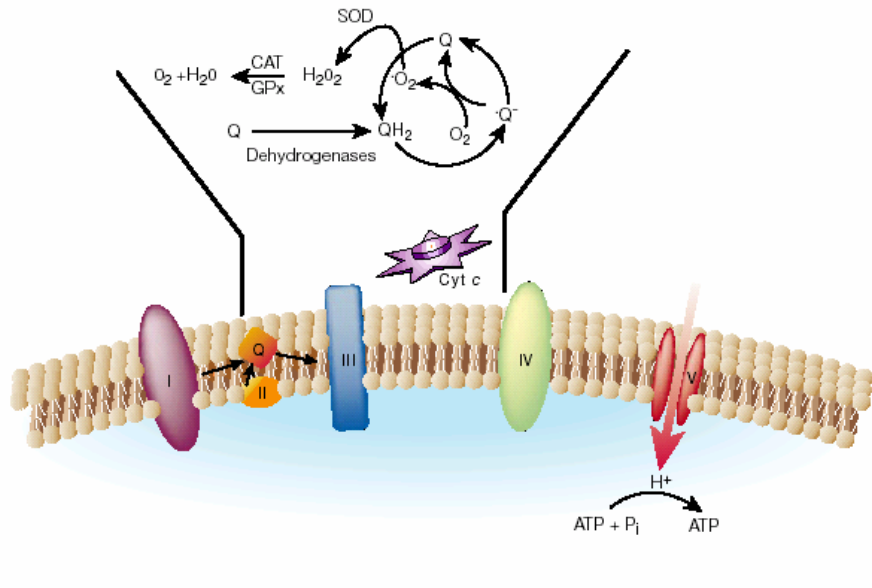
## **II. ANTECEDENTES**

### **II.1 ESTRÉS OXIDATIVO (EO)**

El proceso de la reducción del  $O_2$  a agua, da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno, como el radical anión superóxido, el peróxido y el radical hidroxilo. Estos intermediarios son los responsables de la toxicidad del  $O_2$ . Existen dos maneras de producir especies reactivas de oxígeno: una denominada activa, en donde las especies reactivas se forman con alguna finalidad biológica particular, como en muerte celular o en fagocitosis; y la forma pasiva, donde las especies reactivas de oxígeno se forman como consecuencia del metabolismo celular, donde la mayor producción de especies reactivas proviene de la mitocondria, por “fuga” en el sistema de transporte de electrones.

#### **II.1.1 Generación de ERO en la cadena respiratoria**

Como se mencionó anteriormente, las ERO se pueden generar de manera exógena o intracelular por diferentes fuentes. Entre los sistemas que contribuyen a la generación de ERO dentro de la célula, están algunas enzimas como las pertenecientes a la familia de las NADPH oxidasas. Sin embargo, se considera que la mayor cantidad de ERO proviene de la mitocondria, resultado de la cadena de transporte electrónico (CTE) o cadena respiratoria, que consiste en un sistema de moléculas que toman átomos de hidrógeno y electrones de los equivalentes reducidos NADH, NADPH y  $FADH_2$ , obtenidos en la glucólisis y en el ciclo de Krebs. La CTE comprende básicamente dos procesos: (1) los electrones son transportados a lo largo de la membrana, de un complejo de proteínas transportador a otro. (2) Los protones son translocados a través de la membrana, o sea son pasados desde el interior o matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal; esto construye un gradiente de protones. Finalmente los electrones y los iones  $H^+$  se combinan con el aceptor terminal de los electrones, el oxígeno, para formar agua, y con el objetivo final de producir, por medio del complejo ATP sintetasa, energía en forma de ATP. Los componentes de la cadena respiratoria son 3 complejos proteicos (uno de ellos, el complejo III, está descrito en la Figura 1, con moléculas transportadoras y sus enzimas correspondientes, un componente no proteico, ubiquinona o coenzima Q (Q), que están embebidos en la membrana; y el citocromo c, que es una proteína periférica que se ubica en el espacio intermembranal pero adosado a la membrana interna.



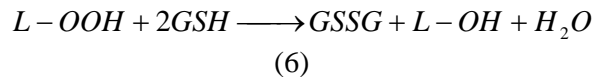
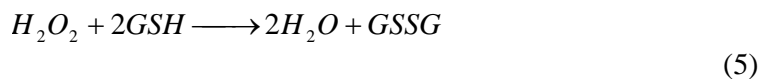
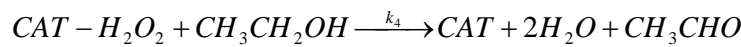
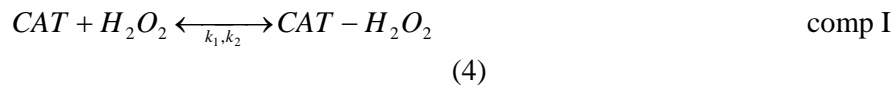
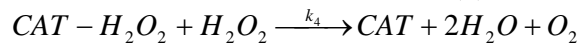
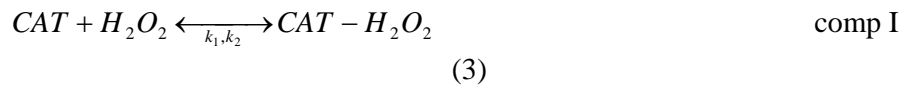
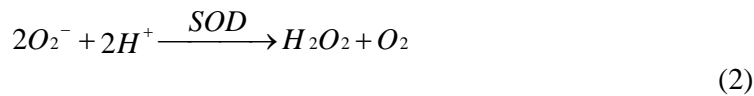
**Figura 1** Producción de ERO en la mitocondria. El complejo III de la cadena respiratoria es la mayor fuente de producción de ERO. Los electrones provenientes de NADH del complejo I (NADH-Q reductasa) y los provenientes de FADH<sub>2</sub> del complejo II se transfieren hasta la Q (quinona); el anillo quinona de la coenzima Q se puede reducir a quinol (ubiquinol) con 2 electrones en el ciclo de Q, donde se forma el intermediario inestable (Q<sup>-</sup>), quien puede formar superóxido al transferir un electrón al oxígeno molecular. El superóxido producido puede ser dismutado por SOD, que genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y éste a su vez es descompuesto a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> por la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (revisión de Finkel *et al*, 2000).

### II.1.2 Proteínas antioxidantes

Las células de mamíferos principalmente, se valen de enzimas que reducen la cantidad de agentes oxidantes formados, y que funcionan como mecanismos de defensa contra la toxicidad del oxígeno. Existen 4 clases diferentes de defensas antioxidantes: (1) Principales: contienen directamente con las ERO; son de naturaleza enzimática, en la que se incluye a la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y otras peroxidases; y las de naturaleza no enzimática, que son antioxidantes exógenos que ingresan al organismo provenientes de los alimentos, como vitamina E, polifenoles de plantas y carotenoides de plantas, y algunos metales que actúan como cofactores de enzimas, entre ellos el Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>. (2) Auxiliares: apoyan la función de las principales, reciclando o sintetizando substratos de enzimas oxidantes, pertenecen a este grupo la glutatión reductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la oxigenasa hemo. (3) Los complejos de proteínas metal-enzima: evitan o disminuyen la participación de Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup> en la generación de radicales libres, entre ellos se encuentra la ferritina, la transferrina, la ceruloplasmina, la metalotioneina y compuestos de bajo peso molecular como el glutatión, el ascorbato, el piruvato, el lactato, los estrógenos, la coenzima Q y la bilirrubina. (4) Los sistemas enzimáticos de reparación: resarcan DNA y proteínas oxidadas (Hermes-Lima, 2004).

A continuación se describen algunos ejemplos de los antioxidantes principales. Las superóxido dismutasas (SODs) son metaloenzimas que catalizan la conversión del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y oxígeno molecular (O<sub>2</sub>), mostrada en la ecuación (2). La catalasa es una enzima que interviene en la

descomposición del  $H_2O_2$  hasta  $H_2O$  y  $O_2$  en su función catalítica (ecuación 3), y en la oxidación del etanol ( $CH_3CH_2OH$ ) a acetaldehído ( $CH_3CHO$ ) en su función peroxidica, como se muestra en la ecuación (4) (Oshino *et al*, 1973; Keilin *et al*, 1945); la enzima está presente en la mayoría de los organismos, incluyendo vertebrados, invertebrados, hongos y bacterias; se han identificado 2 tipos de catalasa en bacterias y uno en plantas y en mamífero; la catalasa de mamífero es una proteína homotetramérica de 240kDa, que contiene un grupo hemo porfirina, que es el responsable de su actividad, y una molécula de NADPH por subunidad; la enzima está localizada principalmente en peroxisomas, pero se han encontrado también en la mitocondria del corazón; esta enzima tiene uno de las velocidades de recambio más altas, ya que una molécula de catalasa convierte 6 millones de moléculas de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  por minuto. Las peroxidases son óxido reductasas del  $H_2O_2$  y de otros hidroperóxidos orgánicos (ecuación 6), y a diferencia de las catalasas utilizan un sustrato que se oxida a cambio de la reducción del peróxido; entre ellas se encuentra la glutatión peroxidasa (GPx), cuyo sustrato oxidado es el tripéptido glutatión ( $\gamma$ -GluCysGly) en su forma reducida (GSH), como se demuestra en la ecuación (5).



Como se mencionó anteriormente, al desbalance entre las especies reactivas y la actividad antioxidante se conoce como estrés oxidativo; es decir, el estrés oxidativo es causado por un aumento en la cantidad de ERO o una disminución en la cantidad de antioxidantes. Se ha observado experimentalmente la importancia de algunas enzimas antioxidantes y las consecuencias del estrés oxidativo. Mutantes en SOD de E.Coli mostraron un alto grado de mutagénesis aeróbica, y el daño oxidativo al DNA persistió por un periodo substancial después de haber eliminado el  $O_2^-$  (Keyer *et al*, 1995). De manera similar, ratones mutantes en MnSOD muestran bajo peso al nacer y mueren algunos días después de haber nacido, además presentan acumulación de lípidos en



hígado y músculo esquelético y pérdida de actividad de enzimas mitocondriales en muchos órganos, (Lebovitz *et al*, 1996; Williams *et al*, 1998; Lynn *et al*, 2005 y Faraci *et al*, 2006); en cambio, los ratones transgénicos con elevada actividad de Mn-SOD son más resistentes a la toxicidad del O<sub>2</sub> que animales silvestres (Hermes-Lima, 2004). Además los mutantes en Cu,ZnSOD no muestran daño aparente, pero presentan problemas de fertilidad, son susceptibles al daño neuronal y desarrollan hepatoma al crecer (Fridovich, 1998), y los transgénicos que sobreexpresan CuZn-SOD son más resistentes a la toxicidad del O<sub>2</sub> que animales silvestres (Hermes-Lima, 2004). Los ratones deficientes en la glutatión peroxidasa se desarrollan normalmente hasta los 15 meses de edad, pero son más sensibles a morir con paraquat (agente químico que genera radicales libres), y presentan peroxidación lipídica 4 veces mayor que los animales silvestres (Judy *et al*, 1998 y Cheng *et al*, 1999).

### **II.1.3 Estrés oxidativo en la longevidad del organismo (Modificación a DNA, proteínas y lípidos por daño celular)**

Las especies tóxicas de oxígeno han sido implicadas en daño a los tejidos, y se ha demostrado que reaccionan dañando al DNA, a lípidos, a carbohidratos o a proteínas, causando severas alteraciones en las membranas y organelos, lo que caracteriza a las células con diferentes patologías, muertas o senescentes (Fridovich *et al*, 1998; Carlsson *et al*, 1995).

Se ha encontrado evidencia que implica la acumulación de daño macromolecular causado por ERO en la etiología de enfermedades relacionadas con la edad del organismo (Beckman *et al*, 1998 y Finkel *et al*, 2000). Esto puede deberse a que la eficiencia de las especies antioxidantes declina con la edad (Sohal *et al*, 1996).

El estrés oxidativo impacta diversos procesos biológicos, que se asocian a padecimientos frecuentes en individuos viejos, desde diabetes y desórdenes neurodegenerativos (Beckman *et al*, 1998; Chong *et al*, 2005). Condiciones patológicas como Parkinson, Alzheimer (Butterfield *et al*, 2001; Smith *et al*, 1991), aterosclerosis, inflamación, carcinogénesis, daño por reperfusión, sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>, entre otros, están asociadas con un incremento en los niveles oxidativos, una disminución de los agentes antioxidantes y/o un aumento en los niveles de macromoléculas modificadas por daño oxidativo.

Por otro lado, se ha visto la relevancia del tratamiento de moléculas antioxidantes en la longevidad de diversos animales. La administración de tocotrienoles a *Caenorhabditis elegans* causó un incremento en la resistencia a estrés oxidativo y en el tiempo de vida media, pero no en el tiempo de vida máxima (Sampayo *et al*, 2003). En otro trabajo se vio que, al administrar extracto de *Ginkgo biloba* EGb 761 a *Caenorhabditis elegans*, se incrementó el tiempo de vida en un 8%, resistencia a EO y a estrés térmico (Sampayo *et al*, 2003); sin embargo, con el compuesto purificado flavonoide tamarixetina se incrementó el tiempo de vida en un 25%. Consistente con esto, recientemente un grupo de científicos reveló que el resveratrol, molécula proveniente de algunos alimentos como en la piel de las uvas, aumenta el tiempo de vida máxima del pez *Nothobranchius furzeri* en un 60%, y también lo protege contra neurodegeneración (Valenzano *et al*, 2006). Estos datos resaltan la relevancia de las defensas antioxidantes en la longevidad del organismo, sin embargo, el tratamiento de dichas moléculas antioxidantes son provenientes principalmente de fuentes externas como la dieta.

La evidencia más relevante en aumentar el tiempo de vida con el aumento de las defensas antioxidantes fue cuando, al tratar a *Caenorhabditis elegans* con moléculas sintéticas que muestran la actividad SOD/cat (Euk-143), se produjo un incremento en el

tiempo de vida máximo de un 40%, y un aumento en la supervivencia en respuesta a paraquat del 11%. Se ha demostrado que el compuesto utilizado no es tóxico para el nemátodo, y no hay efecto en la fertilidad, desarrollo o en la expresión génica de las proteínas de “choque de calor”, y su acción es dependiente de la señalización insulina/IGF-I (Melov, 2000). Estos datos sugieren que las defensas antioxidantes pudieran modular señales en vías de señalización asociadas con la longevidad del organismo.

Es necesario recalcar que el estrés oxidativo no sólo es el resultado de un estado patológico, también está involucrado en condiciones fisiológicas que mantienen la homeostasis celular y del organismo. Por ejemplo, el ejercicio muscular, en la defensa contra bacterias que ingresan al organismo, etc. Es decir, las ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) están involucrados en transducción de señales en condiciones normales y patológicas. Lo que es más, ERO y ERN (Especies Reactivas de Nitrógeno) son relevantes en las vías de transducción de señales en condiciones normales y patológicas; por ejemplo, se ha visto el rol del peróxido de hidrógeno como mensajero en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Schmidt *et al*, 1995).

## **II.2 SENESCENCIA REPLICATIVA**

El fenómeno de la senescencia celular está relacionado con la capacidad de la célula de continuar dividiéndose a través del ciclo celular. Se ha visto que cuando las células, como por ejemplo los fibroblastos de humanos (Hayflic y Moorhead, 1961), son cultivados en un medio apropiado, al principio se dividen rápidamente, después llegan en una etapa donde disminuye la velocidad de proliferación, y finalmente, dejan de replicarse. Por esta razón la senescencia celular es comúnmente denominada senescencia replicativa y es interpretada como envejecimiento celular.

El bloqueo de la replicación de células mitóticas está mediado por inhibidores de kinasa dependientes de ciclina, que lleva a un estado viable de arresto indefinido en el ciclo celular (Kipling *et al*, 2000). Las células senescentes pierden la capacidad de seguir duplicando DNA, aunque permanecen activas metabólicamente.

El estrés oxidativo es capaz de promover la senescencia replicativa. Se observó un tratamiento con dosis moderadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno a un cultivo primario de fibroblastos humanos activa rápidamente la senescencia (Chen *et al*, 1994). El estrés oxidativo puede ser un agente causal de la senescencia, pues se ha encontrado daño oxidativo en células senescentes. Consistente con lo anterior, se ha demostrado en células de fibroblastos de un gran rango de especies mamíferas, que existe una correlación entre el máximo tiempo de vida de una célula y el número de veces de replicación de fibroblastos en cultivo, antes de llegar a la etapa de la senescencia (Rohme, 1981). En este experimento se ha demostrado que las células de mamíferos de vida corta, se dividieron muchas menos veces que aquéllas de vida larga (o más longevas), antes de que llegasen a la etapa de cesamiento del crecimiento celular. Algunas células de ratón en cultivo se escapan de la primera etapa de senescencia replicativa, siguiendo una línea de inmortalidad. Las células humanas no escapan de la senescencia replicativa. Esta diferencia de comportamientos sugiere que existen diferentes causas de senescencia replicativa en diferentes especies (Hornsby *et al*, 2003).

### **II.2.1 Respuestas celulares de la senescencia**

Algunos de los genes que son regulados en respuesta a senescencia pudieran codificar proteínas secretadas que alteren el microambiente del tejido y así alterar la estructura y función del tejido. Los fibroblastos senescentes secretan altos niveles de muchas metaloproteinasas de la matriz, factores de crecimiento epitelial, y citocinas

inflamatorias (Krtolica y Campisi 2002), parecido a la respuesta de fibroblastos a consecuencia de heridas (Grinnell *et al*, 2003), que conlleva a una inflamación local, la cual es frecuente en tejidos envejecidos (Nemoto *et al*, 2004; Campisi, 2005.). El fenotipo senescente también es parecido al de los fibroblastos asociados con algunos carcinomas que facilitan la progresión de cánceres epiteliales (Olumi *et al*, 1999; Park *et al*, 2000).

### **II.2.2 Telómeros y senescencia**

En algunos casos, la senescencia replicativa se ha visto asociada con el acortamiento de los telómeros, como consecuencia de la disminución de la actividad de la telomerasa (Hornsby *et al*, 2002). El desgaste telomérico señala una vía que involucra a los supresores de tumores p53 y p21<sup>waf</sup>, similar a la vía que censa el daño al DNA, dando por resultado el arresto en la transición de la fase G<sub>1</sub>-S (Lane *et al*, 1997; Kaler *et al*, 1986). Sin embargo, hay evidencias en algunas células humanas, como las tiroideas, las epiteliales foliculares, las de los islotes β, las pancreáticas y los astrocitos, de que la prevención del desgaste telomérico no siempre evita la senescencia, pues la expresión ectópica de la telomerasa por sí sola es insuficiente para la inmortalización (Kipling *et al*, 2000). Lo anterior significa que el acortamiento de los telómeros no es un marcador único y determinante de la senescencia replicativa.

### **II.2.3 Supresores de tumores en respuesta a senescencia**

El daño al DNA, como estímulo oncogénico, pudiera inducir la respuesta a senescencia, aunque si es irreparable o afecta la reparación del DNA pudiera inducir la muerte celular. Esto sugiere que la senescencia asegura que las células con telómeros disfuncionales no formen tumores. Las células que no senescen a pesar de tener telómeros disfuncionales, desarrollan aberraciones cromosomales y transformaciones malignas. Además, se ha visto que muchas células senescen cuando sobreexpresan ciertos oncogenes, como los activados en la cascada de señalización RAS-RAF-MEK (Campisi, 2005; Lundberg *et al*, 2000 y Narita *et al*, 2004). También se ha visto que la activación por mutación de RAS estimula la proliferación y transformación celular, no la senescencia (Tuveson *et al*, 2004). Paradójicamente, el efecto de Ras en una célula normal, es bloquear irreversiblemente la división celular; esto ha fortalecido el concepto de que tanto la senescencia como la apoptosis son mecanismos protectores. Interesantemente, tanto en levadura como en células humanas, RAS induce la producción de altos niveles de oxidantes mitocondriales, y en células humanas estos oxidantes son requeridos para inducir senescencia (Hlavata *et al*, 2003).

A pesar de que aún no se saben los mecanismos por los que se desarrolla la senescencia, se ha visto que los diferentes estímulos que inducen senescencia, convergen en 2 vías que son gobernadas por los supresores de tumores p53 y pRB, ambos reguladores transcripcionales (Bringold *et al*, 2000; Lundberg *et al*, 2000 y Beausejour *et al*, 2003 y Campisi, 2005). p53 es un factor que se induce en respuesta a daño al DNA, y se ha visto que la pérdida de función de p53 retarda o anula la senescencia replicativa en células humanas (Itahana *et al*, 2001) y que la inactivación de p53 en al menos algunas células humanas senescentes revierte la senescencia a pesar de tener telómeros cortos (Campisi, 2005 y Beausejour *et al*, 2003). Sin embargo, estudios en cultivos celulares de humano indican que la activación de p16, un inhibidor del ciclo celular y regulador positivo de pRB, evita el retroceso de la senescencia por la inactivación de p53 (Beausejour *et al*, 2003) y se requiere para la senescencia inducida por RAS (Brookes *et al*, 2002 y Benanti *et al*, 2004). Estas dos vías, que disparan senescencia en respuesta a estímulos estresantes, incluyendo RAS y estrés oxidativo,

donde la vía p16/pRB asegura que senescencia sea irreversible y resistente a la disminución de p53.

No obstante que se desconocen los mecanismos precisos de regulación de la senescencia, ésta pudiera ser inducida en respuesta al daño oxidativo al DNA de las células, causado por una disminución en los agentes antioxidantes o en un aumento de la concentración de los radicales libres. Por ejemplo, se ha visto que la senescencia replicativa en células de ratón es debida, principalmente, a la toxicidad del oxígeno (Parrinello *et al*, 2003), siendo más susceptibles las células de ratón que las de humano. Se ha encontrado también que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce senescencia celular mediada por TOR (*Target of rapamycin*); la cascada de TOR se considera una vía de sensado de mitógenos y nutrientes; promueve crecimiento celular, aunque el ciclo celular esté bloqueado, (revisión de Mikhail, 2006).

#### **II.2.4 Papel de la senescencia replicativa en el envejecimiento**

Una pregunta importante es ¿las células senescentes contribuyen al envejecimiento?. Se considera a la β-galactosidasa endógena activa a pH 6 como un marcador de senescencia replicativa (Dimri *et al*, 1995). En células endoteliales neonatales de humano se encontró una mayor cantidad de células positivas para β-galactosidasa en las de pases avanzados (>10) que en cultivos primarios, y mayor en tejido de piel de humano de edad avanzada (>69 años), comparado con tejido de piel de humano joven (<40 años de edad) (Dimri *et al*, 1995). Además se encontró que esta tinción no se asocia con células quiescentes ni con las que están en un estado de diferenciación terminal, donde tampoco hay síntesis del DNA. En otro trabajo (Konigsberg *et al*, 2004) se mostró una mayor cantidad de células positivas para β-galactosidasa de ratón adulto (12 meses de edad) que de ratón joven (2 meses de edad); lo cual significa que posiblemente las células senescentes se acumulan con la edad. Consistente con esto, los resultados combinados del uso de p16, un supresor de tumores, y SA-β-gal (Senescencia asociada a la β-galactosidasa), indican que las células con características de senescencia se acumulan con la edad en múltiples tejidos de humanos y roedores (Campisi *et al*, 2005). Además, estas células senescentes están presentes en tejidos de pacientes con ciertas patologías relacionadas con la edad, incluyendo lesiones ateroscleróticas, úlceras de piel y artritis, así como en lesiones hiperproliferativas preneoplásticas y benignas en próstata e hígado (Krtolica *et al*, 2002). Por tanto, pudiera ser que la acumulación de células senescentes compromete la renovación o reparación del tejido.

Las células senescentes también pudieran contribuir a patologías relacionadas con la edad, estimulando el remodelamiento crónico de tejidos y/o causando inflamación local, lo que comprometería la estructura y función del tejido. Los descubrimientos recientes sugieren que los fibroblastos senescentes afectan la diferenciación funcional y morfológica de células epiteliales, al menos en cultivos de células epiteliales de mamífero (Parrinello *et al*, 2005). En este modelo, los fibroblastos senescentes alteraron la morfogénesis alveolar y redujeron la expresión de la proteína de leche en las células epiteliales normales. Por tanto, las células senescentes pueden, al menos en principio, contribuir a cambios en estructura y función de tejidos, y de esta forma contribuir al envejecimiento.

Finalmente, en humanos se ha visto que las células endoteliales, quienes reparan vasos sanguíneos dañados, declinan al aumentar la edad del organismo (Nemoto *et al*, 2004). Por otra parte, se ha visto que la habilidad de las células progenitoras del músculo esquelético de ratón necesarias para reparar daños, parece declinar marcadamente con la edad (Nemoto *et al*, 2004). Lo anterior sugiere que la senescencia

de las células progenitoras pudiera contribuir al envejecimiento en general del organismo, y por ende a las enfermedades relacionadas con la edad.

### **II.3 MUERTE CELULAR**

El estrés oxidativo se ha visto involucrado en la muerte celular. Cuando la cantidad de daño oxidativo a las células supera la capacidad antioxidante y de reparación, puede provocar muerte celular y, de ser muy abundante, hasta del tejido; por tanto, pudiera tener una importancia en la disminución de la longevidad del organismo. Se ha visto que los fibroblastos derivados del ratón carente de Glutación peroxidasa (Gpx) despliegan características de senescencia y son susceptibles a la muerte celular inducida con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Judy *et al*, 2004)

La muerte celular no sólo representa el destino final de la célula en base a un daño acumulativo irreparable e irreversible, sino también se considera, al igual que la senescencia replicativa, un mecanismo de defensa contra estímulos oncogénicos. Se piensa que el estrés oxidativo induce alteraciones en la expresión de genes, que culminan en, ya sea muerte celular programada, o en el mantenimiento de la célula. (Chong *et al*, 2005; Finkel *et al*, 2000), aunque se desconocen los mecanismos internos por los cuales el estrés oxidativo transmite sus señales al núcleo.

Algunas proteína cinasas regulan respuestas celulares a estrés oxidativo (Finkel *et al*, 2000). Se descubrió que la proteína cinasa Sterile 20 (Ste20) media muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *Sacharomyces cerevisiae* (Ahn, 2005), y se ha visto que las proteína cinasas Sterile-20 de mamífero (MST1 y MST2) y el ortólogo hippo en *Drosophila* inducen muerte celular apoptótica (Cheung *et al*, 2003; Harvey *et al*, 2003). Por otro lado, los factores de transcripción FOXO inducen respuestas apoptóticas o adaptativas bajo exposición a estrés oxidativo en células de mamífero (Brunet *et al*, 2004; Kops *et al*, 2002). Recientemente se encontró que las proteína-cinasas MST1 median la muerte celular inducida por estrés oxidativo activando los factores de transcripción FOXO en neuronas de mamífero (Lehtinen *et al*, 2006), vía por la cual se ha visto que se aumenta la longevidad en *Caenorhabditis elegans*.

Se ha observado que las ERO también causan muerte celular mediante las mismas cascadas de señalización que llevan a senescencia celular, como la vía de señalización que involucran a los supresores de tumores p53 y pRB, causados por estímulos estresantes. Por ejemplo, el daño oxidativo al DNA se pudiera disparar mecanismos de sobrevivencia; pero, si es tan grave este daño, o los mecanismos de defensa se superan, las células deciden iniciar un proceso de muerte celular.

### **II.4 LONGEVIDAD Y ENVEJECIMIENTO**

La longevidad se define como el tiempo de vida máximo de un organismo, mientras que el envejecimiento, es un proceso deletéreo, progresivo e intrínseco, que se caracteriza por la aparición y el aumento de alteraciones en el funcionamiento del organismo que contribuyen progresivamente a incrementar la tasa de mortalidad. Es decir, el proceso de envejecimiento se establece con base en dos características: primero, a que la probabilidad de muerte de cualquier organismo incrementa con su edad; segundo, a que en cualquier organismo existen cambios fenotípicos característicos con el paso del tiempo (Johnson *et al*, 1999).

#### **II.4.1 Envejecimiento prematuro**

Un posible modelo candidato para investigar el envejecimiento de humanos, a simple vista parecen ser los síndromes de progeria o envejecimiento prematuro. Por ejemplo, el síndrome de Werner, es un desorden genético autosomal recesivo

caracterizado por estatura más baja, desarrollo acelerado de aterosclerosis, aparición de canas, de diabetes tipo II, cataratas, osteoporosis y atrofia del timo y calcificación de válvulas cardíacas, entre otras; viven en promedio 47 años. Se sabe que es causado por una variedad de mutaciones de pérdida de función en un gen que codifica para un miembro de la familia helicasa RecQ. Se ha encontrado que la helicasa WRN interactúa con una variedad de proteínas implicadas en replicación del DNA, recombinación y apoptosis. Además el 90% de los cultivos de fibroblastos humanos de estos pacientes tienen un promedio de vida menor a 20 doblajes de población, comparado con 40 a 100 en fibroblastos normales (Kipling *et al*, 2000). Sin embargo, interesantemente la senescencia parece ser tejido- específico, pues las células T no parecen verse afectadas. Aunado a esto, los ratones mutantes *Wrn*<sup>-/-</sup> no muestran los cambios en el fenotipo característicos de un animal viejo (Lebel *et al*, 1998, Lombard *et al* 2000), y las diferencias en senescencia replicativa son muy ligeras, sugiriendo que la inestabilidad genética causada por pérdida de función del gen *Wrn* es insuficiente para provocar envejecimiento prematuro en ratón. Asimismo, el efecto es visible sólo después de haber cruzado ratones *Terc*<sup>-/-</sup> (nulas en telomerasa) con *Wrn*<sup>-/-</sup>, con patologías parecidas a las de humanos WS, y sus fibroblastos muestran entonces senescencia replicativa acelerada y marcadores de senescencia dependientes de telómero (Chang *et al*, 2004), sugiriendo que la pérdida de WRN sólo puede producir el mismo efecto en ratón que en humano si las células de ratón han senescido por disfunción del telómero.

#### **II.4.2 Algunas vías de señalización involucradas en la longevidad**

A pesar de que hasta el momento se desconocen las causas del envejecimiento, se han visto involucradas algunas vías de señalización que alteran la longevidad del organismo de diversas especies. Por ejemplo, en algunas mutaciones donde se afectan la señalización endócrina, respuestas a estrés, función mitocondrial, metabolismo y telomerasa, se incrementa el tiempo de vida de un organismo (revisión de Kenyon, 2005). Muchas de ellas, como las que alteran las señales endócrinas, extienden el tiempo de vida y retrasan enfermedades relacionadas con la edad.

