



Metabolismo Lipídico de Fibroblastos Senescentes

Lic. Inés Marmisolle

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Setiembre 2022

Metabolismo Lipídico de Fibroblastos Senescentes

Lic. Inés Marmisolle

Tribunal

Dra. Leonor Thomson

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Dr. Álvaro Díaz

Facultad de Química – Universidad de la República

Dra. Ana Rey

Facultad de Química – Universidad de la República

DIRECTORA: Dra. Celia Quijano

Facultad de Medicina – Universidad de la República

CO-DIRECTORA: Dra. Ana Denicola

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

AGRADECIMIENTOS

A Celia, por su continua orientación y disposición para guiarme durante el desarrollo de esta Tesis. Por todos sus consejos, aportes y su constante motivación. Su esfuerzo y apoyo han sido fundamentales para que este proyecto culmine. Por reunir a las mejores compañeras de senescencia, Jenny y Dome.

A Ana, que se incorporó al grupo con mucho entusiasmo, por su disposición y todos sus aportes para el desarrollo de la Tesis.

A Rafael Radi, por el espacio en el CEINBIO y por generar instancias muy enriquecedoras de intercambio y discusión.

A todas las personas que han colaborado y apoyado en distintas etapas de este proyecto: Carlos Escande, Mariana Bresque, Laura Castro, Santiago Mansilla, Jennyfer Martínez, Mauricio Mastrogiovanni y Andrés Trostchansky.

A los integrantes del tribunal: Álvaro Díaz, Ana Rey y Leonor Thomson por su tiempo y disposición para la evaluación de esta Tesis.

A mi madre, sin ella nunca hubiera llegado a esta etapa y a mi hermana que es el mejor ejemplo a seguir.

A Franco, por aguantar muchas horas de trabajo en casa y porque su sonrisa borra cualquier experimento frustrado de la cabeza.

A Laura y Adriana, que junto con Celia generan hermosos espacios para discutir sobre mitocondria y ciencia, y a todos los que participan: Dome, Jenny, Marti, Santi y Pilar.

A todos mis compañeros de trabajo, que siempre con la mejor voluntad estuvieron dispuestos a colaborar y que además generan un maravilloso ambiente de trabajo.

A mis amigas/os que el doctorado me dio, por todos los momentos compartidos adentro y fuera del laboratorio. Su apoyo en momentos difíciles ha sido fundamental para poder sobrellevarlos, las tías: Flo, Gabi, Jenny, Mechi y Pati, y al resto del “*Call Center*” y adeptos: Mauri, Nico, Nikito y Santi.

A mis amigas de toda la vida: Flor, Jime, Nati, Pame y Xime por su apoyo y acompañamiento.

A las agencias que financiaron el trabajo: PEDECIBA Química, ANII, CAP, CSIC.

Metabolismo Lipídico de Fibroblastos Senescentes

Lic. Inés Marmisolle

Tesis de Doctorado

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Año 2022

DIRECTORA: Dra. Celia Quijano

Facultad de Medicina – Universidad de la República

CO-DIRECTORA: Dra. Ana Denicola

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

RESUMEN

La senescencia celular se caracteriza por el cese de la proliferación, activación de la respuesta al daño al ADN (DDR), aumento de tamaño celular, actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -Gal) y secreción de factores proinflamatorios. Aunque se han reportado diversas alteraciones metabólicas asociadas a la senescencia, no existe un consenso sobre los cambios metabólicos que sufre la célula senescente. En este trabajo se realizó un estudio comparativo del metabolismo lipídico de fibroblastos humanos en tres modelos de senescencia inducidos por: exposición al oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2), exposición al quimioterápico genotóxico doxorubicina o expresión del oncogén RAS (H-RAS^{G12V}). Se estudió la síntesis y oxidación de ácidos grasos, así como el transporte electrónico y fosforilación oxidativa mitocondrial. También se evaluó la vinculación entre el fenotipo secretor senescente, regulado por NF- κ B, y la función mitocondrial; y se exploró que ocurría con la acetilación de proteínas y la expresión de sirtuinas reguladoras del metabolismo energético.

Los estímulos utilizados indujeron la senescencia en fibroblastos de pulmón humano IMR-90; en los tres modelos se observó la activación de la DDR, el cese de la proliferación celular

y el aumento en la actividad SA- β -Gal. En los modelos de senescencia inducida por daño al ADN (por H₂O₂ o doxorubicina) el fenotipo secretor senescente (SASP) fue muy débil o se encontró ausente y las células presentaron una activación transitoria de la DDR, a diferencia de lo encontrado en la senescencia inducida por el oncogén RAS donde las células presentaron un fuerte fenotipo secretor y una activación permanente de la DDR.