##### **II.4.2.1 Importancia de las vías insulina/IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), resistencia al estrés, sirtuinas y supresores de tumores en la longevidad**

Una de las vías de señalización que pudiera involucrar una función endócrina es la vía de la insulina/IGF-1, que influye en la longevidad del gusano, mosca y mamífero (Tatar *et al*, 2003). Esta cascada está involucrada en el censado nutricional y en la regulación metabólica de un amplio espectro de organismos (Murakami *et al*, 2000). Esta vía primero fue vinculada a longevidad en *Caenorhabditis elegans*, donde se encontró que mutaciones en *daf-2*, un gen que codifica para un ortólogo del receptor insulina/IGF-1, duplicaron el tiempo de vida del animal (Westrich *et al*, 2006). Esta vía insulina/IGF-1 también incluye a AGE-1, (*AGEing alteration family member*, que codifica para la subunidad catalítica p110 de PI3K). Las mutaciones en ambos genes requieren además la actividad de *daf-16*, que codifica para un factor de transcripción de la familia FOXO (Lin *et al*, 1997; Ogg *et al*, 1997), para extender la longevidad. Esto sugiere que en *Caenorhabditis elegans* la longevidad está sujeta a regulación hormonal.

Una característica de las mutaciones en *Age* es la resistencia al estrés oxidativo y a otra variedad de estreses; es más, los mutantes *Age-1* y *Daf-2* muestran elevados niveles de SOD y catalasa en edades medianas y avanzadas (Vanfleteren *et al*, (1993) Las proteínas FOXO se han visto implicada en la resistencia al estrés incrementado en

ratones longevos, como en el ratón que carece de la proteína adaptadora p66shc (Nemoto *et al*, 2002). La resistencia al estrés es una característica general en mutantes de la vía insulina/IGF-1. Conjuntamente, las proteínas FOXO de mamífero activan genes de respuesta a estrés cuando se reducen los niveles de insulina o de IGF-1 (Kops *et al*, 2002; Nemoto *et al*, 2002 y Tran *et al*, 2002). Muchos de estos genes también pudieran influenciar la longevidad en humano.

La importancia de la vía de señalización de la insulina en la extensión del tiempo de vida y resistencia a estrés oxidativo no está restringida al nemátodo. Los mutantes en el receptor de insulina/IGF-1 de *Drosophila* incrementan la longevidad hasta en un 80% (Tatar *et al*, 2001), muy posiblemente dependiente de FOXO, ya que la sobreexpresión de FOXO extiende la longevidad de la mosca (Giannakou *et al*, 2004) y porque los genes conservados con sitios de unión a FOXO influyen en la longevidad de *Drosophila* (Lee y Kennedy, 2003). Asimismo, la deficiencia parcial del receptor IGF-1 en ratón también induce aumento en el tiempo de vida y en la resistencia a estrés oxidativo inducido con paraquat (Holzenberger *et al*, 2003).

Algunos otros genes que se han visto implicados en la longevidad son los miembros de la familia de las enzimas sirtuinas; por ejemplo el gen Sir2, que tiene homólogos variantes desde levadura a humano, cuando se activa aumenta el tiempo de vida en levadura, gusano y mosca (Sauve *et al*, 2006).

Por otra parte, se han visto involucrados en el envejecimiento, genes que forman parte de cascadas de señalización de supresores de tumores. Se sugiere que p53, a pesar de ser un supresor de tumores, contribuye, al menos en parte, al envejecimiento en respuesta a senescencia. Se vio que al aumentar por manipulación genética p53, los ratones fueron más resistentes a cáncer, se aceleró su envejecimiento y sus células fueron más susceptibles a apoptosis (Tyner *et al*, 2002) y a senescencia (Maier *et al*, 2004) mediada por p53. Es decir, el acortar la vida fue el costo por la protección del cáncer.

#### **II.4.3 El estrés oxidativo y la longevidad**

Una de las teorías más aceptadas del envejecimiento es la teoría de los radicales libres, (Harman, 1956), que postula que las reacciones de los radicales libres, generadas dentro del organismo, son responsables de la acumulación progresiva de cambios asociados con el tiempo, o responsables de la aparición enfermedades asociadas con la edad. A pesar de que aún no se conocen los mecanismos y causas del envejecimiento, muerte y senescencia replicativa, existen evidencias significativas para sugerir que la actividad antioxidante está implicada en el proceso de estos fenómenos.

#### **II.4.4 Función mitocondrial implicada en la longevidad**

La producción de radicales superóxido, dentro de la mitocondria, ocurre principalmente en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y en el complejo III (ubiquinona – citocromo c reductasa), como lo indica la figura 1 (revisión de Finkel *et al*, 2000)

Aunado a esta idea, se sugiere que la función mitocondrial está involucrada en determinar la longevidad del organismo. La disfunción mitocondrial se ha visto relacionada con enfermedades neurodegenerativas y con la longevidad (Calabrese *et al*, 2001). Un grupo de científicos encontró un aumento de la longevidad en *Caenorhabditis elegans* jóvenes cuando por manipulaciones genéticas mediante RNA de interferencia (RNAi), se afectaron algunos genes reguladores de la función mitocondrial (Lee *et al*, 2003), específicamente del transporte de electrones (Dillin *et al*, 2002). Así mismo, otro

grupo de científicos vio envejecimiento prematuro en ratones que sobreexpresan DNA polimerasa mitocondrial (Trifunovic *et al*, 2004).

En *Caenorhabditis elegans* se han hecho más análisis de mutantes con funciones mitocondriales alteradas. Algunas muestran un aumento en el tiempo de vida, como las mutantes en *clk-1*, que no puede sintetizar la proteína de la coenzima Q, uno de los componentes de la cadena respiratoria que funciona como transportador de electrones. En cambio las mutantes en *mev-1* (succinato-CoQ oxidoreductasa en la cadena del transporte de electrones), son sensibles a estrés oxidativo y exhiben un envejecimiento acelerado, tienen anomalías estructurales mitocondriales, menor potencial de membrana mitocondrial e incremento en la aceleración de apoptosis durante el desarrollo, lo cual provee mayor apoyo en la teoría de los radicales libres (Senoo-Matsuda *et al*, 2003).

Por tanto, los efectos celulares causados por las ERO representan los candidatos más cercanos para explicar el proceso del envejecimiento de una gran variedad de especies; la idea es que cuando aumenta el metabolismo de la mitocondria, se producen más ERO como subproductos causando efectos adversos en la célula. Aunque la actividad metabólica y la producción de ERO están correlacionadas, esta relación puede ser compleja. Por ejemplo, un grupo de proteínas mitocondriales desacoplantes es activado por superóxido, y también puede inducir un estado metabólico en la célula en donde aumenta el consumo de oxígeno pero disminuyen los niveles en general de ERO (Echtay *et al*, 2002); de manera inversa, la expresión del gen activado RAS en levadura induce bajos consumos de oxígeno pero altos niveles de ERO (Hlavata *et al*, 2003; Nemoto *et al*, 2004)

En resumen, dado que los cambios fenotípicos antes mencionados, asociados con la edad y causados por estrés oxidativo, son una consecuencia del envejecimiento y no una causa, y que la actividad antioxidante juega un papel fundamental como mecanismo de defensa contra el daño al tejido celular; una predicción de la teoría del envejecimiento es que el daño asociado a ERO podría mejorar por intervenciones que aumenten la resistencia a EO y por tanto, disminuya la senescencia replicativa, la muerte celular y el envejecimiento.

## II.5 RESTRICCIÓN CALÓRICA (RC)

Otro de los fenómenos que se ha visto asociado al envejecimiento es la restricción calórica. Se ha propuesto que la RC o dieta hipocalórica, definida como la que permite alcanzar un balance energético negativo, pero que suministra igual cantidad de micronutrientes y cumple los criterios de calidad nutricional exigibles a cualquiera otra dieta, puede aumentar la longevidad en algunos animales. En un principio se vio que si a los ratones se les limitaba la ingesta de alimentos, y de esta forma se les sometía a RC (típicamente, la RC se caracteriza por un nivel de calorías que es 60-70% de lo que los animales comerían *ad libitum*), éstos incrementaban su longevidad (Guarante *et al*, 2005; Masoro, 1984). Después, para alcanzar esta meta, se utilizó este método en un amplio rango de especies, desde levadura (Lin *et al*, 2000) hasta primates (Guarante, 2005).

Aunado a las consecuencias en la longevidad, se han encontrado ciertos efectos benéficos en animales sometidos a la RC. Se ha observado que la RC provoca la disminución de la acumulación del daño a proteínas, lípidos y DNA, causados por estrés oxidativo, todos éstos asociados con la edad. Los animales sometidos a RC parecen ser más resistentes a estresantes externos, incluyendo calor y EO (Sohal *et al*, 1996). Una de las características más sobresalientes de los animales sometidos a RC es que parece que previenen o retardan la aparición de enfermedades (Weindruch *et al*, 1988); por



ejemplo, incrementa la longevidad de algunas cepas de ratón que normalmente mueren de cáncer, también la de los ratones  $p53^{-/-}$  (Hursting *et al*, 2003; Berrigan *et al*, 2002), quienes mueren de cáncer a edades tempranas. Asimismo, la dieta hipocalórica extiende la longevidad en ratas Fischer, que normalmente mueren de enfermedades en el hígado. Lo que es más, los animales sometidos a RC han mostrado una disminución de padecimientos de una variedad de enfermedades, como diabetes y enfermedades cardiovasculares (Lane *et al*, 1999; Stern *et al*, 2001). Además se ha reportado que la RC reduce la pérdida neuronal asociada a la edad en ciertos modelos de ratón con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Mattson, 2003; Duan *et al*, 2003).

### **II.5.1 Algunas sirtuinas implicadas en restricción calórica**

Una pregunta central es si los beneficios de la RC son un resultado pasivo de la ingesta calórica baja o la consecuencia de un programa regulatorio activo que reconoce la escasez de la comida y programa los efectos de salud resultante. De hecho, algunos estudios genéticos y moleculares recientes, en modelos de organismos, sugieren que la RC puede ser un proceso regulado.

Las sirtuinas o SIRS (*Silent Information Regulators*) juegan un papel importante en los mecanismos de óxido-reducción y se han visto involucradas en longevidad por RC. En levadura, muchas observaciones sugieren que la RC está regulada por SIR2 (homólogo de SIRT1 en humano). La principal evidencia es que la RC no incrementa la longevidad cuando se elimina SIR2 (Lin *et al*, 2000 y 2002). Otras evidencias al respecto son, por ejemplo, que las mutaciones de pérdida de la función en SIR2 acortan el tiempo de vida, y que los incrementos en la dosis genética la aumentan (Kaeberlein *et al*, 1999).

SIR2 presenta actividad de deacetilasa de histonas, que depende de los niveles celulares de NAD (Nemoto *et al*, 2004); así que la RC incrementa la actividad de SIR2 mediante el aumento de la proporción de los niveles de NAD. Se encontró que el resveratrol, activador de la enzima Sir2, extiende la longevidad de la levadura y la *Drosophila* en condiciones normales (Howitz *et al*, 2003; Wood *et al*, 2004), pero no la aumenta cuando la levadura y *Drosophila* están sometidas a restricción calórica; sugiriendo que SIR2 y RC están en la misma vía (Rogina *et al*, 2004).

El suero de ratones sometidos a RC le dio resistencia a estrés a cultivos de fibroblastos comparado con el suero de ratones *ad libitum* (Brunet *et al*, 2004). Interesantemente el suero de ratones sometidos a RC disparó mayor nivel de SIRT1 en los fibroblastos, el cual fue parcialmente revertido al agregar IGF-1 e insulina al suero; por tanto, es posible que los cambios endócrinos jueguen un papel importante en la regulación del estrés. La relación SIRT1 y la resistencia al estrés parece ser muy extensa; al igual que SIR2 en levadura, Sirt1 es una desacetilasa dependiente de NAD (Guarante, 2005); pero a diferencia de SIR2, SIRT1 parece señalar muchas proteínas que no son histonas. El primer ejemplo es p53, que mostró ser desacetilado y regulado río abajo por SIRT1 (Luo *et al*, 2001; Vaziri *et al*, 2001); en concordancia, SIRT1 regula negativamente apoptosis dependiente de p53 en respuesta a daño celular. Una segunda familia de proteínas reguladoras por SIRT1 es la de FOXO o familia *Forkhead*, que como p53, puede responder a estrés y desencadenar apoptosis. Se encontró que SIRT1 puede desacetilar y regular foxo1, 3 y 4 y así reprimir apoptosis (Brunet *et al*, 2004; Motta *et al*, 2004); similarmente, SIR-2.1 de *Caenorhabditis elegans* requiere de la proteína *forkhead* daf-16 para incrementar la longevidad (Tissenbaum *et al*, 2001). Además se encontró que SIRT1 desacetila la proteína de reparación de DNA Ku70, permitiendo que el factor proapoptótico Bax se una e inactiva (Brunet *et al*, 2004).

Ku70 es una subunidad de 70KDa del complejo Ku, que tiene un rol importante en la reparación de rompimiento del DNA de doble hebra en el núcleo. Se sugiere que Ku70 suprime apoptosis mediada por Bax, ya que se encontró que Ku70 interactúa en el citosol con la proteína proapoptótica Bax, y evita su translocación mitocondrial (Sawada *et al*, 2003). En resumen, parece que SIRT1 marca numerosos factores celulares, dando por resultado el aumento del umbral para desencadenar la apoptosis.

### **II.5.2 El tejido adiposo en el envejecimiento**

Existen otras evidencias que sugieren que el envejecimiento de mamíferos está regulado en parte por almacenaje de grasa. Un estudio reciente en *Drosophila* mostró que las moscas con grasa corporal reducida viven más que los controles (Giannakou *et al*, 2004). Cuando la comida es abundante, el tejido adiposo blanco (TAB) almacena la grasa como triglicéridos, mientras que cuando la comida es escasa como en la RC, las células se despojan de la grasa y los animales son muy delgados; el TAB también es un tejido endócrino que secreta hormonas como leptina y adiponectina (Kershaw *et al*, 2004). Así que los cambios hormonales pueden influir en la sensibilidad de la insulina de tejidos metabólicos que responden a hormonas. Se sabe que la adiponectina incrementa la sensibilidad de la insulina en tejidos metabólicos (Guarante, 2005) y su disminución puede llevar a la resistencia de insulina, que después exacerbe el aumento de glucosa en la sangre. Este círculo vicioso pudiera ser central en muchos casos de diabetes tipo2. RC antagonizará este ciclo disminuyendo la glucosa en la sangre y la insulina, reduciendo grasa almacenada e incrementando sensibilidad a adiponectina e insulina.

Pudiera ser que SIRT1 regule la respuesta adaptativa en estos tejidos de animales sometidos a RC. Se encontró que SIRT1 se expresa en el TAB, para reprimir un regulador clave de este tejido, el receptor nuclear PPAR $\gamma$  (Picard *et al*, 2004). Adicionalmente, SIRT1 es importante para los cambios en el metabolismo del TAB en ratón. La reducción en el consumo de alimento causa la lipólisis de triglicéridos en el TAB y la liberación de ácidos grasos libres a la sangre, los que son requeridos y oxidados por tejidos metabólicos. El ratón *Sirt1*<sup>+/-</sup> no metaboliza tanta grasa a la sangre como los animales silvestres después de ayunar toda la noche, mostrando un papel de estas sirtuinas en la movilización de la grasa. Interesantemente, el ayuno indujo la unión de *Sirt1* a la región de unión a DNA de PPAR $\gamma$  en los promotores de genes específicos de tejido adiposo, donde podrían ejercer sus efectos represores (Picard *et al*, 2004). Aún no se sabe cómo la reducción en el consumo de comida induce la actividad de SIRT1, pero no parece afectar mucho los niveles de proteína de SIRT1 en el TAB de ratón; esto en comparación con lo que al parecer sucede en las ratas, donde se encontró que RC incrementa los niveles de SIRT1 (Brunet *et al*, 2004). La conexión *Sirt*-PPAR $\gamma$  podría ser importante durante el envejecimiento de tejidos. Por ejemplo, se sabe que PPAR $\gamma$  controla muchos procesos biológicos en las paredes de los vasos, como la proliferación o la diferenciación celular del músculo liso (Guarante, 2005), que pudiera jugar un rol activo en aterosclerosis relacionada con la edad. Además, el envejecimiento está asociado con la incidencia de cáncer y PPAR $\gamma$  se expresa en muchos órganos donde el cáncer es común como el colon, la vejiga, la mama y la próstata.

Si bien la restricción calórica no incrementa la longevidad, estudios epidemiológicos revelan que, al menos, protege contra enfermedades relacionadas con la edad, como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Roberts *et al*, 2005).



### **III. JUSTIFICACIÓN**

El envejecimiento no es un evento programado como antes se creía. Estudios recientes de análisis de microarreglos en mamíferos, los cuales permiten examinar los RNA mensajeros que se expresan, revelaron que los tejidos de jóvenes lucen similares a los de los viejos, de hecho, en análisis comparativos con la edad, en cerebro y músculo esquelético, se mostró que sólo difiere el 1 al 2% de todos los RNA mensajeros en más del doble en sus niveles de expresión, es decir, a nivel celular los organismos viejos son 98% de efectivos que los jóvenes. Ese grupo de genes que difiere con la edad, está agrupado en clases funcionales que regulan respuestas a estrés oxidativo, inflamación y metabolismo en general; sorprendentemente estos cambios en la expresión de genes no ocurrieron cuando los animales fueron sometidos a RC (Cheol-Koo *et al*, 2000;), lo que sugiere que la RC, *per se* no representa un evento para asegurar que es la causa del aumento de la longevidad.

Una de las teorías del envejecimiento mejor aceptada hasta la fecha es la teoría de los radicales libres, propuesta por Harman en 1956, que sugiere que los daños acumulativos a macromoléculas causados por ERO, son tales que causan un déficit en el funcionamiento de la célula, que repercute en el organismo. Aún se desconocen los mecanismos moleculares que están involucrados en el proceso del envejecimiento, sin embargo se han estudiado algunos procesos moleculares implicados en vías de señalización que regulan la función mitocondrial y el metabolismo en general, y que al ser modificadas mediante manipulaciones genéticas, tienen efectos sobre las cantidades de especies reactivas de oxígeno y sobre la longevidad del organismo.

Dada la relevancia que tienen las defensas contra el daño oxidativo, y las evidencias que sugieren que la actividad antioxidante juega un papel importante en el proceso de la senescencia replicativa, la muerte celular y la longevidad del organismo, puede ser valioso e interesante analizar el efecto que tiene la falta de una de los antioxidantes principales, la catalasa, sobre estos fenómenos en el ratón.

### **IV. HIPÓTESIS**

La catalasa es una enzima determinante del estado redox de las células tal que reducción en su actividad puede llevar a daño oxidativo, senescencia replicativa, muerte celular y envejecimiento del organismo.

## **V. OBJETIVO**

Valorar el efecto de la modificación de los niveles de expresión de la catalasa sobre el daño oxidativo en los tejidos; la senescencia, y muerte celular de fibroblastos, y el envejecimiento de ratones modificados genéticamente.

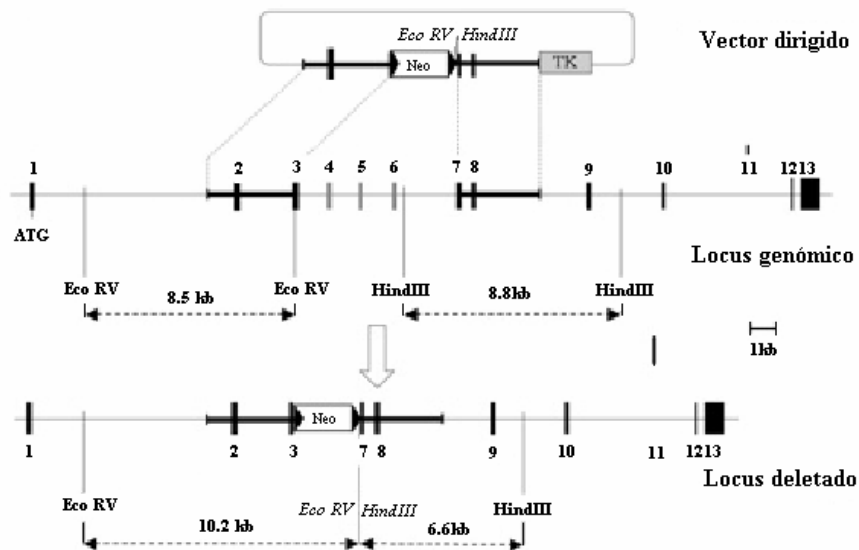
### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Genotipificar los ratones
2. Obtener la población de ratones mutados y silvestres de diferentes edades
3. Determinar el daño oxidativo en diferentes tejidos de ratones con diferentes niveles de catalasa
4. Determinar el envejecimiento celular en los fibroblastos mutantes en catalasa y los silvestres
5. Determinar la susceptibilidad a morir por agentes oxidantes, como paraquat y  $H_2O_2$ , en fibroblastos embrionarios  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$ .
6. Determinar el efecto de la mutación en catalasa, en la longevidad de los ratones, mediante el análisis de supervivencia

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS RATONES MUTANTES DE LA CATALASA

Los ratones mutantes de la catalasa fueron modificados por manipulación genética por David Hernández, en células troncales embrionicas, mediante técnicas convencionales de *gene targeting*, dando por resultado la eliminación de los exones 3 al 7 en el alelo mutado. La Figura 2 muestra el mapa de restricción del locus de la catalasa que fue escindido.

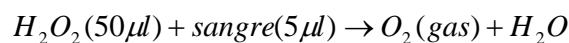


**Figura 2.** Escisión del gen Cas de ratón. Se muestra el vector dirigido (en la parte posterior), el mapa de restricción parcial del locus Cas del ratón (en medio) y el locus deletado (parte inferior). Los números corresponden a cada exón. La región que fue deletada carece de los exones 3 al 7. (Modificada de tesis de doctorado de David Hernández)

Dado que no se encontró diferencia evidente en el fenotipo de los ratones mutantes comparado con el de los silvestres, fue necesaria la determinación de su genotipo mediante dos técnicas: 1) Descomposición de  $H_2O_2$  en la sangre de los animales y 2) PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

#### VI.1.1 Diagnóstico por descomposición de $H_2O_2$ al 30% en sangre

Dado que la catalasa es una enzima que interviene en la descomposición del  $H_2O_2$  hasta  $H_2O$  y  $O_2$ , se realizó un experimento, donde se hace reaccionar  $H_2O_2$  al 30% con la sangre de ratón que, dependiendo de los niveles de catalasa que tenga el ratón, se produce cierta cantidad de  $O_2$  (burbujeo) en el tubo de reacción, como indica la siguiente ecuación:



#### Material y equipo:

- ◆ Tubos *ependorf* de 500 $\mu$ l con graduación cada 50 $\mu$ l a partir de los 100 $\mu$ l

**Reactivos:**

- ◆ Peróxido de hidrógeno al 30%

**Procedimiento:**

1. Cortar aproximadamente 0.5cm de cola del ratón
2. Con una mano, sujetar al ratón de la parte proximal de la cola; con los dedos índice y pulgar de la otra mano, presionar ligeramente la cola del ratón, avanzando en dirección próximo distal para colectar aproximadamente 10µl de sangre.
3. Inmediatamente tomar 5µl de sangre y mezclarla con 50µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en un tubo *ependorf* de 500µl.
4. Tapar inmediatamente el tubo y mantenerlo en posición vertical.
5. Esperar de 1 a 5 minutos y observar el volumen final en el tubo *ependorf* de 500µl graduado.

**VI.1.2 Diagnóstico por Polimerase Chain Reaction (PCR)****Material y equipo:**

- ◆ Tubos *ependorf* de 1.5ml y tubos para PCR de 0.2ml
- ◆ Hielo
- ◆ Pipetas de 10ml
- ◆ Tubos para PCR *ependorf* o *Axygen Scientific PCR strip caps PCR-02CP-C*
- ◆ Guantes
- ◆ Bata
- ◆ Termociclador *Mastercycler gradient ependorf*
- ◆ Termomixer R *ependorf* o baño seco *Felisa*
- ◆ Campana de extracción

**Reactivos:**

- ◆ Proteinasa K *Worthington* cat. 4222
- ◆ Buffer de lisis (*tail buffer*)
- ◆ Tris HCl 100mM a pH 8.0 *Research Organics*
- ◆ KCl 500 mM *Sigma*
- ◆ Tween 20 al 10% (Polyoxyethylene-20-sorbitan monolaurate) *Research Organics* cat. #3061T
- ◆ Buffer *tag polimerase* 10X
- ◆ Mezcla de dNTP's 5mM
- ◆ Enzima amplificasa *Biotecnologías Universitarias*
- ◆ DNA extraído de tejido de ratón
- ◆ H<sub>2</sub>O desionizada y esterilizada

**Soluciones stock (Preparación de las soluciones ver ANEXO 1)**

- ◆ Tris HCl 1M a pH 8
- ◆ KCl 1M
- ◆ Buffer de lisis al 10X
- ◆ Buffer de lisis al 1X

**a) Diseño de oligonucleótidos**

Con base en el mapa de restricción parcial correspondiente a la región del gen de la catalasa que fue escindida para generar los ratones mutantes de la catalasa, que se representa en la figura 2, se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar el producto positivo para el alelo mutado, y otro par de oligonucleótidos para amplificar el producto positivo para el alelo no mutado, cuyos tamaños esperados del producto amplificado de cada alelo se indica en la figura 3.

Las características de cada oligonucleótido son las siguientes

- ♦ Oligos 5' y 3' para el alelo mutado

Oligo 5' (2002-250):

Clave: catko5'

Concentración (ug/ul): 3.69

Secuencia 5'-3': TGT CAT TCT ATT CTG GGG GG

Oligo 3' (2002-251):

Clave: catko3'

Concentración (ug/ul): 1.55

Secuencia 5'-3': GGA CGA CAC TTA TGA AGC AAT C

- ♦ Oligonucleótidos para el alelo no mutado

Oligo 5' (1999):

Clave: KO3-5

Concentración (ug/ul): 1.46

Secuencia 5'-3': TTG TTA CCG CTT TCC TAA ACT CC

Oligo 3' (2000):

Clave: KO3-3

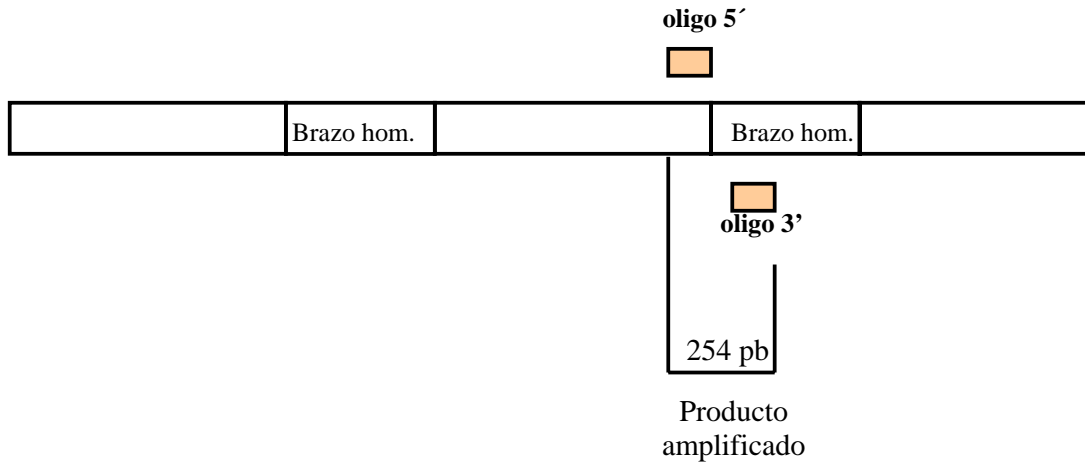
Concentración (ug/ul): 1.50

Secuencia 5'-3': TGA CTT CCT TGG TCA GAT CAA ATG

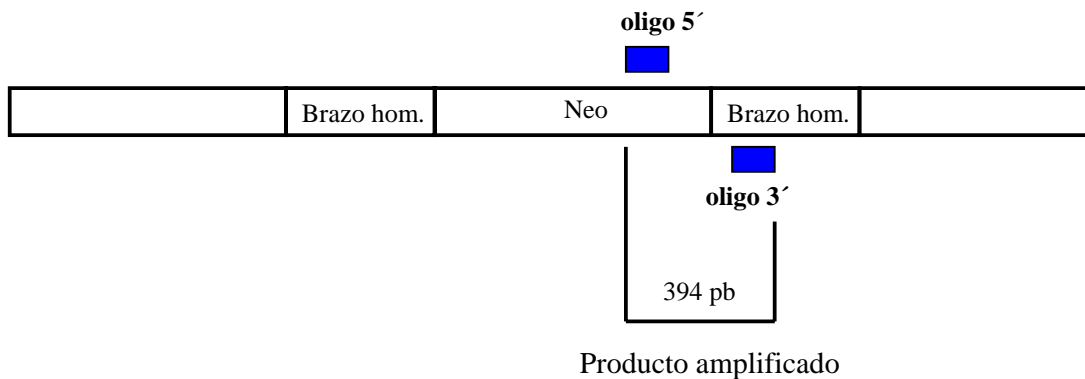
El producto de PCR que amplifica una parte de la región de Neo, identifica el alelo mutado, es decir, el que por recombinación fue sustituido por una región del gen de la catalasa. En cambio, el producto de PCR que amplifica una región fuera del casete de Neo, cuyos oligonucleótidos hibridan en la posición 5' de Neo, identifica el alelo no mutado.

#### A. PCR para detectar el alelo no mutado





B. PCR para detectar el alelo mutado



**Figura 3.** Mapa de restricción parcial del gen Cas del ratón para identificar, por PCR el alelo mutado y no mutado. A. Se representa el producto amplificado que identifica el alelo no mutado. B. Representación de la región que amplifica una parte del caset Neo para identificar el alelo mutado Cas del ratón.

**b) Purificación de oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos recién sintetizados pudieran presentar hibridaciones inespecíficas que causen ruido en la señal del PCR, razón por la cual es necesario purificarlos en un gel de acrilamida, como se explica en el ANEXO 2.

**c) Extracción del DNA geonómico:**

Una vez obtenidos los oligonucleótidos, el siguiente paso es la purificación del DNA geonómico, cuyo procedimiento se enlista a continuación:

1. Colectar el tejido (5mm de cola de ratón aproximadamente) en un tubo eppendorf de 1.5ml, y congelarlo inmediatamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  si no se va a realizar la extracción del DNA en ese momento.
2. Agregar a cada muestra  $500\mu\text{l}$  de buffer de lisis.
3. Incubar a  $95 - 100^{\circ}\text{C}$  por 20 min.
4. Dejar enfriar hasta  $55^{\circ}\text{C}$  (aproximadamente 15 min a temperatura ambiente).
5. Agregar  $25\mu\text{l}$  de proteinasa K a  $20\text{mg/ml}$  y mezclar por inversión para asegurarse de que el buffer impregne todo el tejido.
6. Incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  *over night*.

7. Agitar en vortex durante aproximadamente 5 seg para disgregar el tejido, e incubar a 95 – 100° C durante 5 minutos para inactivar la proteínasa K restante.
8. Centrifugar a >5000 x g por 20 min a 4° C.
9. Recuperar el sobrenadante. Se pueden almacenar las muestras a -20° C por meses.
10. Usar 1µl para cada reacción de PCR (volumen final 20 µl).

**d) Procedimiento y condiciones del PCR:**

Mezcla de reacción:

1µl primer 5' (x ug/ul)  
 1µl primer 3' (x ug/ul)  
 2.5µl dNTP's 5mM (0.5mM concentración final)  
 5µl buffer 10x Tag  
 1µl amplificasa Biotecnologías Universitarias  
 1µl muestra de DNA  
 xµl H<sub>2</sub>O

---

50µl volumen total

**Condiciones del PCR para detección del alelo mutado:**

94° C	3min	desnaturalización inicial
<hr/>		
94° C	} 1min	40 ciclos
56° C		
72° C		
<hr/>		
72° C	7min	elongación final
4° C	α	

**Condiciones del PCR para detección del alelo no mutado:**

94° C	3min	desnaturalización inicial
<hr/>		
94° C	} 1min	35 ciclos
54° C		
72° C		
<hr/>		
72° C	7min	elongación final
4° C	α	

1. Calentar los oligos 5' y 3' a 95° C por 5min y enfriarlos inmediatamente a 4° C en hielo
2. Dentro de la campana de extracción, agregar 14µl de H<sub>2</sub>O destilada, 1µl del primer 5', 1µl del primer 3' y 1µl de la muestra de DNA a un tubo para PCR de 0.2µl
3. Mezclar solución y calentar a 95° C por 5 minutos

4. Enfriar inmediatamente a 4° C colocando los tubos dentro de un recipiente con hielo
5. Agregar 33 µl del resto de la mezcla de reacción (21µl de H<sub>2</sub>O destilada, 5µl de buffer tag al 10X, 5µl de dNTP's y 1µl de la enzima amplificasa) a cada tubo, dentro de la campana de extracción

El método de PCR es un proceso relativamente corto, no requiere extracciones con compuestos orgánicos y es extremadamente sensible, puesto que puede detectar una sola molécula de DNA; lo cual significa una ventaja, siempre y cuando se tenga un extremo cuidado con la manipulación de las muestras, para no tener contaminaciones entre las mismas. Por eso dan las siguientes recomendaciones:

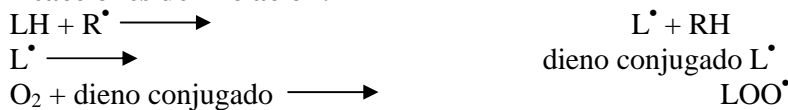
- a) Limpiar perfectamente el área de trabajo
- b) Usar pipetas limpias y secas por la parte interna y externa
- c) Subir y bajar los líquidos lentamente con la pipeta, para evitar que se introduzcan en ella y contaminen otras muestras.
- d) Utilizar de preferencia puntas con algodón
- e) Tomar con cuidado cada muestra, evitando que el líquido caiga en las manos y/o en otras muestras.

## VI.2 DAÑO OXIDATIVO AL TEJIDO DE LOS RATONES

Las ERO modifican principalmente la estructura de las macromoléculas DNA, proteínas y lípidos. La 8-hidroxideoxiguanosina(8-OH d-Gua) es el producto más frecuentemente medido como indicador del daño oxidativo al DNA; el ataque a proteínas por ERO produce principalmente la formación de grupos carbonilo; en cambio en la hidropoxidación, que es una serie de reacciones causadas por el ataque de las ERO a los lípidos, los aldehídos son los productos más relevantes en términos cuantitativos, entre ellos el malondialdehído (MDA).

La lipoperoxidación es una reacción en cadena catalizada por especies oxidantes o metales de transición, que causan el rompimiento de fosfolípidos de membranas que contienen ácidos grasos poli-insaturados. Consta básicamente de 3 fases: (1) Iniciación, donde se da la abstracción de un hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso poli-insaturado (LH), que da lugar a la formación de un radical lipídico (L<sup>•</sup>), que tiende a estabilizarse por resonancia de electrones, dando lugar a los dienos conjugados; dichos dienos conjugados forman radicales peroxil (LOO<sup>•</sup>) al reaccionar con el O<sub>2</sub>. (2) Propagación, donde reaccionan radicales peroxil con grupos metileno de un ácido graso no oxidado para formar radicales lipídicos, los cuales inician una reacción en cadena al contacto con el O<sub>2</sub>. (3) Terminación, es la fase donde la reacción entre especies radicales lipídicas y/o su descomposición causa la producción de diversos compuestos como alcanos, isoprostanos, y aldehídos, que son los más relevantes en términos cuantitativos, como el malodialdehído (MDA). (Hermes-Lima, 2004).

### Reacciones de iniciación:



### Reacciones de propagación:





### Reacciones de terminación:



aldehídos, alcanos,

and isoprostanos

Se tienen evidencias de la acumulación de daño oxidativo a macromoléculas, causado por ERO, en enfermedades relacionadas con la edad; y se ha visto involucrado el daño oxidativo en muchas condiciones patológicas humanas, relacionadas con el envejecimiento, como en enfermedades neurodegenerativas (Beckman & Ames, 1998; Finkel *et al*, 2000; Sampayo *et al*, 2003). Además se tiene evidencia de que las especies antioxidantes declinan con la edad (Sohal *et al*, 1996).

Dado estos y otros antecedentes, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la falta de catalasa sobre el daño oxidativo al tejido de los animales. Para eso se determinaron las cantidades de MDA, dienos conjugados y carbonilos en ratones  $\text{Cas}^{+/+}$ ,  $\text{Cas}^{+/-}$  y  $\text{Cas}^{-/-}$ . Este objetivo se realizó en colaboración con el Dr. Mauricio Díaz y miembros de su laboratorio.

El desarrollo experimental para la determinación del daño oxidativo en tejidos consta de 3 etapas: 1) la homogenización de los tejidos de los diferentes órganos seleccionados, entre ellos: hígado, riñón, pulmón, cerebro y corazón; 2) la cuantificación de la cantidad de proteína/ml, determinada en el homogenado; y 3) determinación de dienos conjugados, MDA o carbonilos. Se utilizaron los mismos tejidos de órganos homogenados para obtención de la etapa 3.

### ETAPA 1: Homogenización de tejidos

Los tejidos homogenados en esta etapa servirán para determinación de dienos conjugados, para el análisis de lípidos peroxidados por método de TBARS y para determinación de carbonilos.

### Material y reactivos:

- ◆ Hielo
- ◆ Tubos de ensayo
- ◆ PBS 1X (para 1L de solución):
  1. Agregar 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.815 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhidro a 1 litro de agua desionizada.
  2. Disolver agitando suavemente y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22  $\mu\text{M}$ .
  3. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 2 meses.

### Desarrollo del proceso de homogenización:

1. Sacrificar los ratones por decapitación, todos a la misma hora del día (alrededor de las 10:00 am).
2. Tomar  $x$  cantidad del tejido del ratón (suficiente para obtener 10mg de proteína por tejido) a un tubo de ensayo y agregar  $y$  vol de PBS1X, para formar una solución al 20% (p/v), como se indica en la tabla 1.
3. Colocar los tubos rotulados en un recipiente con hielo.

4. Homogenizar las muestras de tejido y mantenerlos a 4° C. Utilizar el ultraturrex para homogenizar corazón y pulmón, pues son los tejidos mas fibrosos. Enjuagar el homogenizador con agua desionizada antes de homogenizar otro tejido.
5. Determinar la cantidad de proteína/ml de solución del homogenado.

TEJIDO	CANTIDAD DE TEJIDO (mg)	VOLUMEN DE PBS 1X (ml)
Hígado	1000	5
Riñón	500	2.5
Pulmón	300	1.5
Cerebro	500	2.5
Corazón	200	1

**Tabla1.** Volumen de PBS 1X utilizado para el proceso de homogenización de los tejidos de ratón.

**ETAPA 2: Determinación cuantitativa de proteína por el método de Lowry modificado** (Lowry *et al*, 1951):

El método de Lowry es un método espectrofotométrico de valoración cuantitativa de proteínas. A la disolución de proteínas se le añade un reactivo que forma un complejo coloreado con ellas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer ( $A = \epsilon dc$ ), que expresa que la concentración de una muestra es directamente proporcional a la absorbancia, donde A es la absorbancia,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar, d es la trayectoria de la luz en cm, y c es la concentración molar.

La preparación de las muestras consta de dos etapas:

1. Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas en los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos, formando complejos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína, de un color azul pálido, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo hacia la superficie a los residuos fenolitos de tirosina, que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
2. En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los residuos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

**Material:**

- ◆ Tubos de ensayo (10 ml)
- ◆ Pipetas
- ◆ Colorímetro

- ◆ Cubetas de colorímetro
- ◆ Agitador de tubos (vortex)

### Reactivos:

- ◆ Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, NaOH 0.4%, tartrato sódico-potásico al 0.16%, SDS al 1%
- ◆ Solución B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 4%
- ◆ Solución C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando soluciones A y B (100:1).
- ◆ Solución D: Diluir reactivo de Folin-Ciocalteu 1N en  $\text{H}_2\text{O}$  (1:1)
- ◆ Solución patrón de albúmina de suero bovino (2 mg/ml)
- ◆ Muestra problema (tejidos homogenizados en PBS)

### Procedimiento experimental:

#### a) Realización de la curva de calibrado:

Para poder determinar la concentración de proteínas en la muestra problema se construye una curva patrón o de calibrado, que relacione la concentración de albúmina presente en cada tubo con la Absorbancia determinada en el colorímetro. Para realizar la curva patrón se toman diferentes volúmenes de la solución patrón de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (2 mg/ml) tal y como se detalla en la Tabla 2. El tubo 1, que no contiene proteína y sí los reactivos, sirve de blanco para el ajuste del colorímetro a cero de absorbancia.

No. tubo	$\text{H}_2\text{O}$	BSA (2 mg/ml)	SOLUCION C	SOLUCION D
1	1.00 ml	0.000 ml	3 ml	0.3 ml
2	0.99 ml	0.010 ml	3 ml	0.3 ml
3	0.97 ml	0.030 ml	3 ml	0.3 ml
4	0.94 ml	0.060 ml	3 ml	0.3 ml
5	0.91 ml	0.090 ml	3 ml	0.3 ml
6	0.88 ml	0.120 ml	3 ml	0.3 ml
7	0.85 ml	0.150 ml	3 ml	0.3 ml
8	0.82 ml	0.180 ml	3 ml	0.3 ml
9	0.79 ml	0.210 ml	3 ml	0.3 ml

**Tabla 2.** Curva patrón de proteína para determinar la concentración de proteína de las muestras de los tejidos homogenizados.

Es conveniente procesar simultáneamente los tubos con la disolución problema para determinar igualmente su absorbancia.

### Método:

1. Numerar los tubos de ensaye.
2. Pipetear las cantidades de agua, solución patrón de albúmina y solución problema de proteínas.

Nota: si la muestra está concentrada, hacer una dilución 1:20  
muestra 0.05 ml + 0.95 ml  $\text{H}_2\text{O}$

0.9 ml H<sub>2</sub>O + 0.1 ml de dilución = 0.005 ml

3. Preparar la solución C.
4. Pipetear a todos los tubos el reactivo C.
5. Mezclar el contenido de cada tubo y dejarlo reposar 10 minutos.
6. Adicionar a cada tubo la solución D (reactivo de Folin diluido)
7. Mezclar en vortex y esperar 30min a temperatura ambiente en obscuridad para que se desarrolle completamente la reacción coloreada
8. Leer a 660 nm
9. Determinar la concentración de proteínas en la muestra problema, expresando el resultado en µg/ml (tener en cuenta las diluciones realizadas; en las muestras problema el volumen final fue de 200µl). La concentración de las muestras problema se determina por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. El procedimiento se resume en la tabla 3.

	BLANCO	EXPERIMENTAL
1) Agua desionizada	1 ml	1 ml
2) Muestra (homogenado)		0.005 ml
3) Solución C	3 ml	3 ml
4) Mezclar en vortex y esperar 10 min		
5) Solución D (Reactivo de Folin)	0.3 ml	0.3 ml
6) Mezclar en vortex y esperar 30min a temperatura ambiente en obscuridad		
7) Leer a 660nm		

**Tabla 3.** Procedimiento para realizar el ensayo de cuantificación de la proteína por el método de Lowry.

### ETAPA 3:

#### VI.2.1 Determinación de Dienos Conjugados (DC)

Los dienos conjugados se forman en la primera fase (iniciación) de la cadena de lipoperoxidación. Una vez que las especies oxidantes han abstraído un hidrogeno de la cadena de ácidos grasos poliinsaturados, formando un radical lipídico centrado en carbono, este último tiende a estabilizarse por configuración electrónica para formar un dieno conjugado. Por la fase en la que se pueden formar, no necesariamente tienen que compaginar o seguir el mismo patrón que los datos del MDA.

#### Material:

- ◆ Tubos de ensaye
- ◆ Pipeta pasteur
- ◆ Centrífuga clínica
- ◆ Baño maría con agitación

#### Reactivos:

- ◆ Ciclohexano
- ◆ Reactivo de Folch: Mezcla Cloroformo:Metanol (2:1)
- ◆ Para 100ml:
- ◆ Mezclar 66.7ml de cloroformo y 33.3ml de metanol

#### Procedimiento del protocolo para la determinación de DC:

1. Añadir 1mg de proteína del tejido homogenado y 1ml de agua

2. Agregar 4ml de reactivo de Folch para extraer la fracción lipídica y agitar cada tubo en vortex durante 15 segundos
3. Centrifugar a 3500rpm durante 5 minutos; se forman dos fases. Tomar 1ml de la fracción inferior con una pipeta Pasteur (fase clorofórmica) a otro tubo de ensayo
4. Evaporar en baño maría a sequedad
5. Agregar 1.5ml de ciclohexano y agitar en vortex durante 10 segundos
6. Leer en celdilla de cuarzo a 233nm
7. Usar como blanco 1ml de ciclohexano
8. Expresar los resultados como:

D.O.(abs a 233nm) X mg de proteína

### **VI.2.2 Determinación de lípidos peroxidados mediante el método TBARS**

El MDA es uno de los productos finales de lipoperoxidación de lípidos. Reacciona con ácido tiobarbitúrico a pH ácido y temperaturas elevadas, para formar un compuesto rosa fluorescente que se detecta a 532nm en luz visible.

### **ETAPA 3: Ensayo de TBARS**

#### **Material:**

- ◆ Tubos de ensayo pyrex
- ◆ Canicas del mismo diámetro que los tubos
- ◆ Mechero bunsen
- ◆ Olla o vaporera
- ◆ Centrifuga clínica

#### **Reactivos:**

- ◆ Agua desionizada
- ◆ Ácido tiobarbitúrico 0.8% (se prepara un par de minutos antes de utilizarlo):  
Para 100ml:
  1. Agregar 0.8g de Ácido tiobarbitúrico en 80ml de agua desionizada.
  2. Calentar y mezclar con agitador magnético hasta que se haya disuelto el polvo.
  3. Aforar a 100ml y usar inmediatamente.
- ◆ Cloruro de potasio 1.2% (para 100ml):
  1. Agregar 1.2g de KCl a 80ml de agua desionizada.
  2. Mezclar.
  3. Aforar a 100ml.
- ◆ Ácido acético 20.0% pH 3.5 (para 100ml):
  1. Mezclar 20ml de ácido acético y 60ml de agua desionizada.
  2. Ajustar pH a 3.5 con KOH.
  3. Mezclar.
  4. Aforar a 100ml.
- ◆ Tris HCl 150mM pH 7.4 (para 100ml):
  1. Añadir 1.8g de Tris HCl a 80ml de agua desionizada.
  2. Ajustar pH a 7.4.
  3. Aforar a 100ml.
- ◆ Solución piridina-butanol 1:15 (para 225ml):
  1. Mezclar 14.1ml de piridina y 210.9ml de butanol, en campana de extracción.



2. Usar el mismo día.

### **Desarrollo del protocolo para la determinación de MDA:**

1. Agregar a un tubo de ensaye 3mg de proteína del tejido homogenizado en 1ml de Tris HCl.
2. En el caso de muestras suplementadas con Fe, añadir 100µl de FeSO<sub>4</sub> 50µM.
3. Incubar a 37° C durante 30 minutos.
4. Tomar 0.4ml del incubado y añadir:
  - 1.5ml de ácido acético
  - 1.5ml de ácido tiobarbitúrico
  - 0.5ml de agua desionizada
5. Tapar los tubos con canicas y meterlos en baño maría hasta que el agua alcance 92° C aproximadamente.
6. Calentar a ebullición durante 45 minutos.
7. Enfriar los tubos a chorro de agua
8. Añadir 1ml de KCl. Mezclar en vortex
8. Agregar 5ml de solución piridina-butanol.
9. Mezclar en vortex hasta que el color se integre en la parte superior.
10. Tomar 3.5ml de la fracción superior a 3500rpm durante 5 minutos.
11. Tomar aproximadamente 3ml en una celda de plástico y medir en espectrofotómetro a 532nm de luz visible.
12. Usar como control positivo el mismo método sin proteína de tejido.

Cálculos para determinar niveles de MDA:

$$nmolasMDA = \frac{vol.medido(3ml) \times D.O.}{0.0156(coef.ext.molar) \times mg.proteina(3mg)}$$

### **VI.2.3 Determinación de carbonilos**

Los carbonilos son los productos más relevantes del ataque por radicales libres a proteínas. También son formados por reacción de aldehídos (formados de peroxidación de lípidos y oxidación de azúcares) con proteínas.

La cuantificación de carbonilos se da por derivatización con DNPH (Dinitro Phenil Hidracyne), precipitación ácida y absorbancia a 350-390nm.

#### **Material:**

- ◆ Campana de extracción

**Reactivos:** (Ver preparación de las soluciones en ANEXO 3)

- ◆ Agua desionizada
- ◆ Ácido clorhídrico 2M
- ◆ 2, 4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10mM
- ◆ Ácido tricloroacético al 20%
- ◆ Guanidina 6M con fosfato de potasio 20mM
- ◆ Solución etanol absoluto: acetato de etilo (1:1)

### **Desarrollo del protocolo para la cuantificación de carbonilos:**

1. Agregar 1mg de proteína del tejido homogenado a un tubo *ependorf* de 1.5ml
2. Añadir 0.5ml de Ácido tricloroacético para precipitar la proteína
3. Adicionar 0.5ml de 2,4-Dinitrofenilhidrazina y mantener en reposo durante una hora a temperatura ambiente. Mezclar en vortex cada 10-15 minutos
4. Agregar 0.5ml de ácido tricloroacético al 20%
5. Centrifugar los tubos a 3500rpm durante 3min y tirar el sobrenadante
6. Lavar los pellets 3 veces con 1ml de solución etanol-acetato de etilo para remover el reactivo libre. Mantener en reposo las muestras por 10 minutos entre cada centrifugación y tirar el sobrenadante
7. Resuspender el precipitado de la proteína en 0.6ml de la solución de guanidina. Mantener a 37° C a baño maría y agitación durante 15 minutos
8. Remover cualquier residuo insoluble por centrifugación a 3500rpm durante 3 minutos
9. Leer en el espectrofotómetro a 390nm
10. Usar como control 0.6ml de guanidina
11. Usar coeficiente de extinción molar de grupos carbonilo= 0.022

Cálculo para determinar cantidad de carbonilos:

$$nmolas - de - gpos.carbonilo = \frac{D.O}{0.022(coef.extinc.molar) \times mg.proteina}$$

### VI.3 SENESCENCIA REPLICATIVA EN FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN

Se ha visto que las células de animales viejos senescen más lentamente que las de jóvenes (Dimri *et al* 1995; Konigsberg *et al*, 2004), y también se ha visto mayor daño oxidativo en células envejecidas que en células de pases tempranos (Chen *et al*, 1995). El propósito de este trabajo es averiguar si las células de ratones mutantes, carentes de la catalasa, senescen más rápidamente que las de los silvestres; para lo cual se compararon algunas características de senescencia, como la morfología celular, la tasa de proliferación, y la cantidad de células positivas para  $\beta$ -galactosidasa, de fibroblastos embrionarios provenientes de ratones mutantes y silvestres.

El proceso consta de dos etapas. La primera consiste en la obtención de los fibroblastos de ratones embriones de 14 dpc (días *post coitum*) con los genotipos Cas<sup>+/+</sup>, Cas<sup>+/-</sup> y Cas<sup>-/-</sup>. Una vez generado el cultivo primario de cada línea, las células se congelan hasta obtener juntas las 3 líneas celulares. La segunda etapa consiste en el envejecimiento de las células, mediante el pase de una determinada cantidad de células a un nuevo plato de cultivo, cada vez que una de las líneas celulares llegue a subconfluencia, en ese momento se realiza el subcultivo de las 3 líneas celulares. Para calcular la tasa de proliferación se cuantifican las células sembradas, las obtenidas y el tiempo en cada pase. El proceso del subcultivo termina una vez que las células dejan de replicarse.

Los embriones Cas<sup>+/+</sup> se obtuvieron a partir de una cruce entre dos ratones Cas<sup>+/+</sup>; los embriones Cas<sup>+/-</sup> provienen de una cruce entre un Cas<sup>+/+</sup> y un Cas<sup>-/-</sup>; y las crías Cas<sup>-/-</sup> son producto de una cruce entre dos animales Cas<sup>-/-</sup>.

#### VI.3.1 Cultivo y subcultivo de fibroblastos embrionarios de ratón ETAPA 1: Cultivo primario de fibroblastos.

**Material y equipo estéril para la disección:**

- a) Para sacrificar y disectar hembra preñada:
- ◆ Mesa de trabajo dentro del laboratorio
  - ◆ 1 tijeras grandes
  - ◆ 2 pinzas medianas
- b) Para disectar embriones
- ◆ Campana de flujo laminar, dentro del cuarto de cultivo
  - ◆ 2 pinzas finas
  - ◆ 1 tijeras grandes
  - ◆ 1 tijeras pequeñas
  - ◆ 1 soporte para navaja
  - ◆ 1 navaja
  - ◆ Gasas estériles
  - ◆ Tubos falcon de 50 ml y de 15 ml

**Reactivos:** (Ver preparación de las soluciones en el ANEXO 4)

- ◆ Agua de calidad para uso en cultivo:  
El agua se purifica por medio de un sistema de poro milli Q con intercambio iónico, y posteriormente se esteriliza a través de autoclave.
- ◆ Gelatina al 0.1% (opcional)
- ◆ Dulbecco's Modified Tagle Médium (DMEM Gibco 12100-046)
- ◆ Suero Fetal Bovino (SFB Gibco 16000-044)
- ◆ Piruvato de sodio 100X (Gibco 11360-070) 100mM
- ◆ Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco 11140-050) 10mM
- ◆ Glutamax-1 100X (Gibco 35050-061)
- ◆  $\beta$ -mercaptoetanol 1000X 55mM ( $\beta$ -MeOH Gibco 21985-023)
- ◆ Verseno (Gibco15040-066)
- ◆ Solución EDTA 0.02% en PBS 1X
- ◆ Tripsina 2.5% 10X (Gibco 15090-046)
- ◆ Phosphate – Buffered Saline (PBS 1X)
  
- ◆ DMEM suplementado con nutrientes y antibiótico  
Para 100ml de solución agregar:
  1. 10 ml de SFB (final 10%).
  2. 100  $\mu$ l de piruvato de sodio 100X (final 0.1X).
  3. 1 ml de glutamina 100X (final 1X).
  4. 182  $\mu$ l de  $\beta$ -MeOH.
  5. Xml de Gentamicine Penicilina Streptomycine(GPS) (final 0.25%).
  6. Aforar la solución a 100m con DMEM.
  7. Esterilizar por filtración con membrana 0.22 $\mu$ m.
  8. Almacenar a 4° C hasta por dos semanas.
  
- ◆ Medio de Congelación 2X  
Para 10 ml:
  1. 3 ml de DMEM (final 60%).
  2. 1 ml de DMSO grado cultivo (**SIGMA D2650**) (final 20%).
  3. 1 ml de SBF (final 20%).

**Desarrollo del protocolo:**

**a) Preparación del material**

1. Equilibrar las soluciones a 37° C y a 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 minutos.
2. Lavar el material de disección con agua y un cepillo de cerdas suaves.
3. Sumergirlas en etanol absoluto durante 20 minutos aproximadamente.
4. Secarlos a temperatura ambiente sobre una gasa estéril

**b) Disección de embriones**

1. Utilizar embriones de 12 a 14dpc.
2. Sacar el útero de la hembra preñada, usando guantes, colocarlo en una caja petri de 100mm X 20mm de diámetro con PBS y enjuagarlo dos veces.
3. En precultivo, y con microscopio estereoscópico si es necesario, extraer los embriones del útero y colocarlos en un plato de cultivo celular de 60mm X 15mm con una solución de GPS al 0.25% en PBS 1X.
4. Dentro de la campana de flujo laminar, extraer los embriones del saco vitelíneo y colocarlos en un plato de cultivo celular de 60mm X 15mm.
5. Dentro de la campana de flujo laminar, con guantes y navaja estéril, obtener, en un plato de cultivo celular de 60mm X 15mm, la parte dorsal de los embriones, desde la parte media inferior de la cabeza hasta la parte posterior del embrión; eliminando cerebro (parte superior de la cabeza), extremidades y órganos internos.
6. Pasar el contenido a un tubo de 10ml o a una caja de 60mm de diámetro con DMEM sin suero o con PBS.
7. Cortarlos con una navaja hasta obtener una pasta.
8. Pasar la pasta a un tubo y agregar 10ml de tripsina 0.15% en EDTA.
9. Nota: La solución de tripsina debe estar a 37° C antes de agregarla a tejido o a células.
10. Llevar el tubo (tubo A) a 37° C durante 10 minutos, agitándolo ligera y esporádicamente.
11. Tomar 5ml de sobrenadante y agregarlo a un tubo de 50ml (tubo B); con el objetivo de inactivar la tripsina, adicionarle 5ml de DMEM + SFB al 10%.
12. Adicionar 5ml de tripsina 0.15% al tubo A, durante 10 minutos a 37° C, mezclando la solución leve y esporádicamente.
13. Repetir unas 5 veces pasos 9 y 10.
14. Filtrar el tubo B con gasa.
15. Tomar una muestra de 12 µl (homogenizada previamente con la pipeta), y mezclarla con 12 µl de azul de tripano (GIBCO 15250-061) en un tubo eppendorf de 500µl. Contar células en la **cámara de Neubauer** de la siguiente manera:
  - i. Lavar la cámara y cubreobjetos con chorro de agua y a continuación con etanol al 70%.
  - ii. Ya secos, colocarlos en el microscopio, de tal manera que el cubreobjetos cubra la superficie plateada de la cámara.
  - iii. Mezclar la solución subiéndola y bajándola varias veces con la pipeta.
  - iv. Colocar 10µl en cada cavidad de la cámara, de manera que por capilaridad, se distribuya la solución hacia el interior de la cámara, cubriendo toda la zona cuadrícula de la cámara.
  - v. Contar las células en cada cuadrante alrededor de la cuadrícula central (delimitados por 5 líneas paralelas), utilizando el objetivo 10X, y realizar un

promedio entre los 8 cuadrantes (correspondientes a las 2 cavidades de la cámara).

- vi. Para obtener el número de células totales en la suspensión inicial, debemos multiplicar la cantidad promedio de células por un factor de 20,000 (tenemos 10  $\mu$ l de suspensión celular y 10  $\mu$ l de azul de tripano) por el volumen de la suspensión celular (en ml).
16. Centrifugar la suspensión celular a 1000rpm durante 5 minutos a 4° (opcional).
17. Aspirar el sobrenadante y resuspender el pelet en el volumen necesario de DMEM suplementado, para sembrar una cantidad determinada de células en un plato de cultivo de 10 cm de diámetro.
18. Cambiar el medio de cultivo cada tercer día hasta que las células lleguen a subconfluencia (que haya todavía un poco de huecos entre las células).

### **ETAPA 2: Congelación y descongelación de células:**

Dado que generalmente no es posible obtener el cultivo primario de fibroblastos de los diferentes genotipos al mismo tiempo, ya sea porque las diferentes hembras no son preñadas el mismo día, y por tanto la etapa *post coitum* se desfasa de una camada con respecto a la otra, es necesario congelar el cultivo primario de fibroblastos al tercer día de que se han sembrado las células, es decir, una vez que se han adaptado y reproducido en el medio de cultivo.

Con el fin de investigar el efecto de la modificación de la cantidad de la catalasa sobre la senescencia celular, reflejado como la velocidad de proliferación celular, los fibroblastos de los 3 niveles de la catalasa se descongelan y se subcultivan al mismo tiempo.

El protocolo del procedimiento de congelación y descongelación de células se detalla en el ANEXO 4.