Nuestros resultados mostraron que la síntesis lipídica disminuye en la senescencia celular. Sin embargo, los mecanismos que sostienen la inhibición de la síntesis lipídica difieren según el estímulo inductor de la senescencia. En la senescencia inducida por el oncogén RAS fue mediada principalmente por la activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK), que fosforiló e inhibió a la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1), la enzima que cataliza el primer paso de la vía. Mientras que en los modelos de senescencia por daño al ADN la inhibición de la vía se acompañó del descenso de los niveles de la enzima ACC1 asociados a un descenso en los niveles del ARNm de ACC1.

Por otra parte se observaron diferencias en el catabolismo de ácidos grasos en los distintos modelos de senescencia celular. Por un lado, las células senescentes por expresión del oncogén RAS presentaron un aumento en la β -oxidación mientras que en las células senescentes por daño al ADN se vio una disminución en la vía. Para profundizar en el estudio del catabolismo celular se estudió el consumo de oxígeno mitocondrial. Se encontró que las células senescentes por expresión del oncogén RAS presentaban un aumento en la respiración basal, ATP-dependiente, ATP-independiente y máxima; así como en el índice de control respiratorio (RCR), capacidad de reserva y eficiencia de acople, con respecto a células control no senescentes. Por otra parte, en los modelos de senescencia inducida por daño al ADN, no se observó un aumento de los parámetros respiratorios y se notó un descenso en el RCR y en la eficiencia de acople, en relación a las células control. Estos resultados fueron confirmados en fibroblastos de piel (BJERRAS) que expresan H-RAS^{G12V} fusionado a un dominio del receptor de estrógeno. En estas células se observó una correlación temporal entre el aumento de los parámetros respiratorios, la activación de la DDR, la activación de AMPK, la presencia de SASP y niveles de p65 (componente NF- κ B) al aumentar los niveles de H-RAS^{G12V}.

Para evaluar la vinculación entre el SASP y el catabolismo celular se utilizó un inhibidor de la quinasa IKK, que inhibe la translocación al núcleo y activación de NF- κ B. La exposición de las células senescentes por expresión del oncogén RAS a este inhibidor impactó negativamente en la secreción de factores proteicos y en la velocidad de consumo de oxígeno ATP-dependiente. Este resultado sugiere que parte de la alta tasa de consumo de oxígeno destinada a la síntesis de ATP que presentan las células senescentes podría estar destinada a la síntesis y secreción de factores proinflamatorios. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en otros parámetros respiratorios como la respiración basal o máxima.

Por último se evaluaron vías vinculadas a la acetilación de lisinas proteicas. Las células senescentes por expresión del oncogén RAS presentaron alteraciones en el perfil de acetilación. Además, se observó un aumento en los niveles y fosforilación de la enzima ATP-citrato-liasa y una inhibición de la aconitasa mitocondrial, que podrían conducir a un aumento del transporte de acetyl-CoA de la mitocondria al citosol. Al mismo tiempo se observó un aumento en los niveles y la expresión de la sirtuina 6 (SIRT6) en las células senescentes, que podría estar involucrada en la regulación del metabolismo energético.

En suma, nuestros datos muestran que existe heterogeneidad en el metabolismo lipídico y el metabolismo energético de las células senescentes, donde la actividad de las vías depende del estímulo inductor de la senescencia. Además, nuestros resultados sugieren que el aumento en las vías catabólicas observado en la senescencia inducida por H-RAS^{G12V} podría derivar de una activación de la AMPK mediada por la activación persistente de la DDR, y encontrarse vinculada a la síntesis y secreción de factores proinflamatorios.

Lipid Metabolism in Senescent Fibroblasts

Lic. Inés Marmisolle

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

Year 2022

DIRECTOR: Dra. Celia Quijano

Facultad de Medicina – Universidad de la República

CO-DIRECTOR: Dra. Ana Denicola

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

ABSTRACT

Cellular senescence is characterized by permanent growth arrest, activation of the DNA damage response (DDR), senescence associated β -galactosidase activity (SA- β -Gal) and a secretory phenotype. Although several metabolic alterations associated with senescence have been reported, there is no consensus on the metabolic changes that senescent cells undergo. In this work, we performed a comparative study of fatty acid metabolism in human fibroblasts in three models of senescence, with a particular focus on mitochondria. The three stimuli used to induce senescence were: the oxidant hydrogen peroxide (H_2O_2), the chemotherapeutic drug doxorubicin and the expression of RAS oncogene (H-RAS^{G12V}). Fatty acid synthesis and oxidation were studied, as well as mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation. The link between the senescent secretory phenotype,

regulated by NF- κ B, and mitochondrial function was also evaluated; along with protein acetylation and the expression of sirtuins, enzymes that regulate energy metabolism.

The three stimuli induced senescence in IMR-90 human lung fibroblasts; activation of the DDR, proliferation arrest and increase in SA- β -Gal activity were observed. In the models where senescence was induced by DNA damage (by H₂O₂ or doxorubicin), the senescent associated secretory phenotype (SASP) was very weak or absent, and the cells presented a transient activation of the DDR. While in oncogene induced senescence we observed a strong SASP, with a significative increase in the secretion of several cytokines, and a persistent DDR.