### **ETAPA 3: Subcultivo de fibroblastos.**

1. Aspirar el medio DMEM suplementado.
2. Lavar 2 veces con PBS 1X.
3. Agregar 0.5ml de tripsina al 0.25%, cubriendo toda la superficie del plato. Dar un pequeño golpecito a la caja y moverla ligeramente.
4. Incubar a 37° C durante 5 minutos.
5. Agregar 4.5ml de DMEM suplementado.
6. Mezclar y tomar una alícuota de 12 $\mu$ l para contar las células en **cámara de Neubauer**.
7. Centrifugar la suspensión celular a 1000rpm durante 5 minutos.
8. Aspirar el sobrenadante, cuidando de no llevar el pelet.
9. Resuspender en 2ml con DMEM suplementado.
10. Tomar una alícuota de 12 $\mu$ l para contar las células.
11. Sembrar 1X10<sup>6</sup> células en una caja de 10cm de diámetro o 150,000 o 100,000 células en una caja de 6cm de diámetro.
12. Cambiar el medio de cultivo cada tercer día hasta que una de las líneas celulares llegue a subconfluencia.
13. Subcultivar las células hasta que las células dejen de dividirse en el proceso del ciclo celular, indicando, por definición de senescencia, que las células han envejecido.
14. Para determinar el doblaje de población (DP), realizar el siguiente cálculo:

$$D.P = \frac{\log[\#cels.colectadas / (\#cels.plateadas * Efic.pegado)]}{\log 2}$$

$$Efic.pegado = \frac{\#células pegadas después de 10 hrs de haberlas sembrado}{\#células sembradas} \times 100$$

### VI.3.2 Tinción de células para detectar actividad de $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ gal)

Se sabe que los cultivos de células tomadas de organismos viejos, y los envejecidos *in vitro*, se caracterizan por presentar un número significativamente mayor de células que expresan  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 (Dimri *et al*, 1995). Por dicha razón, la detección de  $\beta$ -gal en estas condiciones, es uno de los marcadores de senescencia.

Por otro lado, se ha visto involucrado el daño oxidativo en el proceso de senescencia celular. Por ejemplo, existen evidencias de que las células humanas senescentes contienen niveles mayores de 8-oxo-2'-deoxiguanosina, como marcador de daño oxidativo al DNA, que las células jóvenes de pases tempranos (Chen *et al*, 1995); además se encontró que el daño oxidativo a las células senescentes puede ser causado por ERO, puesto que se encontró que los fibroblastos humanos expuestos a dosis subletales de  $H_2O_2$  (100 a 200  $\mu$ M) senescen antes que las controles (Dimri *et al*, 1995); y con tratamientos prolongados con dosis bajas de  $H_2O_2$ , muestran un aumento de células positivas para  $\beta$ -galactosidasa, el arresto irreversible del ciclo celular en la fase G1, y el incremento en la expresión de proteínas relacionadas al daño y reparación del DNA, como p53 y p21 (Duan *et al*, 2005). Todas estas evidencias sugieren que la senescencia celular pudiera ser causada por un aumento en las ERO, como el  $H_2O_2$ , o por una disminución de enzimas antioxidantes como la catalasa.

Nuestro objetivo es determinar si las células de los ratones mutantes, por la ausencia de la catalasa, tienen más células positivas para  $\beta$ -galactosidasa, como marcador de senescencia, que las células de los ratones silvestres.

**Material y reactivos:** (Ver preparación de soluciones en ANEXO 5)

- ◆ Agua desionizada por el sistema milliQ
- ◆ Phosphate – Buffered Saline (PBS 1X)
- ◆ Solución fijadora formaldehído 2%/0.2% glutaraldehído ó Paraformaldehido (PFA) (Sigma P6148-500G) al 4%.

#### **Soluciones stock para la solución de tinción:**

- ◆ N,N-Dimetilformamida (DMF)  $C_3H_7NO$  (RESEARCH ORGANICS INC. 2147D)
- ◆ 5-bromo-4-cloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside (X-gal) 20 mg/ml (RESEARCH ORGANICS INC. 1178B)
- ◆ Ácido cítrico monohidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) 0.1M (J. T. BAKER 011020O)
- ◆ Solución de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $Na_2HPO_4$ ) 0.2M (SIGMA S-0876)
- ◆ Solución ácido cítrico/ buffer de fosfato de sodio 0.2M a pH 6
- ◆ Ferrocianuro de potasio 100mM  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  (J.T. BAKER 3114-01)
- ◆ Cloruro de sodio 5M NaCl (J.T. BAKER 3624-01)
- ◆ Cloruro de magnesio 1M (RESEARCH ORGANICS INC. 0090M)

#### ◆ **Solución de tinción**

Para 20ml de solución:

1. Mezclar 1ml de solución de X-gal a 20mg/ml (final 1mg/ml), 4ml de solución ácido cítrico/ buffer de fosfato de sodio 0.2M a pH 6, 1ml de ferrocianuro de potasio 100mM (final 5mM), 0.6ml de cloruro de sodio 5M (final 150mM), 0.04ml de cloruro de magnesio 1M (final 2mM) y 13.36ml de agua desionizada.
2. Utilizar la solución el mismo día de su preparación.

**Procedimiento para fijar y teñir las células:**

1. Lavar las células 2 veces con PBS1X 12 horas después de haberlas subcultivado (100,000 células en un plato de cultivo de 60mm).
2. Fijar las células por 3-5 minutos a temperatura ambiente, con 1-2ml (hasta cubrir la superficie del plato) de 2% formaldehído/0.2% glutaraldehído (o 0.3% glutaraldehído).
3. Lavar las células con PBS 1X.
4. Agregarles solución de tinción (1-2ml por 35mm de plato, o hasta cubrir la superficie).
5. Incubarlas a 37° C (en incubadora sin CO<sub>2</sub>).
6. Contar células teñidas en azul (en algunas células es evidente a 2-4hrs, y máxima a 12-16hrs).
7. Usar como células control las incubadas en solución de tinción sin X-gal.

**VI.4 SUSCEPTIBILIDAD DE CÉLULAS A MORIR CON H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

1. Sembrar 100,000 células en cada pozo de una caja con 12 pozos (4 pozos por genotipo).
2. A las 12 horas de sembradas, tratarlas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0, 5mM, 2mM y 1mM cada caja con fibroblastos embrionarios de ratón Cas<sup>+/+</sup>, Cas<sup>+/-</sup> y Cas<sup>-/-</sup>.
3. Evaluar la cantidad de células vivas y muertas a las 12 hrs de tratamiento.

**VI.5 DETERMINACIÓN DE CURVA DE SUPERVIVENCIA POR EL MÉTODO DE KAPLAN – MEIER**

El método de Kaplan-Meier es una de las pruebas no paramétricas (discreta o actuarial), utilizada en la metodología estadística básica, para el análisis de datos para estudios de supervivencia. Calcula la supervivencia cada vez que un evento ocurre (llámese evento al momento en que muere un paciente en un hospital, o un ratón en este caso). Este procedimiento da proporciones exactas de supervivencia debido a que utiliza tiempos de supervivencia precisos (no aproximaciones como otros métodos).

La característica distintiva del análisis con éste método, conocido también como el “límite del producto”, es que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada paciente (en este caso ratón) y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos.

a) **Procedimiento manual:**

Hacer una tabla con las siguientes características:

1. Enlistar los ratones con su edad respectiva, en orden ascendente en la edad
2. En otra columna, se coloca el no. 1 en aquéllos que han fallecido por muerte natural (observación no censurada) y un 0 en los que siguen vivos o han sido sacrificados, estén perdidos, o se desconozca su paradero (observación censurada)
3. Numerar las observaciones en la tercera columna
4. En la cuarta columna, colocar el número de orden (rango) en las observaciones no censuradas

5. En la quinta columna, calcular la proporción de ratones que sobrevive a cada intervalo:

$$\frac{n-r}{n-r+1}, \text{ donde } n \text{ es tamaño de la muestra y } r \text{ es el rango no censurado.}$$

Esta columna calcula la probabilidad de supervivencia para cada tiempo.

6. Calcular, en la séptima columna, el estimador de la proporción acumulativa que sobrevive. Se realiza multiplicando los valores de la columna anterior (de los dos ratones anteriores).

De este modo, la probabilidad de vivir un cierto periodo de tiempo (hasta el instante  $t$ ) desde el principio del estudio, es el producto de la probabilidad acumulada de sobrevivir hasta el periodo del tiempo anterior a  $t$ ,  $(t-1)$ , multiplicado por la probabilidad de sobrevivir durante el intervalo  $(t-1; t)$ .

La probabilidad de supervivencia se grafica utilizando el tiempo en el eje  $x$  y la probabilidad de supervivencia en el eje  $y$ .

**b) Procedimiento en paquete de software**

Los cálculos de supervivencia se pueden obtener mediante el software de Sigma Plot 7.0

## **VI.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó ANOVA para averiguar el nivel de significancia de los datos de 3 grupos, y se utilizó  $t$  de student para evaluar el nivel de significancia entre dos grupos de datos, utilizando el software Sigma Plot 7.0





## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VII.1 DIAGNÓSTICO DEL GENOTIPO DE LOS RATONES

#### VII.1.1 Diagnóstico por descomposición del peróxido en sangre

Dado que los ratones mutantes de la catalasa aparentemente no presentaron diferencias en el fenotipo, que los distinga de los ratones silvestres, todos los animales se identificaron mediante la determinación de su genotipo por la técnica de la reacción del  $H_2O_2$  en su sangre y mediante PCR.

Se diagnosticaron aproximadamente 485 ratones en total, la mayor parte de ellos por el método de la descomposición del  $H_2O_2$  en la sangre; y ocasionalmente o como medida de corroboración, se diagnosticaron por el método de PCR (aproximadamente 100 ratones).

En la tabla 4 y en la figura 4 se muestra un ejemplo de la reacción que se genera al mezclar el  $H_2O_2$  y la sangre de un ratón  $Cas^{-/-}$ , uno  $Cas^{+/-}$  y uno  $Cas^{+/+}$ . Como se observa en la figura 4, la reacción del  $H_2O_2$  en la sangre del ratón, genera un determinado volumen de burbujas, cuya cantidad depende del genotipo del ratón, que se interpreta como la cantidad de  $H_2O_2$  descompuesto por la catalasa. A mayor cantidad de alelos mutados, menor producción de  $H_2O_2$  descompuesto, observado como cantidad de volumen de gas formado (posiblemente  $O_2$ ).

La velocidad de reacción de descomposición del  $H_2O_2$  fue reproducible y varió según el número de alelos mutados, como se muestra en la figura 5. En el caso de la reacción con sangre de ratón  $Cas^{-/-}$  y  $Cas^{+/-}$  el volumen permanece constante de 3 a 10 minutos, en cambio con la sangre de ratón  $Cas^{+/+}$ , la generación del gas se detiene generalmente hasta los 7 minutos. Esto sugiere que la velocidad de la descomposición del  $H_2O_2$  depende de la cantidad de la catalasa. Sin embargo, se ha comprobado también que la actividad de la catalasa depende de la concentración del  $H_2O_2$  (Ho *et al* 2004).

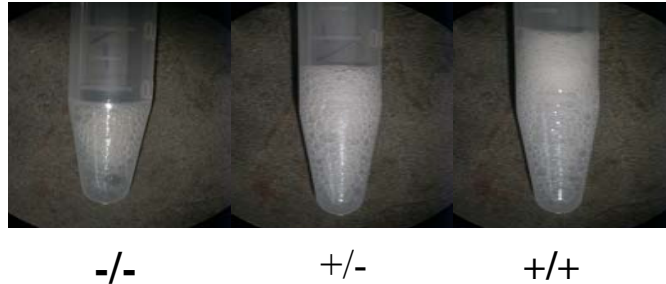
Se observó que, una vez agregado el  $H_2O_2$ , la sangre de los ratones  $Cas^{-/-}$  se oscurece más que la sangre de los  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{+/+}$ . Sin embargo, aun en la sangre de los ratones  $Cas^{-/-}$  se forman aproximadamente 50  $\mu$ l de gas burbujeante; lo cual sugiere que posiblemente otra sustancia esté ejerciendo o causando la producción de  $O_2$  a partir de la descomposición del  $H_2O_2$  en la sangre.

El método anterior de detección del genotipo, por ser más barato, más rápido que el PCR e igualmente reproducible, fue considerado el rutinario para la genotipificación de los animales; el PCR fue realizado sólo esporádicamente como medida de corroboración del genotipo y del primer método. Además, el genotipo de las crías provenientes de progenitores diagnosticados por PCR y por el ensayo de la descomposición del  $H_2O_2$ , resultó el esperado según el principio mendeliano (figura 7), evidenciando la confiabilidad de estos métodos.

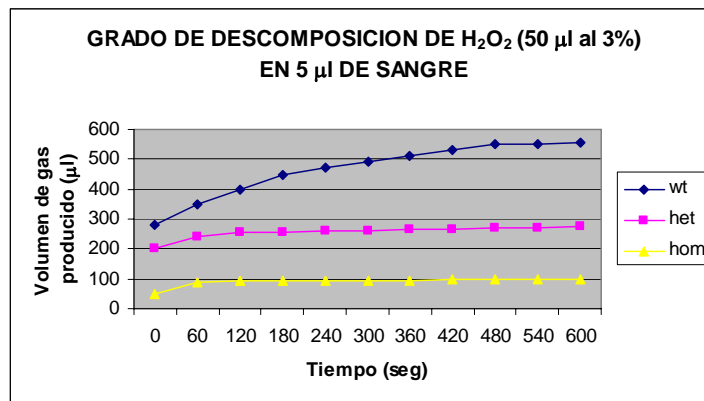
Volumen formado 5 min después de la reacción 50 $\mu$ l $H_2O_2$ + 5 $\mu$ l de sangre	GENOTIPO
--	----------

4 semanas de edad	1mes – 2años de edad	
100 $\mu$ l	100-120 $\mu$ l	HOMÓCIGOTO
200 $\mu$ l	200-300 $\mu$ l	HETERÓCIGOTO
300 $\mu$ l	300-550 $\mu$ l	SILVESTRE

**Tabla 4.** Descomposición de  $H_2O_2$  en sangre de ratones mutantes.



**Figura 4.** Volumen aumentado en la reacción de descomposición del  $H_2O_2$  en sangre de ratones mutantes, descrita también en la tabla 4. Se muestra que la descomposición de la sangre es correspondiente a la actividad de la catalasa. Los símbolos  $-/-$ ,  $+/-$  y  $+/+$ , corresponden a ratones  $Cas^{-/-}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{+/+}$ , que fueron diagnosticados previamente por la técnica de PCR. El volumen final después de la incorporación del  $H_2O_2$  en la sangre, se observa en los tubos *eppendorf* de 500  $\mu$ l con graduaciones cada 50 $\mu$ l.

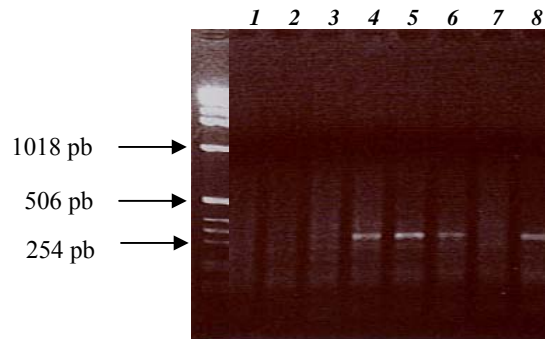


**Figura 5.** Grado de descomposición del  $H_2O_2$  en sangre de ratones mutantes. Se determinó el consumo del  $H_2O_2$  al 30% en la sangre de los ratones  $Cas^{+/+}$  (arriba),  $Cas^{+/-}$  (en medio) y  $Cas^{-/-}$  (abajo). Desde el momento en que se agregó el  $H_2O_2$  en la sangre (tiempo 0), el nivel de descomposición fue proporcional a la actividad de la catalasa.

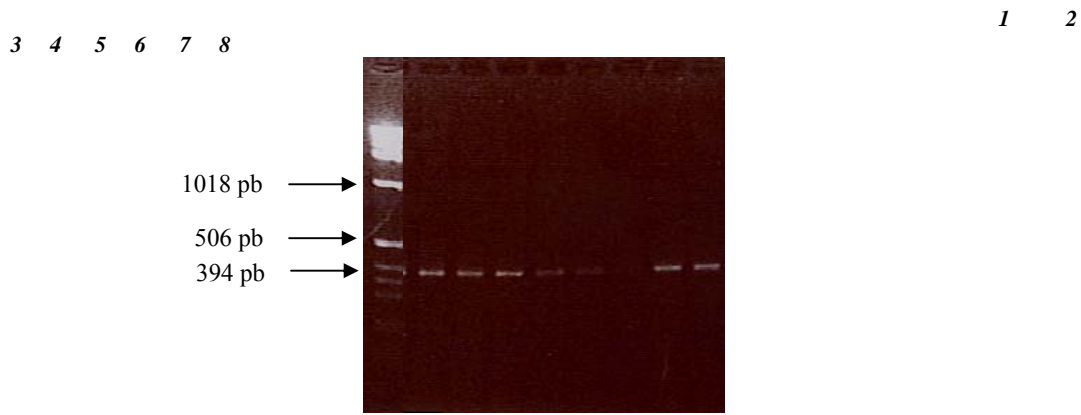
### VI.1.2 Diagnóstico del genotipo por PCR

En la figura 6 se muestra un ejemplo del diagnóstico del genotipo de 8 ratones, mediante la técnica de PCR. El producto amplificado esperado positivo para el alelo no mutado es de 254 pb, y el positivo para el alelo mutado es de 394 pb.

A. PCR para el alelo no mutado



B. PCR para el alelo mutado



**Figura 6.** Diagnóstico, por PCR, del genotipo de algunos ratones mutantes para la catalasa (numerados del 1 al 8).

(A) Muestra bandas positivas, de 254 pb de longitud, para detectar el alelo no mutado del gen de la catalasa, en gel de agarosa al 2%.

(B) Las bandas de 394pb amplifican una parte del caset Neo, que fue sustituida por una región del gen de la catalasa, para detectar el alelo mutado.

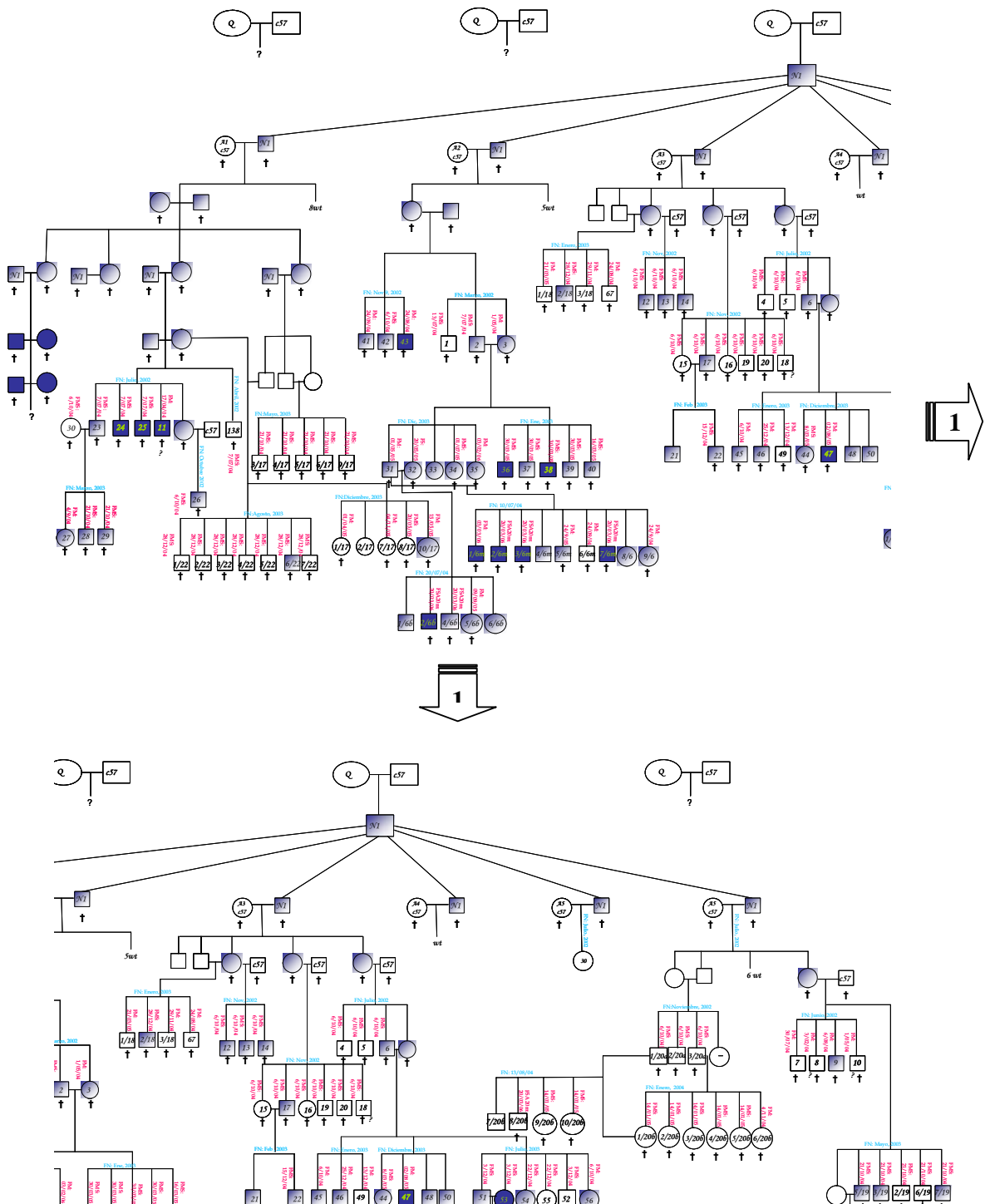
El genotipo de los animales con el número 1, 2, 3 y 7 es  $Cas^{-/-}$  (homocigoto para el alelo mutado), puesto que son positivos para el alelo mutado y negativos para el alelo no mutado; el genotipo  $Cas^{+/-}$  (heterocigoto para el alelo mutado) corresponden a los ratones identificados con los números 4, 5 y 8, ya que fueron positivos para el alelo mutado y positivos para el alelo no mutado; y el ratón número 6 resultó ser  $Cas^{+/+}$  (silvestre), puesto que fue positivo negativo para el alelo mutado y positivo para el alelo no mutado.

La población de ratones mutantes se obtuvo a partir de la quimera cruzada con 6 machos silvestres C57/BL6 (tesis de doctorado de David Hernández), cuyas crías fueron cruzadas entre ellas, con el fin de obtener los 3 genotipos diferentes.

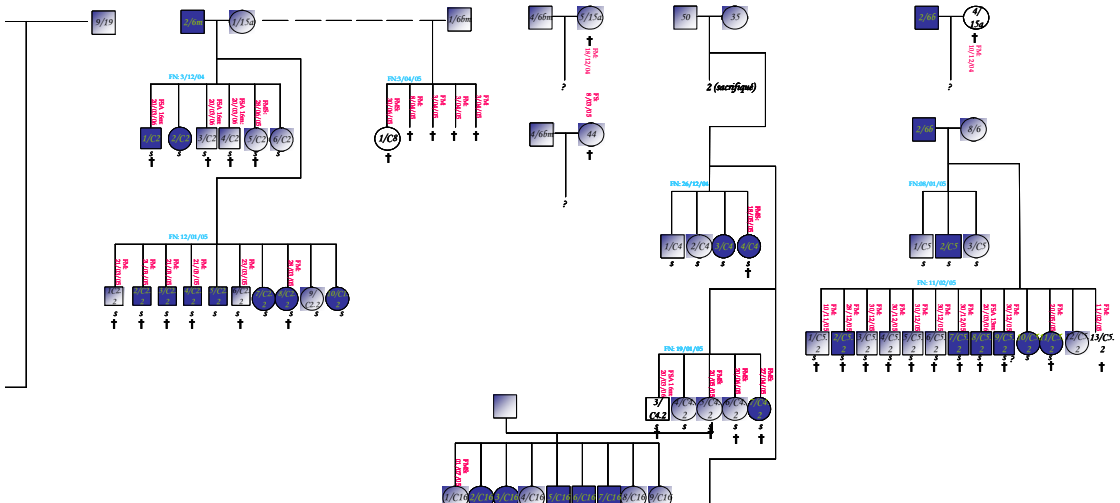
Posteriormente, para tener una población mejor controlada en cuanto al número de crías por genotipo, se manipularon las siguientes cruces: homocigoto con homocigoto para conseguir crías homocigotos para el alelo mutado; homocigoto con silvestre, para

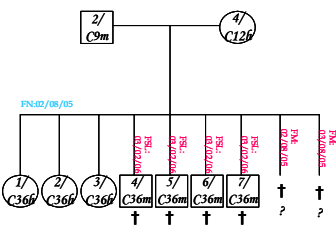
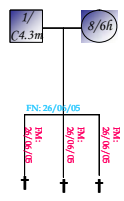
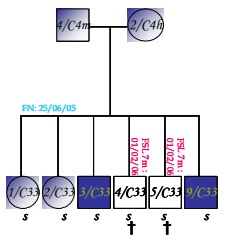
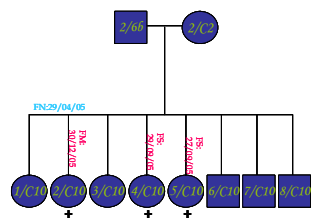
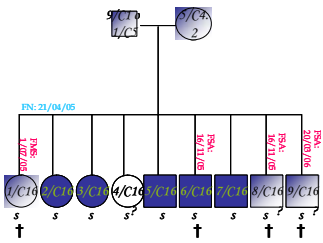
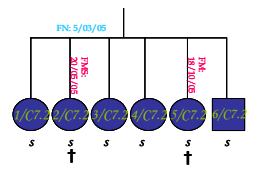
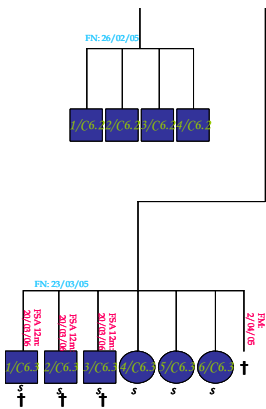
producir crías heterocigotos para el alelo mutado; y silvestre con silvestre para generar crías silvestres.

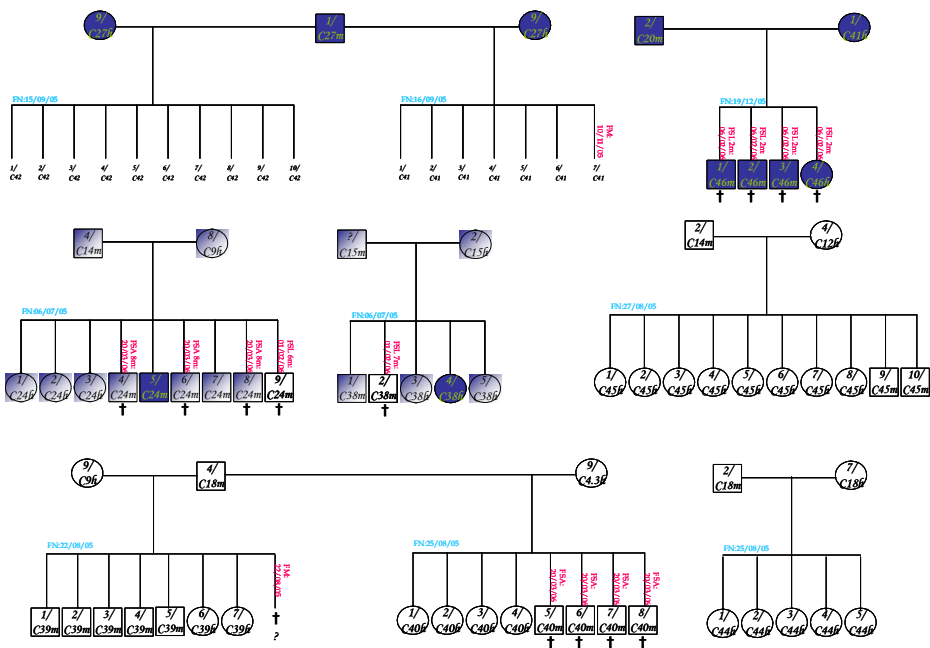
En la figura 7 se muestra el mapa genealógico de la población completa de ratones generados a partir de la quimera (Q). Las hembras se representan por un círculo y los machos por un cuadrado. Las figuras geométricas sin relleno representan los ratones  $Cas^{+/+}$ , los cuadrados y círculos con la mitad del área coloreada en azul representan los ratones  $Cas^{+/-}$  y las figuras cuya área está rellena completamente de color azul, muestra a los ratones  $Cas^{-/-}$ . Cada individuo está identificado por caracteres que se encuentran dentro del círculo o cuadrado. Los caracteres azules fuera de las figuras geométricas indican la fecha de nacimiento (FN), y los rojos representan la fecha de muerte natural (FM) o por sacrificio (FS); la cruz es signo de que el animal murió.



2









**Figura 7.** Mapa genealógico de la población de ratones  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$  diagnosticados por PCR y por el ensayo de descomposición de  $H_2O_2$  en sangre. Los cuadros representan a los machos, y los círculos a las hembras. Se indica la fecha de nacimiento en letra azul; y la fecha de muerte se representa con una † y letras en color rojo. Los ratones que perecieron por muerte natural se identifican por FM (fecha de muerte), y los que fueron sacrificados mediante dislocación cervical se reconocen por FS (fecha de sacrificio). El genotipo de las crías cumplió el principio mendeliano.

### VII.1.3 Características fenotípicas de los ratones mutantes

Todos los ratones fueron alimentados diariamente, mantenidos a temperatura de 18-20° C, 40-50% de humedad, 12h de luz artificial y 12h en oscuridad, simulando el día y la noche.

No hubo diferencia en el fenotipo de los ratones mutantes (machos y hembras) que los distinguiera de los silvestres. No pareció haber diferencia en la forma de caminar, reproducirse, y tampoco se les encontró, en general, anomalías en la morfología de sus órganos internos.

En la figura 8 se muestra los pesos corporales de animales de ambos sexos de 3, 8 y 10 meses de edad. En general, el peso de los ratones machos de los tres genotipos va en aumento de los 3 a los 10 meses de edad; en cambio el de las hembras aumenta de 3 a 8 meses, y se mantiene a los 10 meses de edad.

No se encontraron diferencias significativas en el peso de los ratones mutantes con respecto al de los silvestres del mismo sexo de 3, 8 y 10 meses de edad. Sin embargo, las hembras pesan menos que los machos de 3, 8 y 10 meses, en mutantes y silvestres. Estas diferencias pudieran deberse o ser características del tipo de cepa de los ratones.

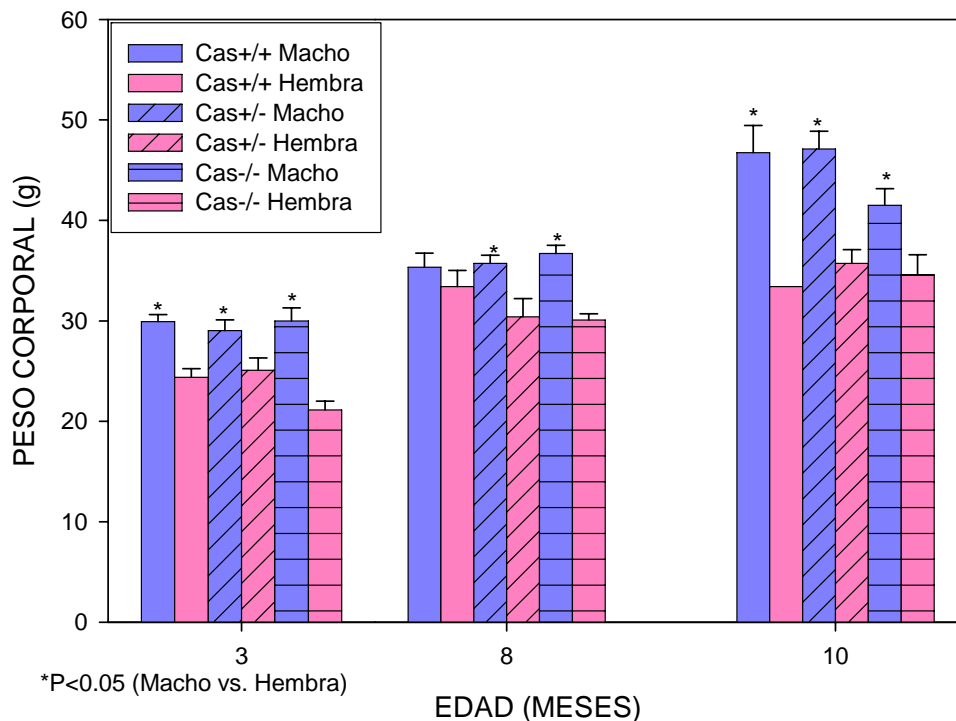
En general, el peso de los ratones silvestres aumenta desde los 6 meses de edad llegando a un máximo aproximadamente a los 10 meses de edad, y disminuye muy ligeramente con la edad hasta que mueren. Con respecto a los mutantes, el comportamiento es similar, salvo que algunos ratones viejos (aproximadamente a los 20 meses de edad) pesan ligeramente menos que los silvestres. (Ver ANEXO 6).

Cabe señalar que en la gráfica 8 sólo se encuentran los datos de grupos con  $n > 4$ ; sin embargo, en la población se han detectado algunas tendencias y casos relevantes con respecto a este fenotipo, como los siguientes:

(1) Se han encontrado algunos ratones mutantes machos adultos jóvenes con sobrepeso; por ejemplo, una camada  $Cas^{-/-}$ , proveniente de una cruce entre 2 animales  $Cas^{-/-}$ , parecía obesa desde los 6 meses de edad; y a los 14 meses de edad uno de ellos ya pesaba 89g contra 35 g  $\pm$  5 del promedio de los machos  $Cas^{-/-}$  de la misma edad; sin embargo a los 14 meses de edad, el resto de la camada ya no estaba obesa y su peso era similar al promedio de los pesos de la misma edad. Otros casos de sobrepeso, aunque menos drásticos, se observaron en 2 ratones machos  $Cas^{+/-}$  (uno a los 9 y otro a los 13 meses de edad). Pese a que el número de acontecimientos no es representativo de la población, no está de más mantener a los ratones en continua observación. Es recomendable dar continuidad a la determinación de los pesos corporales de cada individuo; y si es preciso, desde que nacen hasta que mueren, dado que pudiera acentuarse este u otros fenómenos relevantes en los ratones mutantes con el paso de las generaciones, ya que en el caso de los ratones doble mutantes  $terc^{-/-} wrn^{-/-}$ , observaron el efecto de la mutación hasta la cuarta generación (los mutantes envejecieron antes que los silvestres) (Chang *et al.*, 2004).

(2) En algunos casos los ratones machos *Cas*<sup>+/+</sup> parecen ligeramente más obesos que los *Cas*<sup>+/-</sup> y *Cas*<sup>-/-</sup> en edades muy avanzadas, aproximadamente a los 20 meses de edad. Esto sugiere la posibilidad de que si bien la ausencia de la catalasa no parece afectar el peso corporal de los ratones en edades tempranas ni adultas, posiblemente existan efectos compensatorios, como agentes o moléculas con propiedades antioxidantes que modulen señales involucradas en vías que afectan cambios en el peso corporal de los animales mutantes jóvenes y adultos. También pudiera ser que la catalasa no sea relevante en señales que regulen el peso corporal de los animales en edades tempranas y adultas; pero en cambio en organismos viejos sí participe en señales involucradas en cambios en el peso corporal. Sería interesante evaluar los cambios bioquímicos y moleculares de los ratones mutantes y silvestres en edades avanzadas, como por ejemplo, los niveles de expresión de genes y moléculas con propiedades antioxidantes. Pudiera ser que por la ausencia de la catalasa, en ratones viejos se alteren señales involucradas en la captura de la glucosa, ya que se sabe que, por ejemplo, la vía insulina/IGF está involucrada en el censado nutricional y en la regulación metabólica de un amplio espectro de organismos obesidad, además los mutantes *daf-2*, un miembro de la cascada insulina/IGF, muestran niveles elevados de SOD y catalasa en edades tempranas y finales de *Caenorhabditis elegans*. Sería interesante analizar los cambios moleculares de esta vía, controlando la cantidad de ingesta de alimento de los animales, o someténdolos a RC. .

(3) En general, las hembras tienen menor peso corporal que los machos, en los 3 genotipos. En principio, existe una diferencia en los cambios hormonales, como los estrógenos de las hembras con respecto a los machos, tal que pudiera ser una de las causas de la diferencia de pesos entre machos y hembras.



**Figura 8.** Peso corporal de algunos ratones mutantes y silvestres. Se muestran los pesos corporales de algunos ratones machos (barras azules) y hembras (barras rosas)  $Cas^{+/+}$  (sin relleno),  $Cas^{+/-}$  (barras con líneas diagonales) y  $Cas^{-/-}$  (barras con líneas horizontales) de 3, 8 y 10 meses de edad. En el eje  $y$  se grafican los pesos (en gramos), y en el eje  $x$  las edades. El nivel de significancia fue calculado por el método de *t de student* para comparar 2 grupos de  $n > 4$ . Cada barra representa el promedio de 4 animales  $\pm$  error estándar.

## VII.2 DAÑO OXIDATIVO AL TEJIDO

Se sabe que el DNA, lípidos y proteínas son moléculas susceptibles al daño oxidativo causado por radicales libres. Se ha observado un aumento del daño oxidativo a DNA, lípidos y proteínas de tejidos de individuos viejos y con enfermedades relacionadas con la edad con respecto al de jóvenes (Finkel *et al*, 2000), y que la eficiencia de las defensas antioxidantes declina con la edad (Sohal *et al*, 1996).

Con base en estos antecedentes, nuestro objetivo fue averiguar si el tejido de los ratones mutantes son más susceptibles al daño oxidativo causado por la falta de la catalasa que el de los silvestres. Para este fin se evaluaron las cantidades de lípidos y proteínas modificadas por ERO (en colaboración con el Dr. Mauricio Díaz y miembros de su laboratorio).

Debido a que existen diferencias significativas en el ciclo estral de las hembras con respecto al de los machos, tal que pudiera causar un sesgo en los resultados, sólo se tomaron tejidos de ratones machos en el estudio del daño oxidativo.

Dado que se han observado cambios en la actividad de algunas enzimas antioxidantes con respecto al ciclo circadiano (Rüdiger *et al*, 2003), todos fueron sacrificados alrededor de las 10:00 am, para evitar aumentar variables en los experimentos.

Los tejidos analizados, seleccionados por su relativa facilidad para extraerlos y por su actividad metabólica alta, fueron: hígado, riñón, pulmón, cerebro y corazón. Se homogenizaron en aproximadamente 4 volúmenes de PBS 1X con respecto al peso del tejido.

Se utilizaron 4 ratones para cada edad (2, 6, 8 y 10 meses de edad) y para cada genotipo (homocigoto, heterocigoto y silvestre para el alelo mutado). En el caso de los ratones heterocigotos para el alelo mutado, en el momento del análisis, conseguimos animales de 8 y 10 meses de edad.

Cabe mencionar que, debido a que no se disponía de ratones silvestres de 2 meses de edad, se utilizaron ratones de la cepa 129 donados de otro laboratorio; es decir, los silvestres de 2 meses de edad, utilizados en este experimento, no pertenecían a la misma población de ratones mutantes híbridos (cepa C57/BL6 con cepa 129).

En primera instancia, se esperaba un efecto relevante de la mutación de la catalasa sobre el daño oxidativo a los tejidos. A mayor número de alelos mutados, mayor daño oxidativo de los tejidos.

A continuación se analizan los resultados de daño oxidativo en los tejidos de los ratones mutantes, esquematizados en las figuras 9, 10 y 11.

### VII.2.1 Nivel de dienos conjugados (modificación a lípidos)

Los dienos conjugados (DC) son un índice de la lipoperoxidación *in vivo*, y por la fase en la que se forman dentro de la cadena de lipoperoxidación, indican el nivel de las reacciones pro-oxidantes al momento de procesar el tejido.

Los DC del tejido de los animales fueron cuantificados en el espectrofotómetro a 233nm, después de la extracción lipídica con solventes orgánicos.

Se esperaba que los tejidos de los ratones homocigotos para el alelo mutado tuvieran mayores niveles de dienos conjugados que en los de los heterocigotos, y estos últimos mayor que de los silvestres; sin embargo, no fue así.

En las figuras 9A-E se indican los niveles de DC hígado de (A) riñón (B), pulmón (C), cerebro (D) y corazón (E), de ratones Cas<sup>+/+</sup>, Cas<sup>-/-</sup> de 2, 6, 8 y 10 meses de edad y de ratones Cas<sup>+/-</sup> de 8 y 10 meses de edad.

### **Tejidos de ratones silvestres (Cas<sup>+/+</sup>)**

Los datos del experimento indican que los ratones Cas<sup>+/+</sup> presentan diferencias entre los tejidos. En todas las edades el hígado es el que muestra los niveles más altos de DC, sin embargo el resto de los tejidos varía según la edad del organismo. A los 2 meses de edad al hígado le sigue cerebro, riñón y corazón y finalmente pulmón; a los 6 meses de edad le sigue riñón, luego cerebro y corazón y al final pulmón; a los 8 meses le siguen corazón, luego riñón, enseguida pulmón y al final cerebro; a los 10 meses le sigue riñón y al final pulmón, cerebro y corazón. Esto sugiere la posibilidad de que las reacciones pro-oxidantes son cambiantes y varían según el tejido y edad del animal, y que la actividad de la catalasa se modifica también en función del tejido y la edad del organismo.

Este resultado sugiere que las diferencias en los niveles de DC en los tejidos pudieran deberse a las diferencias en los niveles de expresión y actividad de la catalasa en los diferentes tejidos. Dicha suposición está fundamentada en los datos observados al medir la actividad de la catalasa en algunos tejidos de estos ratones de esta población, ya que se encontraron diferencias en los niveles de actividad de la catalasa en diferentes tejidos (medidos por David Hernández, datos no mostrados); resultado que es consistente con los datos observados en el trabajo del grupo de Ho *et al* (2004), quienes mostraron diferencias en los niveles de expresión de la catalasa según el tejido del ratón.

Sin embargo, los tejidos con mayor actividad de la catalasa tuvieron mayores niveles de DC, y viceversa, los tejidos con niveles más bajos de expresión de la catalasa tuvieron niveles menores de DC. Lo anterior sugiere que los niveles altos de la actividad de la catalasa en un tejido pudieran deberse a niveles altos de reacciones pro-oxidantes; por ejemplo, se sabe que en el hígado, que tiene los niveles más altos de actividad de catalasa se oxidan altas cantidades de ácidos grasos dentro de los peroxisomas, organelo donde se encuentra la catalasa en células eucariotes.

Al comparar los niveles de DC entre las edades, se observa que siempre son mayores a los 6 y 8 meses en todos los tejidos. Es claro que hay un patrón ontogénico que todos los tejidos siguen y que es de tipo gaussiano, es decir, los DC comienzan bajos (2 meses), se elevan de manera importante a los 6 y 8 meses, y a los 10 meses bajan otra vez su nivel. Esto pudiera indicar que, en los tejidos de los animales machos silvestres entre 6 y 8 meses de edad se generan altos niveles de reacciones pro-oxidantes, que tuvieran que ver con un decaimiento en el ciclo reproductivo de los animales.

### **Tejidos de ratones Cas<sup>+/-</sup> y comparación con los silvestres (Cas<sup>+/+</sup>)**

Los niveles de DC se mantienen constantes a los 8 y 10 meses de edad en todos los tejidos, excepto en el hígado, donde se observan niveles mayores a los 10 meses que a los 8 meses de edad. Estos resultados sugieren que es suficiente solo un alelo de la catalasa para contender con las reacciones peroxidativas.

Los niveles de DC de tejidos Cas<sup>+/-</sup> son mayores que los de los Cas<sup>+/+</sup> de 8 y 10 meses de edad, con la excepción del hígado y cerebro, donde a los 10 meses de edad los

niveles de DC son similares en tejidos  $Cas^{+/-}$  que en tejidos  $Cas^{+/+}$ . Lo anterior pudiera indicar que a los 8 y 10 meses de edad, hay más reacciones peroxidativas en el riñón, pulmón y corazón de los ratones  $Cas^{+/-}$  que en ratones  $Cas^{+/+}$ , por la disminución de la actividad de la catalasa.

### **Tejidos de ratones nulos ( $Cas^{-/-}$ ) y comparación con los silvestres ( $Cas^{+/+}$ )**

En general, pero con excepciones, los ratones  $Cas^{-/-}$  presentan dos efectos relevantes: el comportamiento gaussiano de los  $Cas^{+/+}$  se aminora en los  $Cas^{-/-}$ , tanto en intensidad como en duración.

Lo anterior quiere decir: 1) que en la mayor parte de los tejidos, los nulos de la catalasa llegan a presentar niveles menores de DC que los  $Cas^{+/+}$ , y 2) que el pico de DC es más breve que en los  $Cas^{+/+}$ , usualmente los valores bajan a los 8 meses y no hasta los 10.

### **Diferencias en los niveles de DC entre los tejidos de silvestres en comparación con el de los mutantes**

Hay algunas diferencias de los niveles de DC entre los tejidos. En hígado, los niveles de DC de los silvestres son mayores que el de los mutantes a los 2, 6 y 8 meses de edad; y son similares a los 10 meses. En riñón a los 2 y 6 meses de edad, los DC de los animales silvestres son similares que los en los nulos de la catalasa; y a los 10 meses son mayores que en los mutantes. En pulmón, los niveles de DC en los silvestres son mayores a los 8 meses que en los mutantes; y similares a los 2, 6 y 10 meses. En cerebro a los 6 y 8 meses, los DC son mayores en los  $Cas^{+/+}$  que en los  $Cas^{-/-}$ , pero a los 10 meses el efecto se revierte, ya que es mayor en  $Cas^{-/-}$  que en los  $Cas^{+/+}$  y los  $Cas^{+/-}$ . Este resultado sugiere que a esta edad los  $Cas^{-/-}$  no compensen la pérdida de la catalasa en el cerebro, que es uno de los tejidos con mayores cantidades de lípidos y menores niveles de expresión de la catalasa. En corazón a los 2 meses, la cantidad DC es menor en  $Cas^{+/+}$  que en  $Cas^{-/-}$  (con el recordatorio de que los  $Cas^{+/+}$  de 2 meses pertenecen a diferente cepa); a los 6 y 8 meses son mayores en los silvestres que en los mutantes; y a los 10 meses los DC son similares en los  $Cas^{-/-}$  y en los  $Cas^{+/+}$ , pero menores en los  $Cas^{+/-}$ .

Los datos anteriores sugieren que los  $Cas^{-/-}$  compensan la pérdida de la enzima con un ajuste anti-oxidante, que permite un control más efectivo de las reacciones peroxidativas, y que pudiera estar “disparado” por el umbral de la cantidad de  $H_2O_2$  formado, resultado compatible con los datos de Ho *et al*, 2004; donde demuestran que la actividad de la catalasa está limitada por la concentración del  $H_2O_2$ .

La ausencia de catalasa influye también en las variaciones ontogénicas de la presencia de DC, ya que hace más breve el pico de reacciones prooxidantes (solo a los 6 meses, y no a los 8 meses).

Hay algunas excepciones en algunos tejidos: En hígado y cerebro los niveles son menores que los  $Cas^{+/+}$  a partir de los 2 meses de edad, pero ya no hay diferencia a los 10 meses. En riñón y pulmón a los 8 meses son menores que en los  $Cas^{+/+}$ . En cerebro a los 10 meses los niveles de DC en  $Cas^{-/-}$  superan a los  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{+/+}$  (pudiera ser que ya no hubo compensación). En corazón también a los 6 y 8 meses pudiera haber compensación pero ya no a los 10 meses.

La excepción del comportamiento anterior son los DC aumentados en cerebro a los 10 meses y en corazón a los 2 meses. Con la observación de que los ratones  $Cas^{+/+}$  de 2 meses pertenecen a una cepa diferente al resto de la población analizada.

Un análisis integrativo de los datos anteriores es el siguiente. Las reacciones peroxidativas son cambiantes según el tejido y la edad del animal que se considere.

Estas reacciones son influidas por un gran número de factores (pro-oxidantes unos, anti-oxidantes otros), los cuales están siempre en cierto equilibrio, que coincide con la actividad de catalasa expresada en cada tejido de los ratones mutados (tesis de doctorado de David Hernández). Este equilibrio varía según el tejido y la edad del animal. La ausencia de catalasa viene a afectar este equilibrio, haciendo que la mayor parte de las veces se incrementen los parámetros anti-oxidantes, o bajen los pro-oxidantes (hay menos DC). Las excepciones serían cerebro 10 meses y corazón 2 meses.

Cabe mencionar que en hígado, pulmón y corazón a los 10 meses no hay una diferencia significativa entre genotipos (se mantiene el equilibrio entre agentes anti-oxidantes y pro-oxidantes).

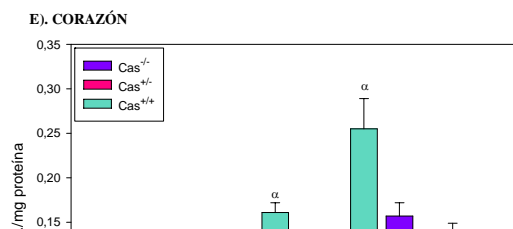
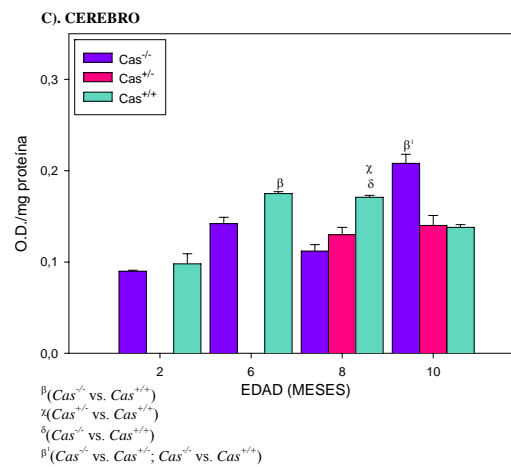
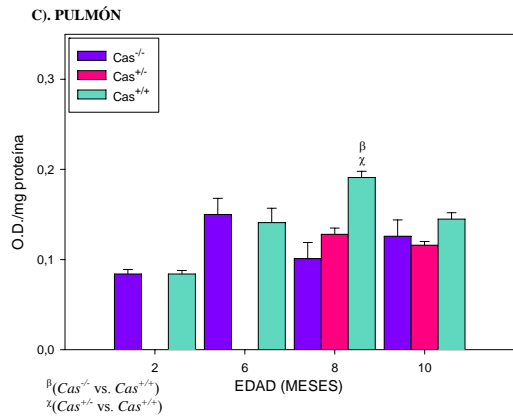
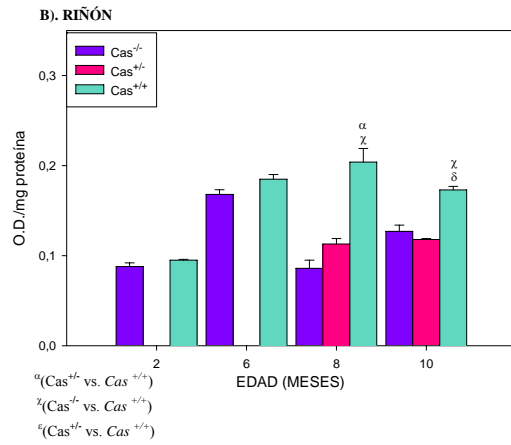
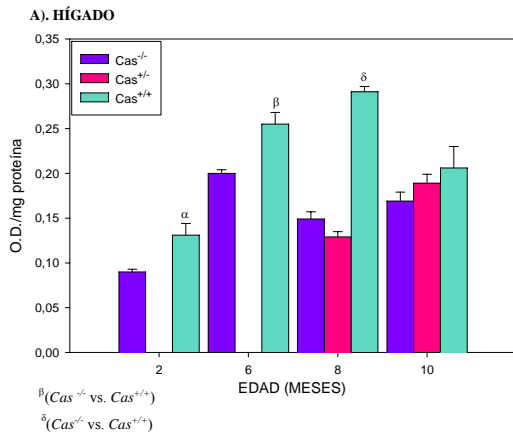
Dado que solamente se caracterizaron ratones jóvenes, los resultados sugieren la importancia de medir el daño oxidativo en ratones mayores de 12 meses, ya que sería relevante conocer si en edades avanzadas el daño oxidativo en ratones mutantes es mayor en comparación con el de jóvenes.

De igual manera, es evidente que al investigar la presencia o aumento de factores antioxidantes o señales involucradas en la disminución de los niveles de daño oxidativo en tejidos de ratones mutantes de la catalasa, se obtendría información relevante.

Los resultados de los DC se resumen en la siguiente Tabla 5.

<b>GENOTIPO</b>	<b>RESULTADOS RELEVANTES DE LOS NIVELES DE DC</b>
Tejidos de $Cas^{+/+}$	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Los niveles de DC varía según el tejido y la edad del organismo.</li> <li>2. El hígado es el órgano con los niveles de DC más altos.</li> <li>3. Hay un patrón ontogénico de tipo gaussiano en todos los tejidos, con niveles mayores a los 6 y 8 meses.</li> <li>4. En todos los tejidos los niveles de DC de los silvestres son mayores que de los mutantes a los 8 meses de edad.</li> </ol>
Tejidos de $Cas^{+/-}$	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Los niveles de DC se mantienen constantes a los 8 y 10 meses en todos los tejidos, excepto en hígado, donde a los 10 meses presenta niveles mayores de DC que a los 8 meses.</li> <li>2. Los DC de los <math>Cas^{+/-}</math> son menores que de los silvestres a los 8 meses.</li> </ol>
Tejidos de $Cas^{-/-}$	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se aminora el comportamiento gaussiano que se observa en los <math>Cas^{+/+}</math>.</li> <li>2. En la mayoría de los tejidos, los <math>Cas^{-/-}</math> llegan a presentar niveles menores que los <math>Cas^{+/+}</math>.</li> <li>3. En cerebro a los 10 meses de edad, los <math>Cas^{-/-}</math> presentan mayores niveles de DC que <math>Cas^{+/-}</math> y que <math>Cas^{+/+}</math>, como se esperaba.</li> </ol>

**Tabla 5.** Resumen de los resultados de la determinación de los dienos conjugados.



**Figura 9.** Dienes conjugados en tejido de ratones mutantes de diferentes edades. Se determinaron los niveles de lípidos peroxidados, a nivel de dienos conjugados (D.O./mg proteína), en el momento de ser procesado el tejido de ratones *Cas*<sup>-/-</sup> (barras azules) y *Cas*<sup>+/+</sup> (barras verdes) de 2, 6 8 y 10 meses de edad; y de ratones *Cas*<sup>+/-</sup> (barras rojas) de 8 y 10 meses de edad. Los tejidos analizados fueron: hígado (A), riñón (B), pulmón (C), cerebro (D) y corazón (E). Cada grupo representa el promedio de 4 animales (n = 4) ± error estándar.

El nivel de significancia fue calculado por el método de *t de student* para comparar 2 grupos de la misma edad. <sup>α</sup> P<0.05, <sup>β</sup> P<0.01, <sup>γ</sup> P<0.005 y <sup>δ</sup> P<0.001, y por ANOVA para comparar los tres diferentes genotipos.

### VII.2.2 Niveles de malondialdehído (modificación a lípidos)

La cantidad de malondialdehído (MDA) nos indica el grado de lípidos oxidados, y al ser estimulados con Fe<sup>2+</sup> muestran el potencial de peroxidación máximo que tiene el tejido.

En las figuras 10 (A-E) se grafican los niveles basales, estimulados con Fe<sup>2+</sup> y el cociente Fe<sup>2+</sup>/basal de MDA/mg de proteína con respecto a la edad en hígado (A) riñón (B) pulmón (C) cerebro (D) y corazón (E) de ratones *Cas*<sup>+/+</sup> y *Cas*<sup>-/-</sup> de 2, 6, 8 y 10 meses de edad; y de ratones *Cas*<sup>+/-</sup> de 8 y 10 meses de edad.

De los resultados obtenidos se puede apreciar lo siguiente. Todos los tejidos de los animales de 2 meses responden de manera similar: *Cas*<sup>+/+</sup> con LP basal aumentada (a excepción del riñón) y con relación Fe/basal disminuida (a excepción del pulmón y el cerebro). Es importante recordar que la cepa de ratones *Cas*<sup>+/+</sup> de 2 meses de edad es equivalente a la del resto de la población. (si es que la diferencia se debe a la cepa, no es relevante considerar los *Cas*<sup>+/+</sup> de 2 meses).

Por otro lado, se observan cambios ontogénicos muy grandes en los animales *Cas*<sup>+/+</sup> (incremento en la lipoperoxidación), con excepción de los de 2 meses, principalmente en hígado, riñón, cerebro y corazón, que compaginan de manera excelente con la actividad de catalasa expresada en los tejidos; esto es, actividad alta en hígado, riñón y pulmón, y muy discreta o casi ausente en corazón y cerebro (Ho *et al*, 2004) y con los de analizados en estos ratones, donde se encontró de mayor a menor actividad de la catalasa en el orden siguiente: hígado> riñón> baso> cerebro (datos en tesis de doctorado de David Hernández, que está en proceso de terminación). Estos cambios ontogénicos no se observan en los animales *Cas*<sup>-/-</sup>. Pareciera que, por la disminución en la peroxidación basal en los animales mutantes, se expresa un factor compensatorio que evita las reacciones pro-oxidantes y que impide el aumento drástico de ese parámetro en los ratones viejos. Sería trascendental averiguar qué efectos compensatorios se pudieran



estar prendiendo, dado que, según los reportes del grupo de Ho *et al*, 2004; no se altera la actividad de Gpx, CuZn-SOD ni MnSOD (datos no mostrados por los autores), que es consistente con los resultados que se obtuvieron en este laboratorio, donde no se vio aumento de actividad en Gpx (datos no mostrados).

Se nota un aumento de MDA en los ratones  $Cas^{-/-}$  a los 8 meses, sobre todo en cerebro y corazón (con la excepción del riñón y pulmón).

Los niveles de lipoperoxidación en cerebro de animales  $Cas^{-/-}$  de 10 meses son mayores que los de  $Cas^{+/-}$  y de  $Cas^{+/+}$ ; en corazón, los MDA son mayores que heterocigos pero igual que de los  $Cas^{+/+}$ .

La interpretación tentativa con este análisis (TBARS) pudiera ser que los tejidos que usualmente tienen catalasa en alta expresión (hígado, riñón y pulmón), responden a su ausencia induciendo otras actividades enzimáticas que metabolizan  $H_2O_2$ . Esto lo observan también los del grupo de Ho *et al*, 2004; ya que reportaron que el pulmón de los animales  $Cas^{-/-}$  resistió estímulos pro-oxidantes sin entrar en estrés oxidativo. Sin embargo los tejidos que no expresan catalasa de manera corriente (corazón y cerebro) no

presentan este fenómeno compensatorio. Además, como ellos argumentan, la función de la catalasa en limitar daño al pulmón de una exposición a hiperoxia, es insignificante.

Otra interpretación pudiera ser que, en tejidos donde presentan alta actividad de la catalasa, es suficiente o tan efectivo como un 50% de nivel de catalasa normal, puesto que el grupo de Ho *et al* 2004; vieron que, al incubar 10mg de tejido de hígado con 10  $\mu M$  de  $H_2O_2$ , analizaron la concentración del sobrenadante a diferentes tiempos y vieron que la eficiencia del consumo de  $H_2O_2$  en tejido de  $Cas^{+/+}$  y  $Cas^{+/-}$  fue similar.

Parece que, en general, a los 10 meses de edad el  $Cas^{+/-}$  es quien tiene el menor potencial prooxidante, pero la mayor capacidad peroxidante.

Otras observaciones más detalladas sobre los niveles de MDA son los siguientes. En hígado de 10 meses de edad el  $Cas^{-/-}$  presenta menos LP basal que  $Cas^{+/+}$ , pero el  $Cas^{+/-}$ , menor que el  $Cas^{-/-}$ ; el  $Cas^{+/-}$  a su vez tiene mayor capacidad peroxidante que los otros 2 genotipos. En riñón pasa lo mismo con las cantidades de LP basal pero no al estimularse con  $Fe^{2+}$ .

En pulmón a los 10 meses, el  $Cas^{+/+}$  mayor con respecto a  $Cas^{-/-}$  y  $Cas^{+/-}$ , pero el  $Cas^{-/-}$  parece con mayor capacidad peroxidante.

En cerebro a los 8 meses, el  $Cas^{-/-}$  es quien presenta mayor cantidad de LP basales y el  $Cas^{+/+}$  mayor capacidad peroxidante. A los 10 meses no hay diferencia entre el  $Cas^{-/-}$  y  $Cas^{+/+}$ , pero el  $Cas^{+/-}$  tiene los niveles más bajos que los otros 2 genotipos.

En corazón a los 8 y 10 meses pasa lo mismo que en pulmón, pero la mayor capacidad peroxidante la tiene el  $Cas^{+/-}$  a los 10 meses.