Our results show that lipid synthesis decreases in the three models of cellular senescence. However, the mechanisms that support the inhibition of lipid synthesis differ with the senescence-inducing stimulus. In oncogene-induced senescence it was mainly mediated by activation of AMP kinase (AMPK), which phosphorylated and inhibited acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), the enzyme that catalyzes the first step of the pathway. While in senescence models due to DNA damage, the inhibition of the pathway was accompanied by a decrease in the levels of the ACC1 enzyme associated with a decrease in the levels of ACC1 mRNA.

On the other hand, differences were observed in the catabolism of fatty acids between the different models of cellular senescence. Senescent cells due to expression of the RAS oncogene showed an increase in β -oxidation, while senescent cells due to DNA damage showed a decrease in this pathway. To further understand the alteration in cellular catabolism, mitochondrial oxygen consumption was studied. In senescence models induced by DNA damage by H₂O₂ or doxorubicin, no changes in oxygen consumption rates were observed, and a decrease in respiratory control ratio (RCR) and coupling efficiency was noted in relation to control cells. Instead, oncogene induced senescent cells were found to have increased mitochondrial respiration rates, as well a high RCR, reserve capacity and coupling efficiency, with respect to non-senescent control cells. These results were confirmed in skin fibroblasts (BJERAS) expressing H-RAS^{G12V} fused to an estrogen receptor domain. In this model, a temporal correlation was observed between the increase in respiration rates, the activation of the DDR, the phosphorylation and activation of AMPK, the SASP and levels of p65 (NF- κ B component).

To assess the link between SASP and cell catabolism, an IKK kinase inhibitor was used, which inhibits nuclear translocation and activation of NF- κ B. Exposure of oncogene induced senescent cells to this inhibitor negatively affected cytokine

secretion and ATP-dependent oxygen consumption rate. The result suggests that a fraction of the ATP produced by oxidative phosphorylation could be destined to the synthesis and secretion of pro-inflammatory factors.

Finally, pathways linked to the acetylation of protein lysines were evaluated. Senescent cells expressing the RAS oncogene presented alterations in protein lysine acetylation. In addition, an increase in the levels and phosphorylation of the enzyme ATP-citrate-lyase and an inhibition of mitochondrial aconitase were observed, which could lead to an increase in the transport of acetyl-CoA from the mitochondria to the cytosol. At the same time, an increase in the levels and expression of sirtuin 6 (SIRT6) was observed in senescent cells, which could be involved in the regulation of energy metabolism.

In summary, our data show heterogeneity in lipid and energy metabolism of senescent cells, indicating that the activity of the pathways depends on the senescence-inducing stimulus. In addition, our results suggest that differences in the activation of the DDR and AMPK might be behind the observed metabolic diversity.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
INTRODUCCIÓN.....	6
1- Senescencia celular	6
2- La respuesta al daño al ADN (DDR)	7
3- Fenotipo secretor de la célula senescente.....	9
4- Metabolismo lipídico.....	12
4.1- Síntesis de ácidos grasos.....	13
4.2- Oxidación de ácidos grasos.....	16
5- Metabolismo energético mitocondrial	22
5.1- Ciclo de Krebs.....	23
5.2- Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa	24
6- Regulación del metabolismo energético por AMPK	26
7- Regulación del metabolismo energético por Sirtuinas.....	28
8- Metabolismo de la célula senescente.....	30
9- La disfunción mitocondrial induce la senescencia celular	33
OBJETIVOS.....	35
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos y actividades.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
1- Materiales	36
2- Cultivo celular.....	36
3- Inducción de la senescencia por exposición a H ₂ O ₂	36
4- Inducción de la senescencia por exposición a doxorrubicina	36
5- Inducción de la senescencia por expresión del oncogén RAS.....	37
5.1- Transducción de células IMR-90 con lentivirus portadores del plásmido que codifica a H-RAS ^{G12V}	37
5.2- Expresión de la proteína H-RAS ^{G12V} fusionada a un dominio del receptor de la hormona esteroidea (HBD, hormone binding domain) en cultivos de BJERRAS	37
6- Proliferación celular	38
7- Actividad β-galactosidasa asociada a la senescencia	39
8- Ensayos de Inmunofluorescencia	39
9- Extracción de proteínas, electroforesis y Western blot	40
10- Secreción de citoquinas.....	41

11-	Expresión génica por RT-qPCR	41
12-	Evaluación de la relación ADNmit/ADNnuc.....	42
13-	Análisis de lípidos por TLC	42
14-	Síntesis de ácidos grasos	43
15-	Medidas de velocidad de consumo de O ₂ y acidificación extracelular	43
16-	β-oxidación mitocondrial	45
17-	Fraccionamiento subcelular	45
18-	Actividad aconitasa	46
19-	Análisis de datos, estadística, gráficos y esquemas	46
RESULTADOS		47
1-	Modelos de senescencia celular.....	47
1.1-	Inducción de senescencia celular por exposición a H ₂ O ₂	47
1.2-	Inducción de la senescencia celular por exposición a doxorrubicina	50
1.3-	Inducción de la senescencia celular por expresión de RAS oncogénico	53
1.4-	Inducción de la senescencia por el oncogén RAS en fibroblastos de piel (BJERRAS).....	55
2-	Metabolismo de ácidos grasos.....	59
2.1-	Síntesis de ácidos grasos.....	59
2.1.1-	Síntesis de ácidos grasos en células senescentes por exposición a H ₂ O ₂	59
2.1.2-	Síntesis de ácidos grasos en la senescencia inducida por doxorrubicina	62
2.1.3-	Síntesis de ácidos grasos en la senescencia inducida por el oncogén RAS.....	65
2.1.4-	Síntesis de ácidos grasos en células quiescentes.....	66
2.2 -	β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos en células senescentes	69
2.2.1-	β-Oxidación de ácidos grasos en células senescentes por exposición a H ₂ O ₂ o doxorrubicina	69
2.2.2-	β-Oxidación de ácidos grasos en la senescencia inducida por el oncogén RAS.....	71
2.3-	Función mitocondrial de células senescentes	72
2.3.1-	Función mitocondrial de células senescentes por exposición a H ₂ O ₂ o doxorrubicina	73
2.3.2-	Función mitocondrial de células senescentes por expresión del oncogén RAS	73
2.3.3-	Determinación de índices respiratorios.....	76
2.3.4-	Vías de señalización activadas por la expresión del oncogén RAS	78
2.3.5-	Vías metabólicas activadas por la expresión del oncogén RAS	83
3-	Fenotipo secretor y función mitocondrial en la senescencia inducida por el oncogén RAS.....	86
4-	Acetilación de lisinas proteicas en la senescencia inducida por el oncogén RAS	89
4.1-	Vías de transporte de acetil-CoA de la mitocondria al citosol.....	90

4.2- Sirtuinas	93
DISCUSION	97
Metabolismo de ácidos grasos.....	98
Fenotipo secretor y función mitocondrial en la senescencia inducida por RAS	102
Acetilación de lisinas proteicas en la senescencia inducida por el oncogén RAS	104
CONCLUSIONES.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	108
ANEXO.....	135
Anticuerpos para Western blot.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: antimicina A

ACC: Acetil-CoA Carboxilasa

ACL: ATP-citrato liasa

AMPK: proteína quinasa activada por AMP

ATM: quinasas Ataxia Telangiectasia Mutada

ATR: Ataxia telangiectasia mutada relacionada con Rad-3

BF: buffer de fraccionamiento

BrdU: bromo-2-deoxiuridina

BSA: albúmina sérica bovina

CACT: transportador carnitina/acil-carnitina

CDK: quinasa dependiente de ciclinas

C/EBP β : proteína de unión al potenciador de CCAAT beta

Chk1: serina/treonina-protein quinasa Chk1

Chk2: serina/treonina-protein quinasa Chk2

CPT1: carnitina palmitoiltransferasa 1

CPT2: carnitina palmitoiltransferasa 1

CO₂: dióxido de carbono

DNA-PKs: proteína quinasa dependiente de ADN

DDR: respuesta al daño al ADN

FAS: ácido graso sintasa

FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1 α

H2AX: histona H2AX

γ -H2AX: histona H2AX fosforilada

I κ B: inhibidor de NF- κ B

IKK: complejo quinasa de I κ B

LKB1: quinasa B1 de hígado

MAPK: quinasas activadas por mitógenos

ME1: Enzima málica citosólica dependiente de NAD(P)⁺

ME2: Enzima málica mitocondrial dependiente de NAD(P)⁺

mTORC1: diana de mamíferos del complejo de rapamicina 1

NAMPT: nicotinamida fosforribosiltransferasa

NAM: nicotinamida

NMN: mononucleótido de nicotinamida

NEMO: modulador esencial de NF-κB

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

OIS: senescencia inducida por oncogenes

PBS: buffer fosfato salino

PGC-1α: coactivador-1α de PPARγ

PPAR: receptores activados por proliferadores peroxisomales

QH2: ubiquinol

Q: ubiquinona

p16 o p16-INK4a: inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas 2A

p21: inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas 1

RAS: oncogén H-RAS (G12V)

RCR: respiratory control ratio

ROS: especies reactivas de oxígeno

SA-β-Gal: actividad β-galactosidasa asociada a senescencia

SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia

SFB: suero fetal bovino

SIRT1-7: sirtuinas 1-7

SREBP: proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides

SFB: suero fetal bovino

TLC: cromatografía de capa fina

INTRODUCCIÓN

1- Senescencia celular

La senescencia celular fue observada por primera vez en cultivos *in vitro* de fibroblastos; donde se pudo comprobar que a medida que “envejecía” el cultivo, es decir que el número de duplicaciones aumentaba, la capacidad de las células de dividirse disminuía hasta cesar por completo (1). En el presente se sabe que este fenómeno, conocido como senescencia replicativa, es consecuencia de la erosión de los telómeros (2). Las células también pueden tornarse senescentes prematuramente, frente a fuertes estímulos mitogénicos como la activación de oncogenes o pérdida de supresores tumorales o frente a estímulos que dañan al ADN como la exposición a oxidantes, radiaciones ionizantes o ciertas drogas como los quimioterápicos (3–7). En la mayoría de estos casos el estímulo inductor desencadena una vía de señalización conocida como la respuesta al daño en el ADN (DDR, del inglés: DNA Damage Response).