Uno de los resultados menos esperado fue el siguiente. Se presentan niveles similares en los niveles de MDA de los  $Cas^{-/-}$  y  $Cas^{+/+}$  a los 8 meses de edad, pero son mayores que el de los  $Cas^{+/-}$ .

En este contexto pudiera presentarse el efecto de 2 fenómenos:

(1) Que sea suficiente un alelo del gen de la catalasa para codificar la proteína con actividad o capacidad antioxidante eficiente y/o para activar otros mecanismos de defensa antioxidante.

(2) Pudiera ser que en los  $Cas^{+/-}$  se disparen o activen mecanismos de defensa en función de la concentración del  $H_2O_2$ ; por ejemplo, a bajas concentraciones de  $H_2O_2$ , Gpx tiene mejor función para removerlo, en cambio a concentraciones altas de  $H_2O_2$ , es más efectiva la catalasa. Como lo muestra el grupo de Ho *et al*, 2004; en hígado que es suficiente la cantidad de catalasa del  $Cas^{+/-}$  para remover el  $H_2O_2$ . Vemos también que los  $Cas^{+/-}$ , al estimularse con Fe, tienen una mayor capacidad peroxidativa lo que

sugiere que, además de que las cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pudieran favorecer a la catalasa para tener reacción antioxidante, otras moléculas antioxidantes pudieran incrementar dicho efecto; sin embargo, el recambio de lípidos pudiera estar limitado.

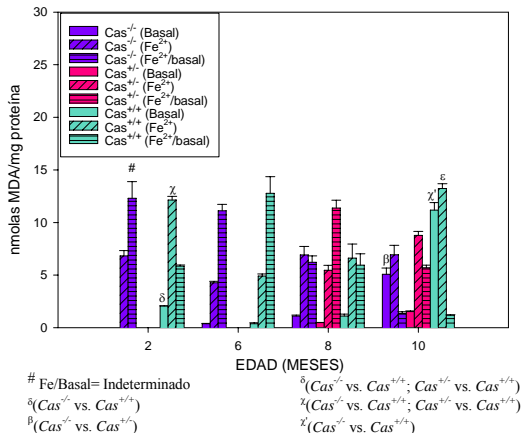
Además, como se analizó anteriormente, al agregar determinada cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la sangre de ratones de los 3 genotipos se observa una descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> (percibido como un incremento de volumen en forma de burbujas (figura 5.3), que concuerda con la actividad de la catalasa, pero que aún en la sangre de ratones nulos se descompone el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aumenta un poco el volumen al agregar sangre al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lo cual favorece la idea de la presencia de otros factores antioxidantes involucrados.

En la tabla 6 se resumen los resultados de la determinación de lipoperoxidación por el método de TBARS.

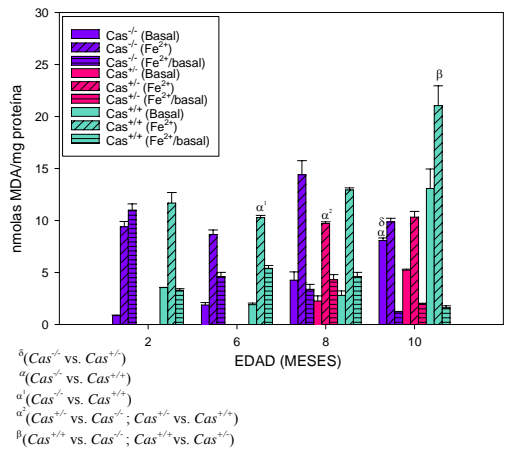
<b>GENOTIPO</b>	<b>RESULTADOS RELEVANTES DE LOS NIVELES DE MDA</b>
Tejidos de <i>Cas</i> <sup>+/+</sup>	1. En todos los tejidos se presentan cambios ontogénicos muy grandes, donde se incrementa la lipoperoxidación con la edad, a excepción del pulmón, cuyos niveles de MDA son similares a los 8 y 10 meses de edad.
Tejidos de <i>Cas</i> <sup>+/-</sup>	1. En todos los tejidos a los 10 meses de edad, es quien tiene el menor potencial prooxidante (los niveles más bajos de MDA basales) pero la mayor capacidad peroxidante (los niveles más altos de la relación Fe <sup>2+</sup> /basal)
Tejidos de <i>Cas</i> <sup>-/-</sup>	1. En cerebro y corazón se presenta un aumento de los niveles de MDA a los 8 meses de edad, con respecto a las demás edades.

**Tabla 6.** Resumen de los resultados de la determinación de lipoperoxidación por el método de TBARS.

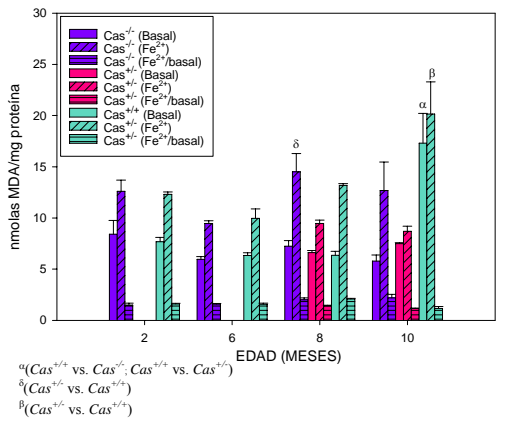
**A). HÍGADO**



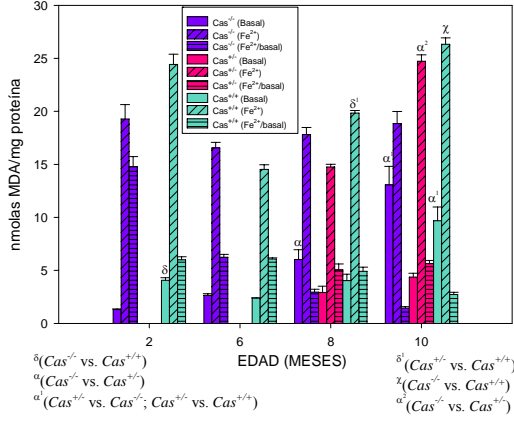
**B). RIÑÓN**



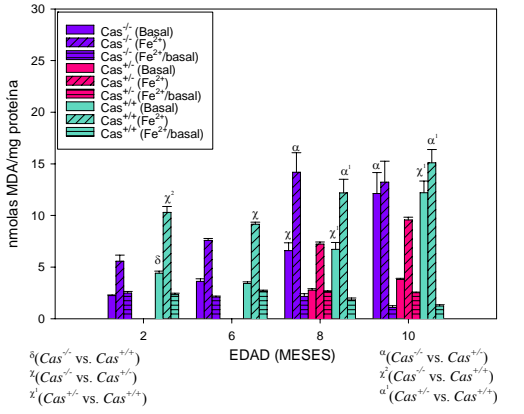
**C). PULMÓN**



**D). CEREBRO**



**E). CORAZÓN**



**Figura 10.** Niveles de MDA, en tejido de ratones mutantes de diferentes edades. Las gráficas representan los niveles de MDA, expresados como nmolas de MDA/mg proteína (eje y), en tejidos de ratones de 2, 6, 8 y 10 meses de edad (eje x). Los tejidos analizados fueron: hígado (A), riñón (B), pulmón (C), cerebro (D) y corazón (E). Se midieron las cantidades de MDA de los ratones  $Cas^{-/-}$  de 2, 6, 8 y 10 meses de edad (barras color azul); de los  $Cas^{+/-}$  de 8 y 10 meses de edad (barras color rosa); y de los  $Cas^{+/+}$  de 2, 6, 8 y 10 meses de edad (barras color verde). Las barras sin líneas de relleno expresan los niveles de MDA a nivel basal, las barras rellenas con líneas diagonales representan niveles de MDA estimulados con  $Fe^{2+}$  y las barras con líneas horizontales muestran la proporción de niveles de MDA estimulados con Fe con respecto al nivel basal ( $Fe^{2+}$ /basal). Cada barra muestra el promedio de 4 animales ( $n = 4$ )  $\pm$  error estándar.

El nivel de significancia fue calculado por el método de *t de student* para comparar 2 grupos de la misma edad pero de diferente genotipo.  $^{\alpha} P < 0.05$ ,  $^{\beta} P < 0.01$ ,  $^{\chi} P < 0.005$  y  $^{\lambda} P < 0.001$ ; y por ANOVA para comparar los tres diferentes genotipos.

### VII.2.3 Niveles de carbonilos (modificación a proteínas)

La carbonilación de proteínas, a diferencia de la peroxidación de lípidos (TBARs y dienos conjugados), es una modificación mucho más estable, y por lo tanto más duradera. Los carbonilos de las proteínas tienen un recambio mucho más lento que los lípidos membranales. Entonces la medición de carbonilos en un tejido es una estimación de actividad pro-oxidante representativa de cambios a largo plazo.

#### Observaciones en tejidos de ratones $Cas^{+/+}$

El resultado que salta a la vista en los carbonilos es que los ratones  $Cas^{+/+}$  presentaron el mismo tipo de variación ontogénica en los carbonilos en todos los tejidos estudiados.

Esta fluctuación ontogénica se caracteriza por una elevación relevante de carbonilos en los ratones de 8 meses de edad.

Sin embargo, en todas las edades analizadas, el pulmón es el tejido que presenta mayor nivel de carbonilos que los demás tejidos.

Los niveles de carbonilos en general son bajos y discretos en los ratones de 2 y 6 meses de edad.

Los ratones silvestres bajan los niveles de carbonilos otra vez a los 10 meses, haciendo que el patrón ontogénico simule una gaussiana aguda, con el pico a los 8 meses de edad.

#### Observaciones en tejidos de ratones $Cas^{-/-}$

Los carbonilos de los ratones  $Cas^{-/-}$  tuvieron un comportamiento completamente opuesto. Los carbonilos fueron constantes, sin presentar cambios drásticos relacionados con la edad.

En el caso de los  $Cas^{-/-}$ , también es el pulmón quien presenta niveles más altos de carbonilos, que en los demás tejidos, en todas las edades.

Por esta constancia ontogénica de carbonilos en los ratones  $Cas^{-/-}$ , se advierten 3 consecuencias: (1) En 2 y 6 meses de edad los carbonilos de los mutantes tienden a ser más altos (de manera discreta, pero significativa); (2) a los 8 meses de edad los

carbonilos de los ratones mutantes son mucho más bajos que el control (cerca de la mitad); (3) a los 10 meses los 2 grupos experimentales tienden a ser similares.

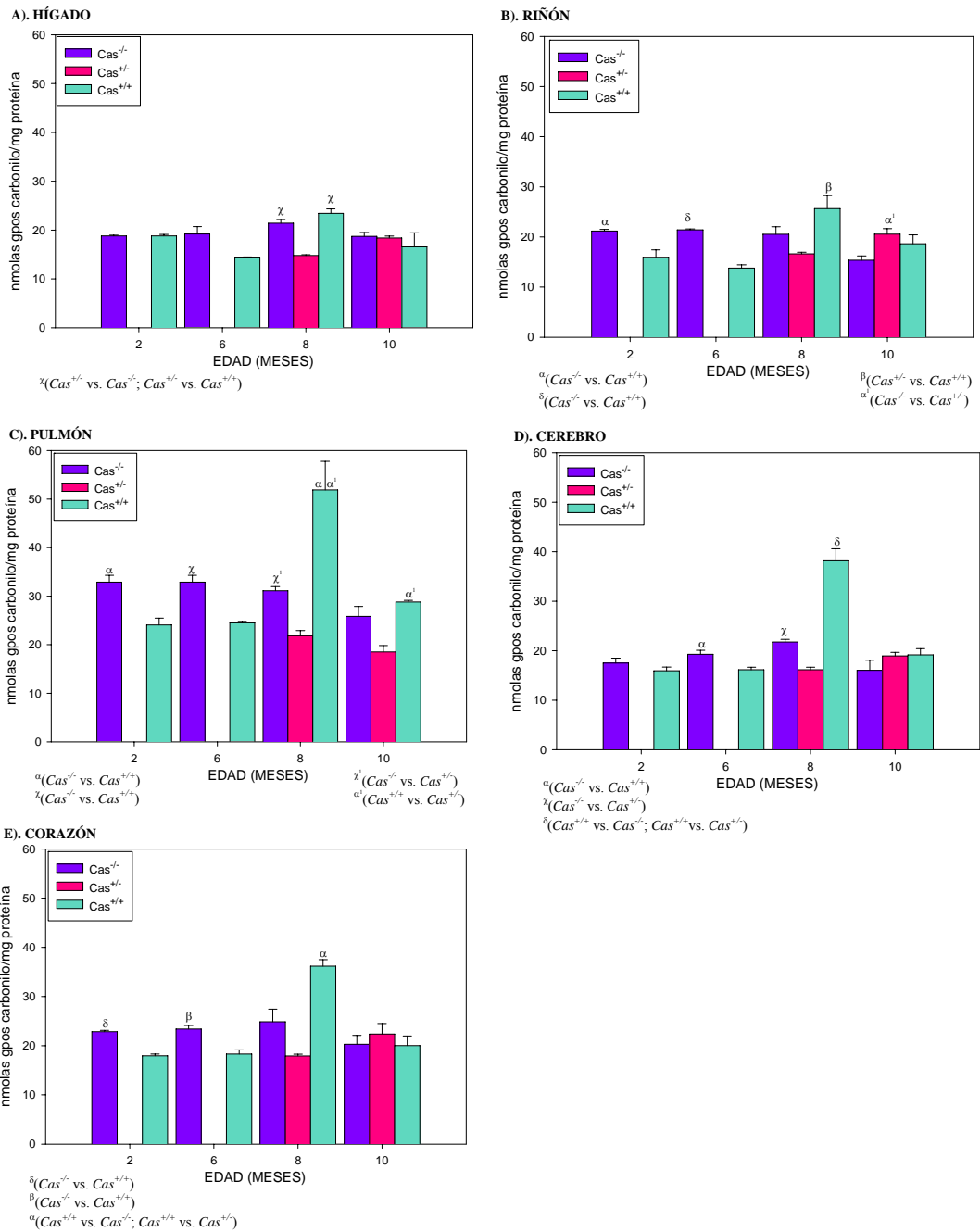
**Observaciones en tejidos de ratones  $Cas^{+/-}$**

Por otra parte, los  $Cas^{+/-}$  a los 8 meses de edad en hígado, pulmón, cerebro y corazón presentan los niveles más bajos de carbonilos que los  $Cas^{-/-}$  y que los  $Cas^{+/+}$ . Pudiera ser que 1) el recambio de proteínas sea más eficiente en los  $Cas^{+/-}$  a los 8 meses de edad, o más bien que el efecto es debido al aumento de carbonilos en los  $Cas^{+/+}$  a los 8 meses.

En la tabla 7 se resumen los resultados correspondientes a la determinación de la cantidad de carbonilos.

<b>GENOTIPO</b>	<b>RESULTADOS RELEVANTES DE LA CANTIDAD DE CARBONILOS</b>
Tejidos de $Cas^{+/+}$	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se presenta una fluctuación ontogénica, con una elevación relevante de los carbonilos a lo 8 meses de edad.</li> <li>2. El pulmón es el tejido que presenta un mayor nivel de carbonilos que los demás tejidos</li> <li>3. A los 8 meses de edad, en todos los tejidos, los carbonilos son más altos en los silvestres que en los mutantes de la catalasa.</li> </ol>
Tejidos de $Cas^{+/-}$	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. A los 8 meses de edad, en todos los tejidos excepto en riñón, presenta niveles más bajos que los <math>Cas^{-/-}</math> y que los <math>Cas^{+/+}</math>.</li> <li>2. El pulmón es el tejido con mayores niveles de carbonilos sólomente a los 8 meses de edad.</li> </ol>
Tejidos de $Cas^{-/-}$	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. En hígado y corazón los carbonilos son constantes en todas las edades; en el resto de los tejidos las variaciones son mucho más ligeras que en los silvestres.</li> <li>2. El pulmón es el tejido con mayores niveles de carbonilos.</li> </ol>

**Tabla 7.** Resumen de los resultados de la determinación de carbonilos.



**Figura 11.** Nivel de proteínas modificadas por daño oxidativo en función de la edad. Las gráficas representan los niveles de carbonilos, expresados como nmolas de grupos

carbonilo/mg proteína (eje y), en tejidos de ratones de 2, 6, 8 y 10 meses de edad (eje x). Los tejidos analizados fueron: hígado (A), riñón (B), pulmón (C), cerebro (D) y corazón (E). Se midieron las cantidades de carbonilos de los ratones  $Cas^{-/-}$  de 2, 6, 8 y 10 meses de edad (barras color azul turquesa); de los  $Cas^{+/-}$  de 8 y 10 meses de edad (barras color rojo); y de los  $Cas^{+/+}$  de 2, 6, 8 y 10 meses de edad (barras color verde). Cada barra muestra el promedio de 4 animales ( $n = 4$ )  $\pm$  error estándar.  $^{\alpha} P < 0.05$ ,  $^{\beta} P < 0.01$ ,  $^{\gamma} P < 0.005$  y  $^{\chi} P < 0.001$

El nivel de significancia fue calculado por el método de *t de student* para comparar 2 grupos, y por ANOVA, al comparar los tres genotipos de ratones  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$  en cada condición.

#### **VII.2.4. Conclusiones de los resultados de la determinación de daño oxidativo**

Al igual que el grupo de Ho (2004), a pesar de que no analizan animales viejos, sino que sólo consideraron ratones muy jóvenes de 8 y 10 semanas de edad, no se observan cambios hacia un estado pro-oxidante en los ratones  $Cas^{-/-}$ . Los resultados más importantes se ven al comparar los cambios en la ontogenia de los animales. Los ratones  $Cas^{+/+}$  presentan cambios muy acentuados en todos los parámetros que se midieron conforme van envejeciendo.

El dato más contrastante es que los  $Cas^{-/-}$  tienden a ser constantes en todos parámetros determinados, sobre todo en los datos de dienos conjugados.

Lo anterior trae como consecuencia que en ciertas edades el nivel pro-oxidante de los  $Cas^{+/+}$  sea mayor, mientras que en otras edades las reacciones pro-oxidantes de los  $Cas^{-/-}$  son ahora las de mayor nivel. El cambio principal que genera la mutación de la catalasa es la cancelación de en los cambios ontogénicos en los carbonilos de los diferentes tejidos.

Dada la relevancia de la función de los peroxisomas en degradar los lípidos, se esperaba encontrar niveles significativamente mayores de lipoperoxidación en ratones  $Cas^{-/-}$  que en  $Cas^{+/+}$ , ya que la catalasa se encuentra principalmente en los peroxisomas; sin embargo, sorprendentemente no fue así. Esto sugiere que (1) los niveles de actividad de la catalasa en los peroxisomas posiblemente dependen del nivel de concentración del  $H_2O_2$ , o que (2) el rol de la catalasa en degradar lípidos en los peroxisomas pudiera no ser relevante.

Sería importante evaluar el daño oxidativo en DNA de estos ratones.

### **VII.3 SENESCENCIA REPLICATIVA**

#### **VII.3.1 Obtención de los fibroblastos embrionarios de ratón**

Se ha encontrado que la senescencia celular puede ser inducida por  $H_2O_2$  (Chen *et al.*, 1994), y que las células senescentes muestran mayores niveles de daño oxidativo que las células de pases tempranos. Dado estas evidencias, el propósito de este trabajo fue averiguar si las células provenientes de ratones mutantes de la catalasa senescen antes que las células de los ratones silvestres.

Se realizaron aproximadamente 10 cultivos para obtener fibroblastos embrionarios de ratones de 12 dpc; sin embargo, sólo se obtuvo un cultivo primario de  $Cas^{+/-}$  y uno de  $Cas^{-/-}$ . Esto se debió a que el número de embriones por camada en las cepas C57/Bl6 y 129 es en promedio 7, independientemente del genotipo. Los embriones de 12dpc de esa cepa son demasiado pequeños, comparados con los de la CD1, lo cual limita la cantidad de células obtenidas, y por tanto la viabilidad celular.

Por tal razón, se obtuvieron cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de 14dpc a partir de 10 embriones  $Cas^{+/+}$ , de 9 embriones  $Cas^{-/-}$  y de 8 embriones  $Cas^{+/-}$ . Una vez

que llegaban a subconfluencia, se subcultivaron  $1 \times 10^6$  células por caja de 10cm de diámetro, para obtener el pase 1 (P1).

La disponibilidad de los embriones de los 3 genotipos no coincidió el mismo día, por tal razón, el cultivo primario de fibroblastos  $Cas^{-/-}$  estaba desfasado 1 día, con respecto a los  $Cas^{+/+}$  y  $Cas^{+/-}$ ; por tal motivo, al llegar nuevamente a subconfluencia, los cultivos del P1, tanto mutantes como el  $Cas^{+/+}$ , se congelaron a  $-70^{\circ} C$  y al día siguiente se transfirieron al contenedor con Nitrógeno líquido. No se observaron diferencias en la morfología de las células de cultivos primarios de los diferentes genotipos (Figura 12).

### VII.3.2 Envejecimiento de los fibroblastos

La senescencia se define como la pérdida de la capacidad de replicarse que tienen las células. Se sabe que las células senescentes presentan mayores niveles de daño oxidativo que las células de pases tempranos, y que la senescencia celular puede ser inducida por ERO como el  $H_2O_2$  (Chen *et al*, 1994). Con el objetivo de probar la hipótesis de que la falta de catalasa induce senescencia replicativa en las células, se obtuvieron fibroblastos embrionarios de ratones mutantes de la catalasa y silvestres, y se compararon sus características morfológicas, cantidad de células positivas para  $\beta$ -galactosidasa (marcador de senescencia celular), así como la tasa de proliferación.

Con la finalidad de que las condiciones de cultivo fuesen las mismas, el proceso de envejecimiento se inició el mismo día y hora en los tres genotipos, partiendo del P1 (pase 1). Se descongelaron las células del P1 de los 3 genotipos y se cultivó la misma cantidad de células en un plato de 10cm de diámetro.

Durante el proceso de envejecimiento de las células  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$ , que inició desde el P1, las condiciones de cultivo fueron las mismas.

Debido a que las células  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$  proliferaban a velocidades distintas y que no llegaban a subconfluencia al mismo tiempo, el momento del subcultivo fue determinado por la línea celular que llegaba primero a la etapa de subconfluencia. Se midió el tiempo transcurrido entre cada pase, la cantidad de células obtenidas y la de células sembradas. En cada pase se sembró la misma densidad celular. En los primeros cuatro pases se sembraron  $1 \times 10^6$  células en un plato de 10cm, del P5-P9 se sembraron 250,000 células en una caja de 10cm, en el P9-P10 se sembraron 150,000 células por caja de 6cm, y en los demás se sembraron 100,000 células por caja de 6cm.

La eficiencia de pegado (definido como la cantidad de células sembradas entre la cantidad de células obtenidas a las 10 h de haberlas sembrado) en el pase 3 resultó ser de 80% en las 3 líneas celulares, éste dato fue utilizado para el cálculo del doblaje de la población.

En algunos estudios se han encontrado niveles de oxidación altos en células provenientes de organismos viejos (Konigsberg *et al*, 2004). Se esperaba que, los fibroblastos mutantes senescieran antes que los controles. Sin embargo, como se demuestra en la figura 13, los fibroblastos de las 3 líneas no senescieron en el orden esperado, sino que los  $Cas^{+/-}$  fueron los primeros en dejar de proliferar con el tiempo. En cambio, la tasa de proliferación de las células  $Cas^{-/-}$  y  $Cas^{+/+}$  es similar.

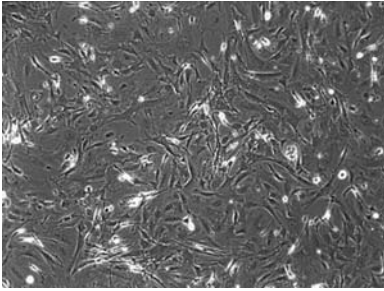
Los cambios morfológicos se pueden apreciar claramente en la línea  $Cas^{+/-}$  en el pase 13, posiblemente al ser la primera línea en proliferar más lentamente.

Los resultados antes mencionados pueden sugerir lo siguiente:

- a) Dado que, al igual que el grupo de Ho (2004), se observó que la actividad de la catalasa depende de la concentración de  $H_2O_2$ , pudiera ser que a la mitad de dosis de catalasa y la consecuente concentración de  $H_2O_2$  sean suficientes para mantener el nivel normal de proliferación celular.

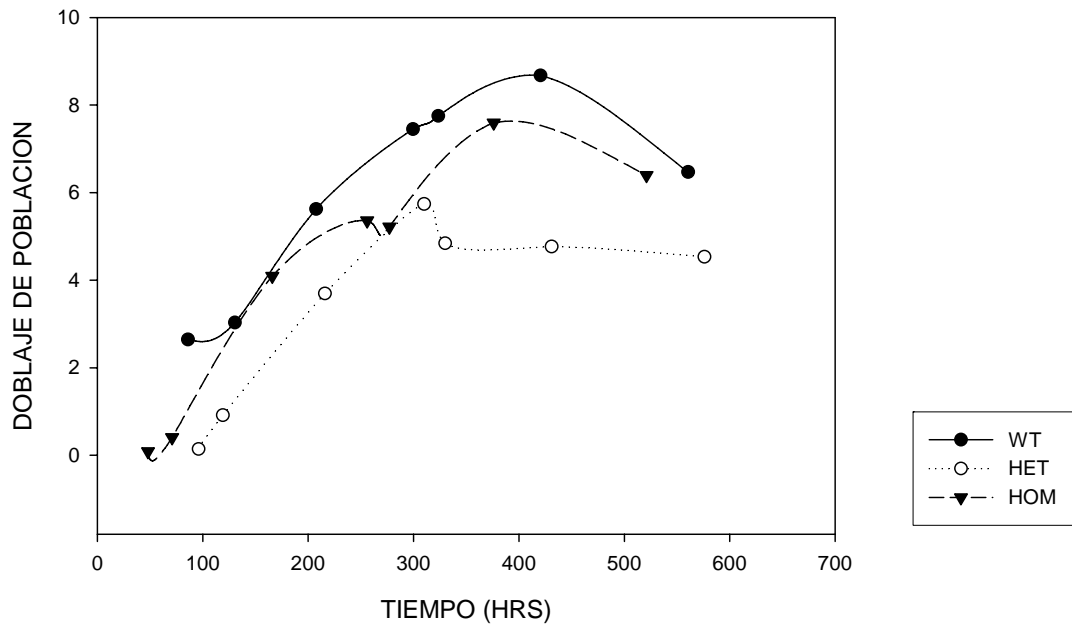


- b) Pudiera ser que el  $H_2O_2$ , dependiendo de su concentración, también active genes involucrados en ciclo celular, y por tanto en proliferación celular
- c) Sin embargo, la línea  $Cas^{+/-}$  no alcanza los mismos niveles de doblaje de población que el resto de las líneas, lo cual pudiera indicar un mayor nivel de sensibilidad a morir, con algún agente oxidante, con respecto a las demás, cuyos resultados se muestran después.



**Figura 12.** Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratones mutantes  $Cas^{-/-}$  de 12 dpc. En general, se muestran las mismas características morfológicas en las  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{+/+}$ .

### ENVEJECIMIENTO DE FIBROBLASTOS



**Figura 13.** Duplicación de la población con respecto al tiempo en fibroblastos de ratones embrionario.

#### VII.3.3 Detección de $\beta$ -gal asociada a senescencia

Se considera la expresión de  $\beta$ -gal a pH 6 como un marcador de la senescencia celular (Dimri *et al*, 1995). Con el objetivo de probar si las células mutantes de la

catalasa senescen más pronto que las silvestres, nos dimos a la tarea de detectar células positivas para  $\beta$ -galactosidasa.

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en una caja de  $6\text{cm}^2$ , lo cual les deja mucho espacio intercelular para evitar quiescencia por inhibición por contacto; se utilizaron cultivos de pases tempranos (P4) e intermedios (P7) y a las 12 h de sembradas se realizó el ensayo de detección de  $\beta$ -gal. Se utilizó como control positivo células incubadas con solución de tinción sin X-gal. A las 12 h después de haber realizado el ensayo, se examinaron en el microscopio, y los resultados fueron los siguientes.

Se detectó una célula positiva para  $\beta$ -gal en cada línea celular (fotos no mostradas). Este sugiere que se requiere del control positivo para descartar que un posible error sistemático. Además, es conveniente realizar el experimento con células de pases más avanzados para compararlos con células de pases tempranos.

#### VII.4 SUSCEPTIBILIDAD DE LAS CÉLULAS A MORIR CON $\text{H}_2\text{O}_2$

El objetivo de este experimento fue investigar si las células provenientes de ratones mutantes de la catalasa son más sensibles a morir por agentes oxidantes, como el peróxido, puesto que se ha visto que el tratamiento a células con determinadas dosis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser letal. Para lograr el objetivo planteado, el primer paso fue estandarizar la cantidad de células sembradas por pozo, y evaluar la concentración de peróxido que induzca muerte celular.

Se lograron sembrar homogéneamente 100,000 células por pozo en placas de 24 pozos de  $2\text{cm}^2$ . Como se observa en la tabla 8, a concentraciones de 25 mM a 100 mM, todas las células mueren instantáneamente después de aplicarles el tratamiento. Esto significa que son concentraciones muy altas para observar la diferencia y que pudieran haber muerto por necrosis.

De la misma manera se observa que a concentraciones de 20mM a 5mM, a pesar de que no mueren al instante, no hay diferencia entre cada línea celular; lo cual significa que a esas concentraciones no es posible distinguir una diferencia, entre las líneas celulares, de sensibilidad a morir.

A concentraciones de 4mM a 1mM se aprecian todas las células muertas a las 12 horas; y a pesar de mueren más lentamente que con concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  más alto, tampoco se percibe una diferencia, entre las líneas,

Esto sugiere que el experimento, a estas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no pudo evaluar la sensibilidad a morir en las diferentes líneas celulares. Por lo cual se sugiere evaluar dicha sensibilidad a concentraciones menores a 1mM a esta misma densidad celular, ya que en trabajos anteriores (Chen et al, 1994) se encontró en células humanas que el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  mayor de  $100\mu\text{M}$  durante 1 a 2h es letal a una densidad celular de  $2 \times 10^4$ .