Independientemente de la causa que la produce, las células senescentes comparten características comunes. En estas células el cese de la proliferación es establecido y mantenido por las vías supresoras de tumores p53/p21/pRb y/o p16/pRb. Las células presentan cambios morfológicos: son más grandes, aplanadas y ocasionalmente multinucleadas. También presentan una alta actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal), que puede medirse a pH 6, debido a un aumento en el número de lisosomas (8). Frecuentemente presentan en el núcleo focos de heterocromatina, y focos formados por proteínas de la DDR que se acumulan en los sitios donde el ADN se encuentra dañado. Por último, estas células suelen presentar un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, del inglés: senescence-associated secretory phenotype) (9,10), compuesto por factores de crecimiento, metaloproteinasas y citoquinas entre otros factores (10,11).

El fenómeno de senescencia celular está asociado a distintos procesos biológicos. En primer lugar, la senescencia celular es un importante mecanismo para prevenir la proliferación de células con el ADN dañado, potencialmente portadoras de mutaciones que pueden conducir a la formación de tumores (9). Las células senescentes también participan en el desarrollo embrionario y la reparación tisular (12,13). Por otra parte, se ha observado que las células senescentes pueden contribuir al envejecimiento de un organismo limitando el potencial

proliferativo de las células madre, comprometiendo la integridad tisular, la regeneración y el recambio celular, conduciendo a una pérdida de función del tejido (9).

2- La respuesta al daño al ADN (DDR)

La respuesta al daño al ADN (DDR) es una compleja cascada de señalización que se activa cuando el ADN de una célula sufre lesiones, permitiendo a la célula reparar el daño y retomar su ciclo de vida normal o desencadenar la muerte celular programada (apoptosis) o la senescencia celular (14). En las células, la erosión de los telómeros, los oxidantes que se forman durante las actividades metabólicas, algunos factores ambientales, como los rayos UV o la radiactividad, y ciertos compuestos químicos que pueden causar daño al ADN. Por lo tanto, la DDR es fundamental para la supervivencia de la célula.

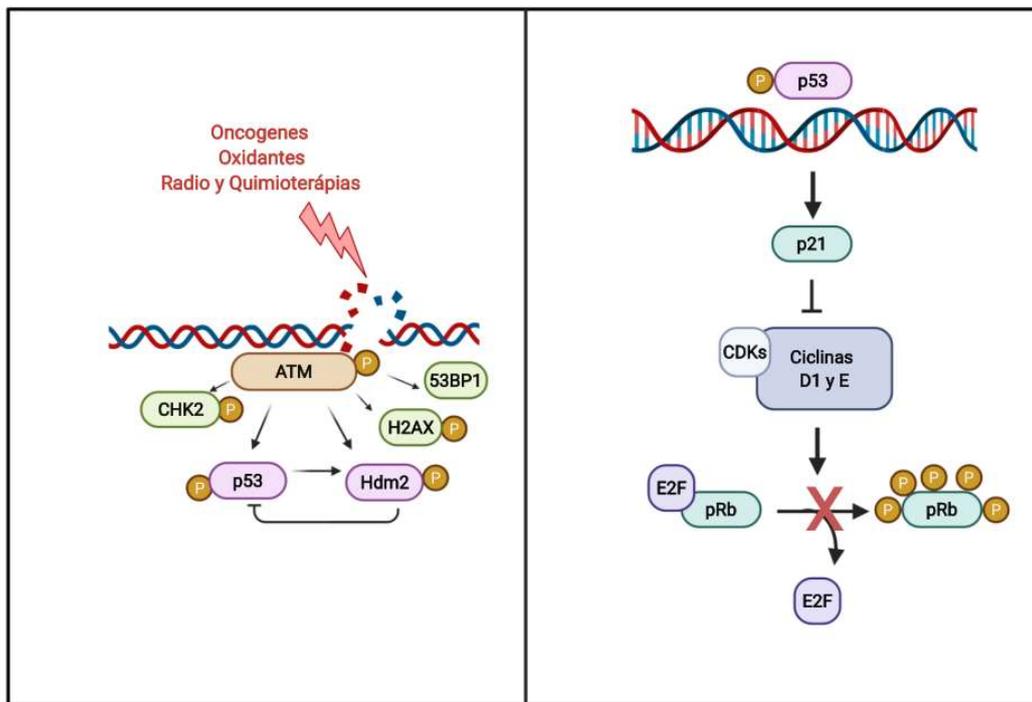
El daño en el ADN es censado por las serin/treonin quinasas Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM), Ataxia telangiectasia mutada relacionada con Rad-3 (ATR), y la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKs) (15). De las tres quinasas, ATM es la que juega un rol primordial en la respuesta a la rotura de las dos hebras de ADN. Cuando las quinasas reconocen el daño estructural en el ADN, se autofosforilan, activan, y fosforilan a varios sustratos. Entre los blancos de las quinasas encontramos a las serina/treonina-proteína quinasas Chk1 y Chk2, la histona H2AX, el supresor tumoral p53, y la proteína de unión a p53 1 (53BP1), que regulan la actividad de proteínas involucradas en el control del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis y senescencia. La histona H2AX fosforilada en la serina 139 (γ -H2AX) establece una retroalimentación positiva con ATM, incrementando su actividad local, y reclutando factores responsables de la reparación del ADN (16). Cuando la concentración de ATM fosforilada supera un determinado umbral fosforila a la quinasa Chk2 activándola (17), que es capaz de difundir y fosforilar sustratos fuera del núcleo (18).