Línea celular	Tiempo de muerte después del tratamiento con diferentes concentraciones de $\text{H}_2\text{O}_2$ (en hrs)								
	100 mM	50mM	25mM	20mM	10mM	5mM	4mM	2mM	1mM
<i>Cas</i> <sup>-/-</sup>	0	0	0	5	5	5	12	12	12
<i>Cas</i> <sup>+/-</sup>	0	0	0	5	5	5	12	12	12
<i>Cas</i> <sup>+/+</sup>	0	0	0	5	5	5	12	12	12

**Tabla 8.** Sensibilidad de las células a morir con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se muestra el tiempo, en horas, en que tardan en morir las células, sembradas a una densidad de 100,000 en una caja de

6cm. Se probaron diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , desde 100 mM a 1 mM. No se observan diferencias, entre  $\text{Cas}^{+/+}$ ,  $\text{Cas}^{+/-}$  ni  $\text{Cas}^{-/-}$ .

## VII.5 LONGEVIDAD DE LOS RATONES

Una manifestación del envejecimiento es la acumulación del daño a niveles celulares y del organismo. Para demostrar la hipótesis de que la falta de catalasa provoca daño oxidativo al tejido, envejecimiento y muerte del organismo, se determinó el porcentaje de sobrevivencia de la población de los ratones mutantes de la catalasa y de los silvestres en diferentes edades.

La longevidad de los organismos, en parte, representa el nivel de salud de los animales. Si existe un daño oxidativo en las macromoléculas, y niveles bajos de defensa antioxidante, traerá como consecuencia una disminución en la función de las células, que si no logran superar tal daño, mueren. Al daño acumulativo y muerte de las células le sigue un daño a los órganos, y un pronto deceso del organismo.

Dicho lo anterior, se esperaba que el porcentaje de sobrevivencia de los ratones mutantes fuera menor que el de los  $\text{Cas}^{+/+}$ , y que además disminuyera con la edad.

Los datos de supervivencia de los ratones mutantes y  $\text{Cas}^{+/+}$ , mostrados en la figura 14A, indican que no hay diferencia significativa en la longevidad de los ratones machos de 0 a 17 meses de edad; sugiriendo que posiblemente se activen otros mecanismos antioxidantes que compensen la falta de catalasa, tal que, en ratones menores de 17 meses de edad no se altere la supervivencia de los ratones, y por ende, la tasa de mortalidad. Sin embargo, después de los 20 meses de edad, se nota una diferencia marcada en el porcentaje de supervivencia de los  $\text{Cas}^{+/+}$  y los  $\text{Cas}^{+/-}$  con respecto a los  $\text{Cas}^{-/-}$ , pues en estos últimos, la sobrevivencia es menor que en los primeros.

Con esto se sugiere que, si es que en edades tempranas se activan mecanismos de defensa compensatorios por la falta de la catalasa, posiblemente los efectos compensatorios ya no son suficientes para impedir que mueran los ratones por falta de la catalasa en edades tardías.

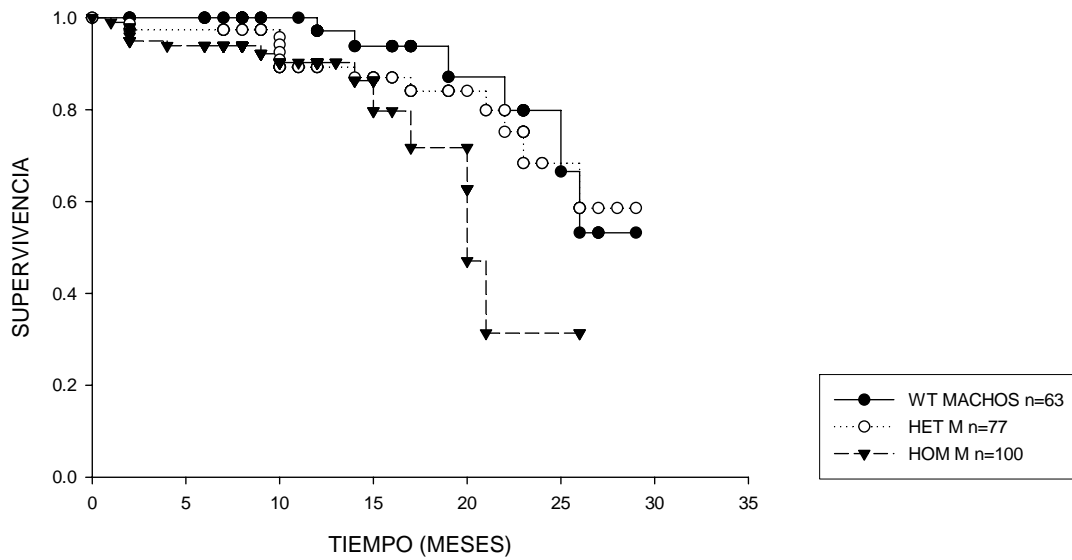
Sería trascendental analizar el daño oxidativo en tejidos de ratones de edades mayor de 12 meses.

Lo anterior representa resultados sumamente relevantes para posteriores investigaciones en el mecanismo de defensa alterna que se presenta a falta de la catalasa. Sería crucial investigar la causa de muerte de los ratones, para determinar los efectos directos de la falta de la catalasa, (ya que a simple vista no se nota un fenotipo marcado previo a la muerte de los animales, en ninguno de los genotipos); así como evaluar las respuestas o vías que se activan o regulan en respuesta a la falta de la catalasa.

Por otro lado, en la figura 14.B se grafica el porcentaje de supervivencia de ratones hembras, y se observa que, no hay diferencias en la sobrevivencia de ratones  $\text{Cas}^{+/+}$ ,  $\text{Cas}^{+/-}$  y  $\text{Cas}^{-/-}$  de 0 a 15 meses de edad; sin embargo se observa una marcada diferencia en el porcentaje de sobrevivencia a los 25 meses de edad, donde el 40% de los ratones  $\text{Cas}^{+/+}$ , aproximadamente el 60% de los ratones  $\text{Cas}^{+/-}$  y el 80% de los ratones  $\text{Cas}^{+/-}$  siguen vivos.

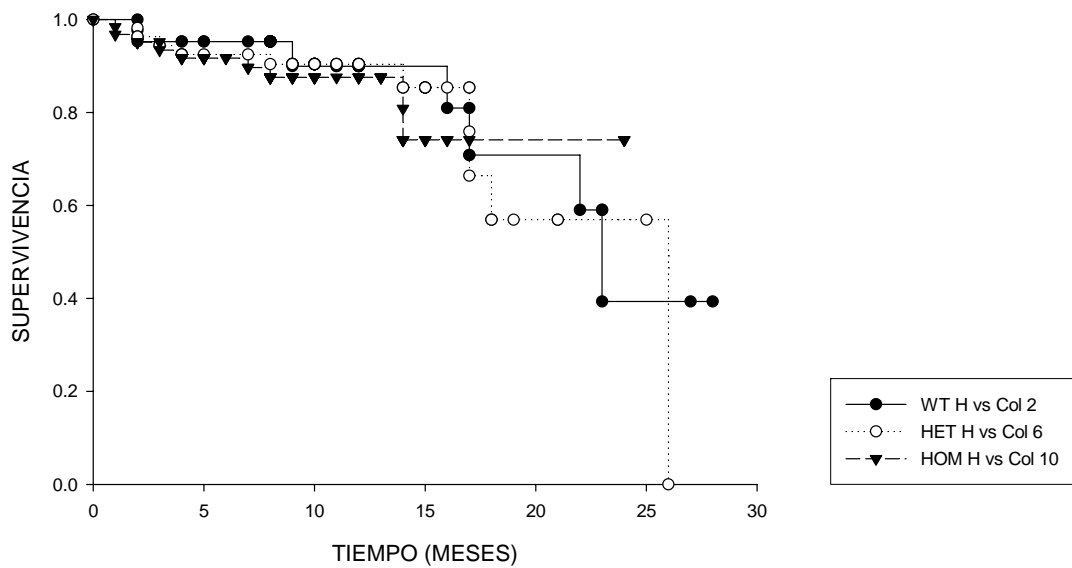
A).

### SUPERVIVENCIA DE RATONES MACHOS



B).

### SUPERVIVENCIA DE HEMBRAS



**Figura 14.** Supervivencia de ratones machos (14.A) y hembras (14.B) calculado por el método de Kaplan Meier, en el programa Sigma Plot 2001.

### VII.6 RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREEXPRESAN LA CATALASA

Una predicción de la teoría del envejecimiento es que el daño causado por ERO podría mejorar por intervenciones que aumenten la resistencia a estrés oxidativo. Se cuentan con evidencias que apoyen lo antes mencionado. Por ejemplo, se encontró que

la sobreexpresión transgénica de enzimas antioxidantes, como la CuZnSOD extendió la longevidad de *Drosophila melanogaster*. Otra evidencia en incrementar la longevidad de un organismo al aumentar las defensas antioxidantes se observó cuando al administrar pequeñas dosis de moléculas sintéticas con actividad de SOD/catalasa a *Caenorhabditis elegans*, se incrementó el tiempo de vida del nemátodo (Melov *et al*, 2000; Sampayo *et al*, 2003).

Con el objetivo de probar si el aumento de la expresión de la catalasa provoca una disminución en los niveles de daño oxidativo y un aumento de la longevidad, se cuenta con ratones de la cepa C57/BL6 transgénicos que sobreexpresan la catalasa, cuyos tejidos analizados muestran un aumento de la actividad de la catalasa con respecto a los silvestres (datos no mostrados, trabajo realizado en la tesis de doctorado de David Hernández).

Dado que no se mostraron diferencias aparentes en el fenotipo de los animales transgénicos con respecto al de los silvestres, fueron identificados mediante el diagnóstico de su genotipo, por PCR.

Se realizó las cruza entre ellos para expandir la población; sin embargo, la frecuencia de reproducción de las crías se fue reduciendo con el tiempo, razón por la cual el número de ratones no fue suficiente para determinar daño oxidativo y demás parámetros. Estos datos sugieren que la disminución de la población posiblemente se debió a condiciones ambientales externas y no al genotipo, puesto que los animales silvestres también dejaban de reproducirse.

Actualmente la población está en la etapa inicial de expansión.

## VIII. CONCLUSIONES

Con la ausencia de la catalasa se esperaba que aumentara la cantidad de peróxido, y por tanto el daño oxidativo. Además, como consecuencia del daño oxidativo, se esperaba una senescencia celular acelerada que posiblemente iría asociada a una disminución en la longevidad del organismo.

### 1. Genotipificación de los ratones

Se diagnosticó el genotipo de los ratones para el gen de la catalasa mediante la técnica de PCR y con el ensayo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en sangre.

Una vez que se identificaron los ratones, se generó la población con el fin de obtener los grupos de animales (n>10) machos de diferentes edades y con los diferentes niveles de catalasa; es decir, silvestres, homócigos y heterócigos para el alelo mutado.

### 2. Determinación del daño oxidativo en diferentes tejidos de ratones con diferentes niveles de catalasa

Con respecto al daño oxidativo, se midió la cantidad de lípidos hidroperoxidados, dienos conjugados, por la técnica de TBARS, y la oxidación de proteínas cuantificadas en cantidades de carbonilos formados por la reacción de DNPH. Todo esto se midió en riñón, pulmón, hígado, cerebro y corazón y a diferentes edades de los ratones (2, 6, 8 y 10 meses de edad).

Nuestras expectativas era obtener mayor cantidad de daño oxidativo (lípidos peroxidados, dienos conjugados y carbonilos) a menor número de alelos mutados de la catalasa. Es decir, un mayor aumento de daño oxidativo en mutantes homócigos para el alelo mutado, que en los heterócigos para el alelo mutado, y éste a su vez mayor que en los tipo silvestre.

Sin embargo, observamos lo siguiente:

- 1) Hubo mayor cantidad de lípidos hidroperoxidados, medidos como cantidad de malondialdehído (MDA), en los silvestres conforme aumenta su edad, lo cual concuerda con lo esperado. En los ratones mutantes, la cantidad de lípidos hidroperoxidados cambia según el tejido y la edad del animal
- 2) Con respecto a los dienos conjugados, se observó que, de entrada, los ratones silvestre presentan diferencias entre los tejidos: en todas las edades coinciden mayores niveles en hígado; hay un patrón ontogénico en todos los tejidos que sigue un comportamiento gaussiano, comenzando bajo (2 meses), con un pico máximo a los 6 y 8 meses, y a los 10 meses baja otra vez su nivel.
- 3) En los heterócigos, donde sólo se midieron a 8 y 10 meses de edad, hay un aumento en los niveles de dienos conjugados a los 10 meses en el hígado; en los demás tejidos, esos niveles se mantienen o disminuyen.

En general, pero con excepciones, los homocigotos de la catalasa presentan 2 efectos relevantes: el comportamiento gaussiano de los silvestres se aminora, tanto en intensidad como en duración.

- 4) Se encontró, en general, un aumento de carbonilos en todos los tejidos de los ratones silvestres a los 8 meses de edad, con un comportamiento gaussiano con la edad. En cambio, en los ratones mutantes, la cantidad de carbonilos se mantuvo más o menos constante conforme la edad avanza.

### 3. Determinación del envejecimiento celular en los fibroblastos mutantes en catalasa y los silvestres

Se obtuvieron los fibroblastos embrionarios de ratón de 14 dpc mutantes homócigos, heterócigos y silvestres

Los resultados preliminares mostraron que los fibroblastos embrionarios silvestres senescieron más lentamente que los heterocigotos y nulos para la catalasa, lo cual es un resultado esperado.

Sin embargo, los fibroblastos heterocigotos para el alelo mutado dejaron de proliferar antes que los homocigotos, aproximadamente a las 300h de cultivo.

Los cambios morfológicos se pueden apreciar claramente en la línea heterocigota en el pase 13, posiblemente al ser la primera línea en dejar de proliferar.

#### **4. Determinación de la susceptibilidad a morir por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de células con diferentes niveles de catalasa**

Los resultados preliminares mostraron que después de haber tratado a las células con diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desde 100mM a 10mM, no se encontró diferencia en la cantidad de células muertas ni en el tiempo en que murieron, entre las 3 líneas celulares. Es decir, a concentraciones de 20mM a 5mM, todas las células mueren aproximadamente a los pocos minutos del tratamiento. A concentraciones de 4mM a 1mM se aprecian todas las células muertas a las 12 horas.

#### **5. Determinación del efecto de la mutación en la longevidad de los ratones, mediante el análisis de supervivencia**

A simple vista, los ratones con diferentes niveles de expresión de la catalasa no presentan diferencias evidentes en el fenotipo.

Los datos de supervivencia de los ratones mutantes y controles, indican que no hay diferencia significativa en la longevidad de los ratones a los 20 meses de edad, que coincide con los resultados de daño oxidativo, medidos hasta los 10 meses de edad.

Sin embargo, el porcentaje de supervivencia de los homocigotos después de los 20 meses de edad es menor que el de los heterocigotos y silvestres.

## **IX. PERSPECTIVAS**

De los resultados obtenidos en este trabajo surgen numerosas dudas que estimulan a continuar investigando sobre la posible causa y mecanismos moleculares implicados en el proceso del envejecimiento. A continuación se plantean algunos posibles experimentos que pudieran ayudar a responder algunas de estas dudas.

### **1. Estimar daño oxidativo a ratones adultos**

Dado que se no se encontró un aumento en la cantidad de MDA y carbonilos en los ratones mutantes de la catalasa, con respecto a los silvestres en ninguna de las edades consideradas es posible que exista un umbral de especies reactivas de oxígeno que en tiempo y espacio varía al aumentar la edad. Es decir, sería interesante medir estos parámetros después de los 12 meses de edad, (especialmente a los 25 meses de edad, que es donde los heterócigos mostraron diferencia en la curva de sobrevivencia) para investigar si en ratones mayores de 1 año el efecto compensatorio, si lo hay, permanece; y si por el contrario, el daño oxidativo aumenta por la falta de catalasa. Averiguar la etapa en que aparece esta diferencia entre los ratones nulos de la catalasa y los silvestres pudiera marcar un punto clave en la fisiología del ratón en el que cambia el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno.

Además, sería útil investigar si hay una diferencia en daño al DNA por falta de la catalasa en ratones mayores de 12 meses de edad, ya que pudiera ser que la velocidad de recambio de lípidos, proteínas y DNA sea diferente, y que en respuesta, dichas macromoléculas oxidadas disparen diferentes mecanismos de defensa o representen señales de transducción diferente.

Sería conveniente investigar si, ante la falta de catalasa o ante el aumento de  $H_2O_2$ , incrementa la concentración de moléculas como transferrina o ferritina que reduzcan la cantidad de  $Fe^{2+}$  libre en el interior de las células tal que sea insuficiente para reaccionar con el  $H_2O_2$  y causar un incremento en el daño oxidativo. Una regulación de los niveles de glutatión en respuesta a cambios en el  $H_2O_2$  puede permitir el recambio de agentes reductores importantes en el metabolismo de la célula, como NADPH.

Será determinante diagnosticar si aumenta el recambio de los lípidos, proteínas y DNA más rápido en los mutantes, como efecto compensatorio ante la falta de catalasa.

### **2. Determinaciones patológicas**

Como se mencionó en los resultados, a simple vista no se aprecian diferencias significativas fenotípicas relacionadas con el nivel de expresión de la catalasa. Sin embargo, dado que se observaron algunos casos de sobrepeso en ratones heterócigos a los 12 meses de edad, y en particular en un homócigo que a los 14 meses de edad pesó 89.3g a diferencia de los silvestres que a esa edad pesan en promedio 40g, sería interesante medir algunos cambios fisiológicos que se asocien con enfermedades relacionadas con la edad, como diabetes, hipertensión, aterosclerosis, etc.

### **3. Daño a diferentes tejidos con agentes oxidantes**

Consistente con la propuesta anterior y con los resultados preliminares que mostraron susceptibilidad a daño miocárdico, sería importante determinar el efecto de la catalasa en daño al miocardio inducido con isoproterenol u otros agentes tóxicos relacionados con causantes de enfermedades cardíacas. Asimismo sería trascendental investigar la susceptibilidad que presentan los animales a daños en los diferentes tejidos a nivel histológico y molecular, después de un tratamiento con el ejercicio físico extenuante.

### **4. Memoria y aprendizaje**

Resultaría valioso realizar a los animales pruebas de comportamiento, como memoria y aprendizaje, después de ser sometidos a diferentes estímulos como ejercicio físico extenuante.

### **5. Daño oxidativo a las células**



Los resultados preliminares muestran que la senescencia de los fibroblastos embrionarios no fueron consistentes con los resultados de daño oxidativo en tejidos. Determinar el nivel de daño oxidativo a fibroblastos en cultivo pudiera resolver la duda con respecto a si los fibroblastos heterócigos presentan un mayor nivel de daño oxidativo con respecto a los otras dos líneas y así explique la causa del cesamiento en la proliferación celular. También se recomienda reforzar las conclusiones asociadas a la senescencia replicativa de las células, determinando la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en condiciones ácidas.

## **X. ANEXOS**

### **X.1 Anexo 1: Preparación de soluciones para PCR**

#### Soluciones stock

- ♦ Tris HCl 1M a pH 8 (para 100 ml):
  1. Disolver 7.9g de Tris-HCl en 80ml de H<sub>2</sub>O destilada.
  2. Ajustar el pH a 8 y aforar a 100ml.
  
- ♦ KCl 1M (para 100ml):
  1. Disolver 7.5g de KCl en 80ml de H<sub>2</sub>O destilada.
  2. Aforar a 100ml.
  
- ♦ Buffer de lisis al 10X (para 100ml de solución):
  1. Agregar 10ml de Tris HCl 1M, 50ml de KCl 1M, 10ml de Tween 20.
  2. Mezclar los reactivos lentamente para evitar la formación de espuma y aforar a 100ml con agua destilada.
  3. Si no se va a utilizar inmediatamente, almacenarlo a 4° C hasta un par de meses.
  
- ♦ Buffer de lisis al 1X (para 100ml):
  1. Agregar 10ml de buffer de lisis al 10X y 80ml de agua destilada.
  2. Mezclar la solución por medio de inversión lenta y aforar a 100ml con agua destilada.
  3. Si no se va a utilizar inmediatamente, almacenarlo a 4 °C hasta por 2 semanas.

### **X.2 Anexo 2: Desarrollo del protocolo para la purificación de oligonucleótidos**

#### Soluciones stock:

- ♦ Acrilamida/bisacrilamida al 25% (para 500ml)
  1. Mezclar 118.75g de acrilamida (grado para secuenciar DNA) y 6.25g de N, N'-metilenbisacrilamida en agua desionizada.
  2. Disolver a 37° C.
  3. Aforar a 500ml y filtrar.
  4. Almacenar en botella ámbar a temperatura ambiente hasta por un mes.  
Nota: Dado que la bisacrilamida es una sustancia neurotóxica, pesarla y manipularla con mucho cuidado, usando guantes y cubre bocas.  
La acrilamida se desamina con luz y álcali para dar ácido acrílico; por tanto, el pH de la solución debe estar a  $\text{pH} \leq 7$  y en la obscuridad.
  
- ♦ Urea (Merck) 7.8M
  
- ♦ TBE (Tris-Borato-EDTA) 10X (para 500ml):
  1. Mezclar 54g de Tris-base, 27.5g de ácido bórico, 20ml de EDTA 0.5M a pH 8.
  2. Ajustar el pH a 8.3
  3. Aforar a 500ml.
  
- ♦ Persulfato de amonio al 10% (para 10ml):
  1. Disolver 1g de persulfato de amonio en 7ml de agua.
  2. Mezclar y aforar a 10ml.

3. Almacenar a 4° C hasta por 2 semanas.

- ♦ TEMED (Tetrametiletilenediamina)  
Biorad No. Cat. 161-0800
  - ♦ n-Butanol (alcohol butílico)  
Merck
- a. **Preparación de gel de acrilamida/bisacrilamida al 20% (a esa concentración migran los colorantes para identificar nucleótidos entre 45 y 12 pb de longitud).**

Para 10ml de solución:

1. Mezclar 8ml de solución acrilamida/bisacrilamida al 25%, 1ml de UREA 7.8M (final 780mM) y 1ml de TBE 10X.
2. Mezclar y agregar 10µl de TEMED 25µl de persulfato de amonio al 10%.
3. Mezclar y utilizar inmediatamente.

**b. Procedimiento para correr el gel:**

1. Ensamblar el equipo para correr el gel con cinco pozos
2. Inyectar lentamente la solución entre las placas de vidrio, cuidando de no formar burbujas en la solución
3. Esperar que solidifique el gel (aproximadamente 5 minutos)
4. Enjuagar los pozos (para liberar de burbujas o pedazos de gel) a presión, inyectando el mismo buffer de TBE 1X en el que se va a correr el gel
5. Cargar 50µg de oligo y 10µl de azul de bromofenol crudo por carril
6. Precalentar el gel a 350v durante 15 minutos aproximadamente
7. Correr el gel a 300v hasta que el azul de bromofenol empiece a salir por el borde inferior del gel (aproximadamente 3 horas)
8. Extraer la banda correspondiente a la longitud del oligo (generalmente la banda de mayor concentración y menor migración, identificada con luz UV (254nm) colocando el gel sobre una placa de sílica fluorescente. Usar lentes protectores contra luz UV
9. Colocar el trozo del gel en un tubo eppendorf de 1.5ml y agregar 1ml de agua desionizada en sistema milliQ
10. Sacar el trozo del gel y concentrar los oligos por evaporación de la solución (2h aproximadamente en savant hasta dejar 100µl)
11. Agregar 1.5ml de nbutanol y agitar fuertemente en vortex durante 30 segundos. Centrifugar a 10000rpm en centrífuga clínica durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante, dejando 100µl de solución.
12. Repetir el paso 7
13. Agregar 1ml de etanol absoluto, con el fin de eliminar el agua, agitar en vortex durante 30 segundos y centrifugar por 3 minutos a 10000rpm. Eliminar el sobrenadante
14. Repetir el paso 7 y secar en savant
15. Disolver el pelet en 115ml de agua desionizada en milliQ
16. Medir absorbancia a 260nm. Tomar como control el agua desionizada que se utiliza para disolver
17. Cálculos para obtener la concentración de los oligos:  
Valores de dilución para medir absorbancia: 5µl de oligo + 495µl de agua.  
1 OD<sub>260</sub> ≈ 33 µg de oligonucleótido en 1ml; o sea, 1 OD<sub>260</sub> ≈ 33 µg/ml

Entonces:

$$x \text{ OD}'_{s_{260}} = y \text{ } \mu\text{g en } 1000\mu\text{l de solución} \\ [\text{mg/ml}] = (z \text{ } \mu\text{g en } 500\mu\text{l de solución})/3\mu\text{l de oligo}$$

### **X.3 Anexo 3: Preparación de soluciones para la determinación de carbonilos**

- ◆ **Ácido clorhídrico 2M (para 100ml):**
  1. Añadir lentamente dentro de campana de extracción 7.3ml de HCl concentrado y 80ml de agua desionizada.
  2. Mezclar cuidadosamente.
  3. Aforar a 100ml.
  
- ◆ **2, 4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10mM (para 20ml):**
  1. Disolver 0.04g de DNPH en 15ml de HCl.
  2. Mezclar cuidadosamente.
  3. Aforar a 20ml
  
- ◆ **Ácido tricloroacético al 20% (para 20ml):**
  1. Mezclar 4ml de ácido tricloroacético y 16ml de agua desionizada
  
- ◆ **Guanidina 6M con fosfato de potasio 20mM (para 20ml):**
  1. Disolver 11.46g de guanidina y 0.054g de fosfato de potasio en 15ml de agua.
  2. Ajustar pH a 2.3 con ácido trifluoroacético.
  3. Mezclar con agitador magnético y ligero calentamiento y aforar a 20ml.
  4. Mantener a 4° C si no se va a usar inmediatamente y usar en un periodo máximo de una semana.
  
- ◆ **Solución etanol absoluto: acetato de etilo (1:1)**  
Para 100ml:
  1. Mezclar 50ml de etanol absoluto y 50ml de acetato de etilo.
  2. Usar el mismo día de preparación.

### **X.4 Anexo 4: Preparación de soluciones para el cultivo de fibroblastos**

- ◆ **Gelatina al 0.1% (opcional)**  
Para 100ml:
  1. Agregar 100mg de gelatina en polvo en 100mg de agua.
  2. Disolver completamente el sólido, en baño maría a 37° C durante 15 minutos aproximadamente.
  3. Esterilizar la solución con filtro de membrana de tamaño de poro 0.22  $\mu\text{m}$ .
  4. Agregar 4 ml de la solución a cada caja petri estériles desechables de 100 x 20 mm, cuidando que el volumen cubra toda la superficie de la caja.
  5. Dejar las cajas en reposo, dentro de la campana de flujo laminar, durante 2 horas aproximadamente, (si está prendida la luz uv, dejar las cajas abiertas).
  6. En caso de no utilizar las cajas en es momento, almacenarlas a 4° C, selladas con parafilm y cubiertas con papel aluminio.
  
- ◆ ***Dulbecco's Modified Tagle Medium* (DMEM Gibco 12100-046)**  
Para 1L:
  1. Agregar el medio en polvo en 800 ml de agua de calidad para cultivo.

2. Recuperar todo el polvo que contiene el empaque arrastrándolo con agua sobre el vaso de precipitado. Agitar suavemente.
  3. Agregar 3.7g de  $\text{NaHCO}_3$ .
  4. Ajustar el pH a 0.2-0.3 unidades por abajo del pH de trabajo (pH 7) ya que, usualmente, el pH sube de 0.1-0.3 con el proceso de filtración.
  5. Aforar el medio a 1L.
  6. Esterilizar inmediatamente con membrana de filtración de  $0.22\mu\text{m}$ .
  7. Alicuotar en frascos de 100ml y 250ml.
  8. Almacenar a  $-20^\circ\text{C}$  si se va a usar en un periodo mayor de 2 meses; si no es así, almacenar a  $4^\circ\text{C}$ .
- ◆ Suero Fetal Bovino (SFB Gibco 16000-044)
    1. Inactivar el suero a  $56^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.
    2. Alicuotarlo en 10ml y 50 ml.
    3. Rotular el frasco como SFBi + fecha.
    4. Almacenar a  $-20^\circ\text{C}$ .
    5. Después de usarlo, almacenar a  $4^\circ\text{C}$  hasta por un mes.
  - ◆ Solución EDTA 0.02% en PBS 1X
 

Para 100ml:

    1. Disolver 0.02g de EDTA en 100ml de PBS 1X.
    2. Filtrar en membrana  $0.22\mu\text{m}$  y almacenar a  $4^\circ\text{C}$ .
  - ◆ Tripsina 2.5% 10X (Gibco 15090-046)
    1. Disponer tripsina al 2.5% en alícuotas de 1.5ml y almacenarlas a  $-20^\circ\text{C}$ .
    2. Descongelar una alícuota a  $4^\circ\text{C}$  y diluirla al 0.25% en verseno 1X (**Gibco 15040-066**), o en su defecto, diluirla en una solución de EDTA 0.02% EN PBS.
    3. Almacenar a  $4^\circ\text{C}$  hasta por un mes.
  - ◆ Phosphate – Buffered Saline (PBS 1X)
 

Para 250ml:

    1. Agregar 2.0g de NaCl, 0.05g de KCl, 0.36g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.06g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 200ml de agua destilada. Disolver un soluto después de otro.
    2. Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1N.
    3. Aforar la solución a 250ml.
    4. Esterilizar por filtración con membrana  $0.22\mu\text{m}$  y almacenar a temperatura ambiente hasta por 2 meses.

#### a) Congelación de células

1. Aspirar el medio de cultivo.
2. Lavar las células 2 veces con PBS 1X y aspirar.
3. Incubar con 0.5ml de tripsina al 0.25% durante 5min a temperatura ambiente.
4. Agregar 4.5ml de DMEM suplementado.
5. Centrifugar a 3500rpm durante 5 min.
6. Resuspender en 1ml con DMEM suplementado.
7. Tomar una alícuota y contar en la cámara de Neubauer.
8. Etiquetar con el nombre de la línea, número de pase, cantidad de células y fecha.
9. Resuspender en la mitad del volumen requerido para obtener una densidad de  $1-3 \times 10^6$  células /ml.

10. Agregar gradualmente (muy lentamente por la pared) un volumen de medio para congelar 2X.
11. Alicuotar rápidamente en viales de congelación. Agregar 1ml de la suspensión celular por vial.
12. Transferir los viales de congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 h.
13. Almacenar en el tanque de nitrógeno líquido.