La proteína p53 es un factor de transcripción que desempeña un papel importante en la regulación del ciclo celular a nivel de G1/S o G2/M. La proteína p53 es fosforilada en las serinas 15 y/o 20 por las serin/treonin quinasas que censan el daño al ADN (ATM y ATR) y por Chk2, respectivamente. La fosforilación de p53 en la Ser15 y Ser20 impide su interacción con la E3 ubiquitina-protein ligasa HDM2 (también conocida como MDM2), evitando su degradación

por el proteasoma (19). Paralelamente ATM y ATR también fosforilan a HDM2 en la serina 395 evitando la degradación p53 (20,21). La acumulación de p53 promueve la expresión del gen *CDKN1A* que codifica al inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas 1 (p21). La proteína p21 se une e inhibe a las quinasas dependiente de ciclinas (CDKs), CDK1, CDK2 y CDK4/6 inhibiendo la progresión del ciclo celular entre las fases G1/S y G2/M (22,23). La inhibición de CDKs por p21 da como resultado la hipofosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb) manteniéndola unida a los factores de transcripción E2F e inhibiendo la expresión de genes involucrados en la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular (24,25) (Esquema 1).

Estas vías se encuentran muy conservadas y están destinadas a asegurar la correcta replicación del ADN, división y proliferación celular (14,25). El inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas 2A (p16-INK4a o p16) es otra proteína cuyos niveles aumentan en células senescentes (26,27). Inhibe específicamente a CDK4 y CDK6 resultando en la hipofosforilación de pRb y la detención del ciclo celular. La regulación de la expresión del gen *CDKN2A* que codifica a p16 es compleja y no se encuentra bien establecida pero involucra a los complejos represores Polycomb 1 y 2 (28–30).

Por otra parte, diversos trabajos vinculan a la ATM con elementos reguladores del metabolismo celular: ATM fosforila a la quinasa B1 de hígado (LKB1, del inglés *liver kinase B1*) (31) y proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (32–34), regula a mTOR, e influye en procesos complejos como la autofagia y biogénesis mitocondrial dependiente de PGC-1 β (32,35,36). Estos reportes sugieren que ATM cumple roles en el citoplasma, además de en el núcleo celular, y que los mismos trascienden la reparación del ADN y el control del ciclo celular.



Esquema 1. Respuesta al daño al ADN y cese de la proliferación: Los cortes en las dos hebras del ADN son detectados por la serin/treonin quinasa ATM que se autofosforila y fosforila a diversos sustratos como H2AX y 53BP1 reclutándolos al sitio de lesión, y p53. Al fosforilarse p53 se libera de HDM2, se estabiliza, aumentan sus niveles y promueve la transcripción de genes, entre los que se incluye el gen que codifica a p21. La proteína p21 conduce a la inhibición de las CDKs, evitando la fosforilación de pRb deteniendo la progresión del ciclo celular.

3- Fenotipo secretor de la célula senescente

Las células senescentes presentan alteraciones específicas en su perfil transcripcional que resultan en muchos casos en la síntesis y secreción de una variedad de factores. La composición del secretoma senescente es heterogénea, depende de la identidad de la célula senescente y del estímulo inductor de la senescencia. Entre las proteínas secretadas se encuentran factores de crecimiento, por ejemplo CXCL1 (Gro- α), HGF, VEGF (11,37), metaloproteinasas de matriz (11,38) y moduladores de la respuesta inmune, como las citoquinas y quimioquinas (ej. IL-6, IL-7, IL-8) (10,11,39,40) que pueden actuar de forma autócrina y/o parácrina. El secretoma senescente tiene acciones diversas sobre el entorno, que dependen del contexto tisular y de la identidad de las moléculas secretadas (41). Por ejemplo, los factores secretados pueden tener acciones anti tumorigénicas, reforzando el estado senescente en forma autócrina, induciendo la senescencia en células vecinas en forma

parácrina (39) y reclutando células del sistema inmune para eliminar a las células senescentes y tumorales (42,43). También existen reportes de acciones pro tumorigénicas (44,45). Éstos últimos indican que el secretoma senescente promueve la proliferación, angiogénesis, transición epitelio-mesenquimal, invasividad y metástasis del tumor (43), además de la inmunosupresión de linfocitos T citotóxicos, promoviendo el desarrollo tumoral (41,46). De hecho, la eliminación de las células senescentes retrasa la tumorigénesis y atenúa el deterioro relacionado con la edad de varios órganos (47). Hay un tercer factor que influye en la composición del SASP conjuntamente con el tipo celular y el estímulo inductor de la senescencia (48,49), que es el tiempo desde el inicio del estímulo inductor de la senescencia (49). Por ejemplo, en heridas de piel se acumulan células senescentes que secretan el factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA), y si estas células son retiradas, el proceso de cicatrización se retrasa. Sin embargo, luego del proceso de cicatrización, las propias células senescentes median su remoción por células del sistema inmune (50).

Diversos factores pueden regular la secreción de citoquinas por las células senescentes. En la senescencia inducida por el oncogén RAS, y por agentes que dañan el ADN, la expresión del secretoma está controlada principalmente por los factores de transcripción factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y proteína de unión al potenciador de CCAAT beta (C/EBP β) (39,51). La inhibición de NF- κ B en células senescentes disminuye la expresión de múltiples citoquinas sin afectar la DDR ni la detención del ciclo celular (25).

La familia de factores NF- κ B está formada por homodímeros o heterodímeros de cinco proteínas diferentes: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2). La forma más común es el dímero compuesto por las subunidades p50 y p65. En ausencia de estímulo, las proteínas I κ B (I κ Ba, I κ Bb, and I κ B1) se unen a NF- κ B y forman un complejo que retiene al factor en el citoplasma. Pero frente a ciertos estímulos, el complejo quinasa de I κ B (IKK) fosforila a I κ B favoreciendo su degradación por el proteosoma y liberando a los dímeros de NF- κ B que se translocan al núcleo (52). El complejo IKK consta de subunidades de la quinasa (IKK α y/o IKK β) y la proteína reguladora modulador esencial de NF- κ B (NEMO del inglés, NF- κ B essential modulator), también conocida como IKK γ . La actividad de NF- κ B también está regulada por modificaciones post-traduccionales (ej. fosforilación, acetilación, ubiquitinación

(53,54)) que determinan la fuerza y la duración de la respuesta. Por ejemplo, la acetilación de p65, en la lisina 310 aumenta la actividad transcripcional de NF- κ B (53,55). Estudios *in vitro* han implicado a la IL-6 y al receptor de quimioquinas 2 (CXCR2) y sus ligandos IL-8 y Gro- α en el desarrollo o en el mantenimiento de senescencia inducida a través de la activación de los factores de transcripción NF- κ B y C/EBP β , constituyendo un ciclo de retroalimentación positiva (39,40).

El secretoma de las células senescentes también se encuentra bajo el control del inflamosoma a través de IL-1 α (42) y de la quinasa activada por mitógenos p38 que regula la actividad transcripcional de NF- κ B (56). Por otra parte ATM y Chk2, componentes de la DDR, también modulan la secreción de las citoquinas, IL-8, Gro- α e IL-6, tanto en la senescencia inducida por el oncogén RAS como por irradiación (57,58). De hecho, la activación persistente de ATM y Chk2, componentes de la DDR, es un requisito fundamental para el establecimiento del fenotipo secretor. Si bien falta información para elucidar el mecanismo completamente, diversos reportes indican a la ATM fosforilada como la responsable de la fosforilación de NEMO sumoiledado en su serina 85 (58,59). Posteriormente a su fosforilación, NEMO es monoubiquitinado y exportado desde el núcleo al citosol en donde se ha podido observar al complejo fosfo ATM-NEMO-IKK necesario para la activación de NF- κ B (60,61). Además, la expresión de NF- κ B en la senescencia se encuentra activada por el factor de transcripción GATA4, que es regulado a su vez por ATM y ATR. Estas quinasas inhiben la degradación de GATA4 mediada por la vía autofágica dependiente de p62, y de esta forma promueven la adquisición del fenotipo secretor por las células senescentes (62). Estos resultados demuestran una íntima vinculación entre la DDR y el fenotipo secretor.

Se ha demostrado la existencia de una regulación temporal del SASP en el modelo de senescencia inducida por el oncogén RAS, mediada por la activación de NOTCH1. NOTCH1 es un receptor transmembrana que al interactuar con uno de sus ligandos es clivado. El dominio intracelular escindido de NOTCH1 (N1ICD) se transloca al núcleo e inicia la transcripción de los genes diana de NOTCH1 implicados en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (63). En la etapa temprana de la inducción de la senescencia NOTCH1 se activa, reprime a C/EBP β y el fenotipo secretor en esta etapa se caracteriza por la presencia de TNF- β . En

etapas más tardías disminuye la actividad de NOTCH1, y C/EBP β activo coopera con NF- κ B estableciendo un SASP que se caracteriza por la presencia de IL-6 e IL-8 (49).