**b) Descongelación de células:**

1. Sacar el vial de congelación de las células requeridas del tanque de nitrógeno líquido y transferirlo inmediatamente a un baño de agua de cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Esperar a que el vial se descongele (de 1 a 2 minutos) y transferir la suspensión celular a un tubo falcon estéril de 15 ml. Agregar 5 ml de medio DMEM, muy lentamente por la pared del tubo.
3. Mezclar gentilmente por inversión.
4. Centrifugar las células a 35000 rpm por 5 min.
5. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en el medio apropiado y a la densidad requerida (al menos 100,000 células en un plato de 10 cm de diámetro).

**X.5 Anexo 5: tinción de células para detectar actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia**

- ◆ Phosphate – Buffered Saline (PBS 1X)  
Para 250ml:
  1. Agregar 2.0g de NaCl, 0.05g de KCl, 0.36g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 0.06g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 200ml de agua desionizada. Disolver un soluto después de otro.
  2. Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1N.
  3. Aforar la solución a 250ml.
  4. Esterilizar por filtración con membrana  $0.22\mu\text{m}$  y almacenar a temperatura ambiente hasta por 2 meses.
- ◆ Solución fijadora formaldehído 2%/0.2% glutaraldehído ó Paraformaldehído (PFA) (Sigma P6148-500G) al 4%.  
Para 10 ml:
  1. USAR GUANTES Y CUBREBOCAS.
  2. Disolver 0.4 g de PFA en 4ml de agua desionizada.
  3. Calentar entre  $60-70^{\circ}\text{C}$  en campana de extracción.
  4. Agregar 10  $\mu\text{l}$  de NaOH 10 N y dejar enfriar dentro de la campana.
  5. Agregar 5 ml de PBS 2X.
  6. Ajustar el pH a 7.2 con HCl.
  7. Aforar a 10 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada.
  8. Filtrar con membrana de  $0.22\mu\text{m}$ .
  9. Almacenar en alícuotas de 10ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta por 2 semanas.

**Soluciones stock para la solución de tinción:**

- ◆ N,N-Dimetilformamida (DMF)  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$  (RESEARCH ORGANICS INC. 2147D)  
Advertencia: Es altamente tóxico y puede ser carcinógeno, es fácilmente absorbido por la piel.

- ◆ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside (X-gal) 20 mg/ml (RESEARCH ORGANICS INC. 1178B)  
Para 10ml:
  1. Utilizar guantes y cubrebocas, ya que el DMF y el X-gal pueden ser absorbidos por la piel.
  2. Disolver 200mg de (X-gal) en 8ml de DMF en campana de extracción.
  3. Mezclar.
  4. Aforar a 10ml con DMF.
  5. Almacenar a  $-20^{\circ}$  C hasta por un par de semanas.
  
- ◆ Ácido cítrico monohidratado ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) 0.1M (J. T. BAKER 0110200)  
Para 100ml
  1. Usar bata, guantes y cubre bocas, ya que es altamente irritable.
  2. Disolver, en campana de extracción, 2.1g de ácido cítrico en 80ml de agua desionizada.
  3. Mezclar
  4. Aforar a 100ml.
  5. Almacenar a temperatura ambiente hasta por un par de semanas.
  
- ◆ Solución de fosfato de sodio dibásico anhidro ( $Na_2HPO_4$ ) 0.2M (SIGMA S-0876)  
Para 100ml:
  1. Usar bata, guantes y cubre bocas, ya que puede ser irritable al inhalar y al contacto con la piel.
  2. Disolver, en campana de extracción, 2.84g de fosfato de sodio en 80ml de agua desionizada.
  3. Mezclar.
  4. Aforar a 100ml.
  5. Almacenar a temperatura ambiente hasta por un par de semanas.
  
- ◆ Solución ácido cítrico/ buffer de fosfato de sodio 0.2M a pH 6  
Para 100ml:
  1. Mezclar 36.85ml de solución de ácido cítrico 0.1M (final 0.04M) con 63.15ml de solución de fosfato de sodio 0.2M.
  2. Ajustar el pH a 6 (ES MUY IMPORTANTE EL PH).
  
- ◆ Ferrocianuro de potasio 100mM  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  (J.T. BAKER 3114-01)  
Para 10ml:
  1. Usar guantes, bata y cubre bocas, ya que puede ser irritante.
  2. Disolver 422mg de ferrocianuro de potasio en 8ml de agua desionizada.
  3. Mezclar.
  4. Aforar a 10ml.
  5. Almacenar a temperatura ambiente hasta por un par de semana.
  
- ◆ Cloruro de sodio 5M NaCl(J.T. BAKER 3624-01)  
Para 10ml:
  1. Usar guantes, ya que puede causar irritación al contacto con la piel.
  2. Disolver 2.922g de cloruro de sodio en 8ml de agua desionizada.
  3. Mezclar.
  4. Aforar a 10ml.

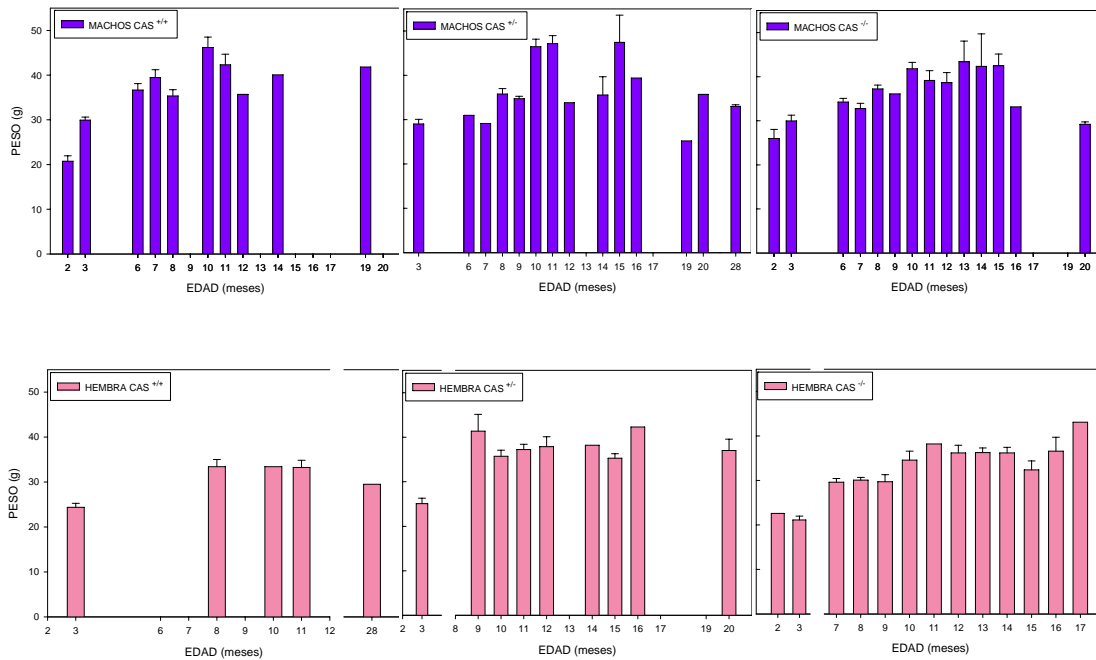
5. Almacenar a temperatura ambiente hasta por un par de semanas.

◆ Cloruro de magnesio 1M (RESEARCH ORGANICS INC. 0090M)

Para 50ml

1. Usar bata, guantes y cubre bocas, ya que puede causar irritación al ser inhalado.
2. Disolver 10.17g de cloruro de magnesio en 40ml de agua desionizada.
3. Mezclar.
4. Aforar a 50ml.
5. Almacenar a temperatura ambiente hasta por un par de semanas.

**X.6 Anexo 6: Peso corporal de ratones machos y hembras  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$**





**Figura 15.** Pesos corporales de animales mutantes machos (barras azules) y hembras (barras rosas)  $Cas^{+/+}$ ,  $Cas^{+/-}$  y  $Cas^{-/-}$  de diferentes edades. Se grafican en el eje  $x$  la edad (en meses) y en el eje  $y$  el peso corporal (en meses) de los individuos. Cada barra representa el promedio del peso corporal de  $n$  animales  $\pm$  desviación estándar. No se realizó análisis estadístico por dos razones; la primera de ellas es que en ciertas edades existen datos de pesos corporales sólo de uno o dos genotipos; y la segunda es que la  $n$  variaba desde 2 hasta 16. En general no se notan diferencias relevantes en los pesos corporales de los ratones mutantes de la catalasa con respecto a los silvestres en edades tempranas y medias; sin embargo, aproximadamente a los 20 meses de edad el peso corporal de los ratones machos mutantes de la catalasa es ligeramente menor que el de los silvestres. Sería útil hacer un seguimiento de la determinación de los pesos corporales en una población de animales con al menos  $n > 4$  para cada edad  $y$ , por supuesto, para cada genotipo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn, S.H.; Cheung, W.L.; Hsu, J.Y.; Diaz, R.L.; Smith, M.M.; and Allis, C.D. 2005. Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell*, **120**: 25–36.

Beausujour, C.M; Krtolica, A.; Galimi, F.; Narita, M.; Lowe, S.W.; Yaswen, P.; and Campisi, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of p53 and p16 pathways. *EMBO J.*, **22**: 4212-4222.

Beckman, K.B. and Ames, B.N. 1998. The free radical theory of aging matures *Physiological Reviews*, **78**: 547–581.

Benanti, J.A. and Galloway, D.A. 2004. Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Mol. Cell.Biol.*, **24**: 2842-2852.

Berrigan, D.; Perkins, S.; Haines, D.C. and Hursting, S. 2002. Adult-onset calorie restriction and fasting delay the spontaneous tumorigenesis in p53-deficient mice. *Carcinogenesis*, **23**: 817-822.

Brookes, S.; Rowe, J.; Ruas, M.; Llanos S.; Clark, P.A.; Lomax, M.; James, M.C.; Vatcheva, R.; Bates, S. and Vousden, K.H. 2002. INK-4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *EMBO J.*; **21**: 2936-2945.

Brunet, A.; Sweeney, L.B.; Sturgill, J.F.; Chua, K.F.; Greer, P.L.; Lin, Y.; Tran, H.; Ross, S.E.; Mostoslavsky, R. and Cohen, H.Y. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, **303**: 2011–2015.

Butterfield, D. A.; Drake, J.; Pocemich, Ch.; and Castegna A. (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends in Molecular Medicine*, **7**: 548–554.

Calabrese, V.; Scapagnini, G.; Giuffrida Stella, A. M., Bates, T. E.; & Clark, J. B. 2001. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochemical Research*, **26**: 739-764.

Campisi, J. 2005. Senescent cells, tumor supresión, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, **120**: 513-522.

Carlsson, L.M.; Jonsson, J.; Edlund, T.; and Marklund, L. 1995. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **92**: 6264-6268.

Chang, Sandy; Multan, Asha S.; Cabrera, Noelia G.; Naylor, Maria L.; Laud, Purnima; Lombard, David; Pathak, Sen; Guarente, Leonard;& DePinho, Ronald A. 2004; Essential

role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nature genetics*, **36**: 877-882.

Chen, Qin; and Ames, Bruce N. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 4130-4134.

Chen, Q.; Fischer, A.; Reagan, J. D.; Yan, L. J.; Ames, B. N. 1995. Oxidative damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4337– 4341.

Cheng, W.H.; Fu, Y. X.; Porres, J. M.; Ross, D. A.; and Lei, X. G. 1999. Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *The FASEB Journal*, **13**: 1467-1475.

Cheung, W.L.; Ajiro, K.; Samejima, K.; Kloc, M.; Cheung, P.; Mizzen, C.A.; Beeser, A.; Etkin, L.D.; Chernoff, J.; Earnshaw, W.C.; and Allis, C.D. 2003. Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, **113**: 507–517.

Chong, Z.Z.; Li, F.; and Maiese, K. 2005. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog. Neurobiol.*, **75**: 207–246.

Dillin, Andrew; Hsu, Ao-Lin; Arantes-Oliveira, Nuno; Lehrer-Graiwer, Joshua; Hsin, Honor; Fraser, Andrew G.; Kamath, Ravi S.; Ahringer, Julie; and Kenyon, Cynthia. 2002. Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial Function During Development *Science*, **298**: 2398–2401.

Dimri, Goberdhan P; Lee, Xinhua; Basile, George; Acosta, Meileen; Scott, Glynis; Roskelley, Calvin; Medrano, Estela E.; Linskens, Maarten; Rubelj, Ivica; Pereira-Smith, Olivia; Peacocke, Monica; and Campisi, Jutith. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**: 9363-9367.

Duan, Wenzhen; Guo, Zhihong; Jiang, Haiyang, Jiang; Ware, Melvin; and Mattson, Mark P. 2003. Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*, **144**: 2446-2453.

Duan Jianming; Duan Jianping; Zhang Zongyu; and Tong Tanjun. 2005. Irreversible cellular senescence induced by exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; **37**: 1407-1420.

Echtay, Karim S.; Roussel, Damien; St-Pierre, Julie; Jakobsons, Mika B.; Cadenas, Susana; Stuart, Jeff A.; Harper, James A.; Roebuck, Stephen J.; Morrison, Alastair; Pickering,

Susan; Clapham, John C.; and Brand, Martin D. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, **415**: 96–99.

Faraci, F. M.; M. L. Modrick, C. M. Lynch, L. A. Didion, P. E. Fegan; and S. P. Didion. 2006. Selective cerebral vascular dysfunction in Mn-SOD-deficient mice *J Appl Physiol.*, **100**: 2089-2093.

Finkel, Toren and Holbrook, Nikki J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**: 239–247.

Fridovich, Irwin. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, **201**: 1203–1209.

Giannakou, M.E.; Goss, M.; Junger, M.A.; Hafen, E.; Leivers, S. J.; and Partridge, L. 2004. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science*, **305**: 361.

Guarante, Leonard. (2005). Calorie restriction- the sir2 connection. *Cell*, **120**: 473-482.

Grinnell Frederick. 2003. Fibroblast biology in three dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biology*, **13**: 264-269.

Harman, Denham. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, **2**: 298-300.

Harvey, K.F.; Pflieger, C.M.; and Hariharan, I.K. 2003. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, **114**: 457–467.

Hayflick, Leonard. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614-636.

Hermes –Lima, Marcelo. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals *Functional Metabolism: Regulation and adaptation*, edited by Kenneth B. Storey ,Cap. **12**: 319-368.

Hlavata, L.; Aquilaniu H.; Pichova, A.; Nystrom, T. 2003. The oncogenic RAS2val19 mutation locks respiration, independently of PKA, in a mode prone to generate ROS. *EMBO J.*, **22**, 3337–3345.

Ho, Ye-Shih; Xiong, Ye; Ma, Wanchao; Spector, Abraham; and S. Ho Dorothy. 2004. Mice lacking catalase develop normal but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**: 32804-32812.

Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P. and Le Bouc, Y. 2003. *Nature (London)*, **421**: 182–187.

Hornsby P.J. 2002. Cellular senescence and tissue aging in vivo. *J Gerontol A Biol. Sci Med*, **57**:B251-B256.

Hornsby P.J. 2003 Mouse and human cells versus oxygen. *Sci Aging Knowledge Environ*, **30**: PE21.

Hornsby P.J. 2003. Replicative senescence of human and mouse cells in culture: significance for aging research.. *Mech Ageing Dev.*, **124**: 853-855.

Howitz, Konrad T.; Bitterman, Kevin J.; Cohen, Haim Y.; Lamming, Dudley W.; Lavu, Siva; Word, Jason G.; Zipkin, Robert E.; Cheng, Phuong; Kisielewski, Anne; Zhang, Li-Li; Scherer, Brandy & Sinclair, David A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, **425**: 191-196.

Hursting, S.D; Lavingne, J.A.; Berrigan, D.; Perkins, S.N; and Barret, J.C. 2003. Calorie restriction, aging and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu.Rev.Med.*, **54**: 131-152.

Itahana, K.; Dimri, G., and Campisi, J. 2001. Regulation of cellular senescence by p53 *Eur. J. Biochem*, **268**: 2784-2791.

Johnson, F. Brad; Sinclair, David A.; and Guarante, Leonard. 1999. Molecular biology of aging. *Cell*, **96**: 291-302.

Judy B. de Haan, Bladier, Cécile; Griffiths, Peter; Kelneri, Michael; D. O'Shea, Ross; Cheung, Nam Sang; Bronson, R. T.; Silvestro, Mary J.; Wild, Steven; Zheng, Shao Shan; Beart, Philip M.; Hertzog, Paul J.; and Kola, Ismail. 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *JBC*, **273**: 22528–22536.

Judy B. de Haan; Bladier, Cecile; Lofti-Miri, Mehrnoush; Hutchinson, Paul; Crack, Meter J.; Hertzog, Paul; and Kola, Ismail. 2004. Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated cell death. *Free Radical Biology & Medicine*, **36**: 53-64.

Kaeberlein, M.; McVey, M.; and Garante, L. 1999. The SIR2/3/4 complex & sir2 alone promote longevity in *S.cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.*, **13**: 2570-2580).

Kaler, L.W.; Glissman Gleissman, P.; Hess, D. L.; Hill, J. 1986. The androgen status of aging male rhesus macaques. *Endocrinology* **119**, 566-571.

Keilin, D. and Hartree, F. 1945. Properties of catalase. Catalysis of couple oxidation of alcohols *Biochem.*, **39**: 293–301.

Keyer, Kay; Strohmeier, Amy; and Imlay, James A. 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *Journal of Bacteriology*, **177**: 6782–6790.

Kenyon, Cynthia. (2005). The plasticity of aging: Insights from long-lived mutants. *Cell*, **120**: 449-460.

Kershaw, Erin E. and Flier, Jeffrey S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **89**: 2548-2556.

Kipling, David; Davis, Terence; Ostler, Elizabeth L.; Faragher, Richard G.A. 2004. What can progeroid syndromes tell us about human aging?. *Science*, **305**: 1426-1431.

Konigsberg, Mina; López-Diazguerrero Norma E.; Aguilar, María C.; Ventura, José L.; Gutiérrez-Ruiz María C.; and Zentella, Alejandro. 2004. Senescent phenotype achieved in vitro is indistinguishable, with the exception of Bcl-2 content, from that attained during the in vivo aging proces. *Cell Biology International*, **28**: 641-651.

Kops, G.J.; Dansen, T.B.; Polderman, P.E.; Saarloos, I.; Wirtz, K.W.; Coffey, P.J.; Huang, T.T.; Bos, J.L.; Medema, R.H.; and Burgering, B.M. 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. **419**: 316–321.

Krtolica, A.; and Campisi, J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**: 1401-1414.

Lane, M.A.; Ingram, D. K.; Ball, S. S.; Roth, G. S. 1997a. DHEAS: A biomarker of primate aging slowed by calorie restriction. *J. Clin. Endo. Metab.*, **82**: 2093-2096.

Lane, MA.; Ingram, D.K & Roth, G.S. 1999. Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. *Toxicological Sciences*, **52**: 41-48.

Lebel, M. & Leder, P. A deletion within the murine Werner syndrome helicase induces sensitivity to inhibitors of topoisomerase and loss of cellular proliferative capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13097–13102 (1998).

Lee, Cheol-Koo; Weindruch, Richard, & Prolla, Tomas. 2000. A. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature Genetics*, **25**: 294–297.

Lebovitz, Russell M.; Zhang, Heju; Vogel, Hannes; Cartwright, Joiner Jr.; Dionne, Lianna, Lu, Naifang, Huang, Shiu; and Matzuk, Martin M.. 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 9782-9787.

Cheol-Koo, Lee; Klopp, Roger G.; Weindruch, Richard; and Prolla, Tomas A. 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science*, **285**, 1390–1393.

Lee, S. S.; Lee, Raymond Y.N.; Fraser, Andrew G.; Kamath, Ravi; Ahringer, Julie & Ruvkun, Gary. 2003. *Nature Genet* A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity, **33**: 40–48.

Lee, S.S., Kennedy, S., Tolonen, A.C., and Ruvkun, G., 2003. DAF-16 target genes that control *c.elegans* life-span and metabolism. *Science*, **300**: 644-647.

Lehtinen, Maria K.; Zengqiang, Yuan; Boag, Meter R.; Yue, Yang; Villén, Judit; Becker, Esther B.E.; DiBacco, Sara, De la Iglesia, Núria; Gygi, Steven; Blackwell, T. Keith; and Ovni, Azad. 2006. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*, **125**: 987-1001.

Lehtinen, María K.; Yuan, Zengqiang; Boag, Meter R.; Villén, Judit; Becker, Esther B. E.; DiBacco, Sara; De la Iglesia, Nuria; Gygi, Steven; Blackwell, Keith; and Azad, Ovni. 2006. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extendí life span. *Cell*, **125**: 987-1001.

Lin K., Dorman, J.B., Rodan, A. and Kenyon, C. 1997. *daf-16*: an HNF-3/forkhead family member that can function to double the life span of *c. Elegans*. *Science* **278**(5352):1319-1322.

Lin, Su-Ju; Defossez, Pierre-Antoine; Guarente, Leonard. 2000. Requirement of NAD and *SIR2* for Life-Span Extension by Calorie Restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **289**: 2126-2128.

Lin, Su-Ju, Kaeberlein, Matt; Andalis, Alex A.; Sturtz, Lori A.; Deffossez, Pierre-Antoine; Culotta, Valeria C.; Fink, Gerald R.; Guarante, Leonard. 2002. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*, **418**: 344-348.

Lombard, D.B. *et al.* Mutations in the WRN gene in mice accelerate mortality in a p53-null background. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3286–3291 (2000).

Lowry, Oliver H.; Rosebrough Nira J.; Farr, A. Lewis; and Randall, Rose J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.

Lundberg, A.S, Hahn, W.C., Gupta, P., and Weinberg, R.A. 2000. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**: 705-709.

Luo Jianyuan Luo, Anatoly Y. Nikolaev, Shin-ichiro Imai, Delin Chen, Fei Su, Ariel Shiloh, Leonard Guarente and Wei Gu. 2001. Negative Control of p53 by Sir2 $\alpha$  Promotes Cell Survival under Stress. *Cell*; **107**: 137-148.

Lynn, Stephen; Huang, Eric J.; Elchuri, Sailaja; Mohammed, Naeemuddin; Nishinaka, Yumiko; Yodoi, Junji; Ferriero, Donna M.; Epstein, Charles J.; Huang, Ting-Ting. 2005. Selective neuronal vulnerability and inadequate stress response in superoxide dismutase mutant mice. *Free Radical Biology & Medicine*, **38**: 817–828.

- Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M., and Scoble, H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.*, **18**: 306-319.
- Masaro, E.J., Yu, B.P., & Bertrand, H.A. 1982. Action of food restriction in delaying the aging process Proc.Natl. Acad. Sci. USA 79, 4239-4241.
- Masaro, E.J. 1984. Nutrition as a modulator of the aging process. *Physiologist*, **27**: 98-109.
- Mattson, Mark P. 2003. Gene-diet interactions in brain aging and neurodegenerative disorders. *Ann. Intern. Med.*, **139**: 441-444.
- Melov, S.; Ravenscroft, J.; Malik, S.; Gill, M.S.; Walker, D. W.; Clayton, P.E.; Wallace, D.C.; Malfroy, B.; Doctrow, S. R.; & Lithgow, G. J. 2000. Extension of life-span with Superoxide Dismutase/Catalase mimetics. *Science* **289**, 1567-1569.
- Mikhail V. Blagosklonny. (2006). Aging and immortality, Quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition. *Cell Cycle*, **5**: 2087-2102.
- Motta, Maria Carla; Divecha, Nullin; Lemieux, Medeleine; Kamel, Christopher; Chen, Delin; Gu, Wei; Bultsma, Yvette; McBurney, Michael; and Guarante Leonard. 2004, Mammalian sirt1 represses forkhead transcription factors *Cell*, **116**: 551-563.
- Murakami, S.; Tudesco, Patricia M.; Cypser, James R.; and Johnson, Thomas E- 2000. Molecular genetic mechanisms of lifespan manipulation in *Caenorhabditis elegans*. *Ann. NY Acad. Sci.*, **908**: 40-49.
- Narita, M., and Lowe, S.W. 2004. Executing cell senescence. *Cell Cycle*, **3**: 244-246.
- Nemoto, Shino and Finkel, Toren. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. 2002. *Science.*, **295**: 2450-2452.
- Nemoto, Shino; and Finkel, Toren. 2004. Ageing and the mystery at Arles, *Nature*, **429**: 149-152.
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S. Patterson, G. I., Lee, L. Tissenbaum, H. A., and Ruvkun, G. 1997. The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *c. Elegans*. *Nature*, **389**: 994-999.
- Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S. W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., and Cunha, G.R. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.*, **59**: 5002-5011.
- Oshino, Nozumo; Oshino, Reiko; and Chance, Britton. 1973. The characteristics of the "peroxidatic" reaction of catalase in ethanol oxidation. *Biochem J.*, **131**: 555-567.



Park, C.C., Bissell, M.J., and Barcellos-Hoff, M.H. 2000. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol. Med. Today*, **6**: 324-329.

Parrinello S., Samper E., Goldstein J., Krtolica A, Melov S, & Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative life span of murine cells. *Nat. Cell. Biol.*, **5**: 741-747.

Parrinello, S., Coppe, J. P., Krtolica, A., Melov, S., and Campisi J. 2005. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts can alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci*, **118**: 485-496.

Picard, Frédéric; Kurtev, Martin; Cheng, Namjin; Topark-Ngarm, Acharawan; Senawong, Thanaset; Machado de Oliveira, Rita; Leid, Mark; McBurney, Michael W.; and Guarante Leonard. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocyte by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature*, **429**: 771-921.

Rogina, Blanka and Helfand, Stephen L. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *PNAS*, **101**: 15998-16003.

Roberts, Christian K.; Barnard, R. James. 2005. Effects of exercise and diet on chronic disease. *Journal of applied physiology*, **98**: 3-30.

Rohme, Dan. 1981. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **78**: 5009-5013.

Rüdiger Hardeland, Ana Coto Montes , Burkhard Poeggeler Taylor & Francis. 2003. Circadian Rhythms, Oxidative Stress, and Antioxidative Defense Mechanisms. *Chronobiology International*; **20**.

Sampayo, J. N.; Gill, M. S.; and Lithgow, G. J. 2003. Oxidative stress and aging – the use of superoxide dismutase/catalase mimetics to extend lifespan. *Biochemical Society Transactions*, **31**: 1305-1307.

Sauve, A. A., Wolberger, C., Schramm, V. L. & Boeke, J. D. 2006. The Biochemistry of Sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.*, **75**: 435–465.

Sawada, Motoshi; Hayes, Paulette; and Matsuyama, Shigemi. 2003. Cytoprotective membrane-permeable peptides designed from the Bax-binding domain of Ku70. *Nature Cell Biology*, **5**: 352-357.

Schmidt, Kerstin N.; Amstad, Paul; Cerutti, Peter; & Baeuerle Patrick A. 1995. The roles of hydrogen and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Chemistry & Biology*, **2**: 13-22.

Senoo-Matsuda, N.; Hartman, P.S.; Akatsuka, A.; Yoshimura, S.; and Ishii, N. 2003. A complex II defect affects mitochondrial structure, leading to ced-3- and ced-4-dependent apoptosis an aging. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 22031–22036.

Smith, C.D.; Carney, J.M.; Starke-Reed, P.E.; Oliver, C.N.; Stadtman, E. R.; Floyd, R.A.; and Markesbery, W.R. 1991. *Proc.Natl. Acad.Sci.*, **88**: 10540-10543.

Sohal, R.S. & Weindruch, R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science*, **273**: 59-63.

Stern, J.S.; Gades, M.D.; Wheeldon, C.M; and Borchers, A.T. 2001. Calorie restriction in obesity: prevention of kidney disease in roedents. *The Journal of Nutrition*, **131**: 913S-917S.

Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M., and Garofalo, R.S., 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, **292**: 107-110.

Tatar, M., Bartke, A., and Antebi, A. 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299**, 1346-1351.

Tissenbaum, Heidi A. & Guarante Leonard. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; **410**: 227-230.

Tran, Hien; Brunet, Anne; Grenier, Jill M; Datta, Sandeep R; Fornace, Albert J. Jr; DiStefano, Peter S.; Chiang, Lillian W.; Greenberg, Michael E. 2002. DNA repair pathway stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*; **296**: 530-534.

Trifunovic, Aleksandra; Wredenberg, Anna; Falkenberg, Maria; Spelbrink, Johannes N; Rovio, Anja T.; Bruder, Carl E.; Bohlooly-Y, Mohammad; Gidlof, Sebastian; Olfors, Anders; Wilbom, Rolf; Tornell, Jan; Jacobs, Howard T.; & Larsson, Nils-Goran. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, **429**: 417-423.

Tuveson, D.A., Shaw, A.T., Silver, D.P., Jackson, E.L., Chang, S., Mercer, K.L., Grochow, R., Hock, H., Crowley, D. 2004. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell*, **5**: 375-387.

Tyner, S.D.; Venkatachalam, S.; Choi, J.; Jones, S.; Ghebranious, N.; Ingelmann, H.; Lu, X.; Soron, G.; Cooper, B.; Brayton, C. 2002. p53 mutant mice that display early eaging-associated phenotypes. *Nature*, **415**: 45-53.

Valenzano, Dario R.; Terzibasi, Eva; Genade, Tyrone; Cattaneo, Antonio; Domenici, Luciano; and Callarino, Alessandro. 2006. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current Bioogy*, **16**: 296–300.

Vanfleteren, J.R. 1993. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.*, **292**: 605–608.

Vaziri Homayoun Vaziri, Scott K. Dessain, Elinor Ng Eaton, Shin-Ichiro Imai, Roy A. Frye, Tej K. Pandita, Leonard Guarente and Robert A. Weinberg. 2001 *hSIR2SIRT1* Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase. *Cell* **107**, 149- 159.

Weindruch R, Walford RL. 1988. [BOOK] *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction.*

Westrich J.; Zefa, Corbis; Spinney, L. 2006. Eat your cake and have it. *Nature*; **441**: 807-809.

Williams, Melissa D.; Van Remmen, Holly; Conrad, Craig C.; Huang, Ting Ting; Epstein, Charles J.; and Richardson, Arlan Increased. 1998. Oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *JBC*, **273**: 28510–28515.

Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M & Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, **430**: 686-689.

[Wu Z](#), [Smith JV](#), [Paramasivam V](#), [Butko P](#), [Khan I](#), [Cypser JR](#), [Luo Y](#). 2002. Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Biol.*; **48**(6): 725-731.