Por otra parte, se ha comprobado en distintas líneas celulares y utilizando diferentes estímulos inductores de senescencia que la inhibición de mTORC1 suprime la secreción de citoquinas inflamatorias. El mecanismo involucraría la inhibición de la traducción de las proteínas reguladoras del SASP, IL-1 α y MK2 que conducen a la inhibición de NF- κ B (64,65).

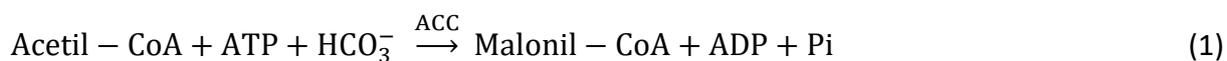
De lo planteado hasta el momento se desprende que las células senescentes sufren cambios fenotípicos muy importantes, que incluyen el cese de la proliferación y la secreción de múltiples factores proteicos. Estos cambios vienen acompañados de alteraciones metabólicas, a continuación se describirán las principales vías y regulación del metabolismo lipídico y el metabolismo energético celular y los cambios que se han reportado en estas vías en las células senescentes

4- Metabolismo lipídico

Los lípidos son un grupo de compuestos químicamente diversos que comparten la característica de ser insolubles en agua. Constituyen una fuente importante de energía y forman parte de las membranas celulares, por lo que tienen también una función estructural. Además cumplen roles fundamentales en el reconocimiento célula-célula y la transducción de señales. Entre los lípidos encontramos a los ácidos grasos, estos son ácidos carboxílicos con una cadena alifática larga, entre cuatro y treinta y seis átomos de carbono (66). En la célula se pueden encontrar solos o formando parte de otros lípidos como los mono, di y triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol (66). Los ácidos grasos que contienen menos de seis átomos de carbono en su cadena se denominan ácidos grasos de cadena corta (ej. ácido butírico C4:0), los ácidos grasos con cadenas entre seis y doce átomos de carbono se denominan ácidos grasos de cadena mediana (ej. ácido octanoico C8:0 comúnmente llamado ácido caprílico). Los ácidos grasos de cadena mayor a catorce átomos de carbono y menor a dieciocho se denominan ácidos grasos de cadena larga (ej. ácido oleico C18:1 y ácido palmítico C16:0). Por último se encuentran los ácidos grasos de cadena mayor a dieciocho átomos de carbono llamados ácidos grasos de cadena muy larga (ej. ácido montánico C28:0) (67).

4.1- Síntesis de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos es una vía metabólica citosólica que comienza con la síntesis de un intermediario de tres carbonos, el malonil-CoA. El malonil-CoA se forma a partir de acetil-CoA y bicarbonato (HCO_3^-) en un paso irreversible catalizado por la acetil-CoA carboxilasa (ACC, ver reacción 1) (68).

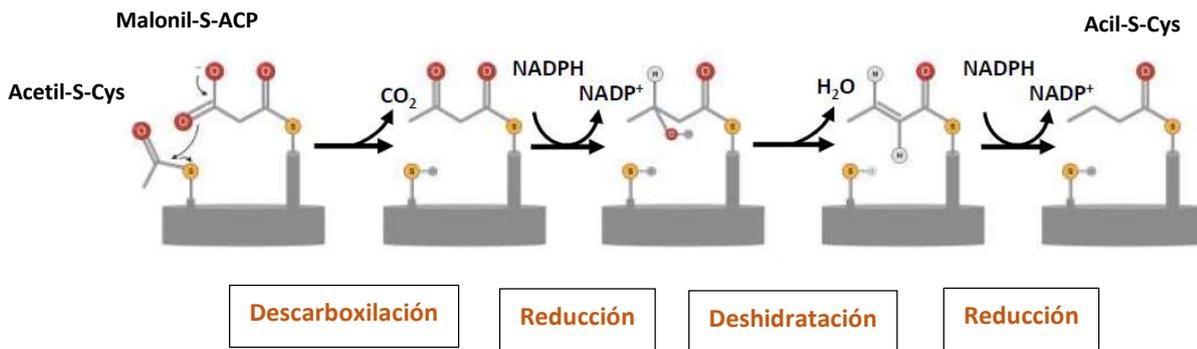


En mamíferos se conocen dos isoformas de la acetil-CoA carboxilasa, la ACC1 ubicada en el citosol y la ACC2 anclada a la membrana mitocondrial externa (69). En tejidos lipogénicos como el tejido adiposo y la glándula mamaria predomina la ACC1, mientras que en tejidos con una alta tasa de oxidación de ácidos grasos (ej. corazón y músculo esquelético) predomina la ACC2. En el hígado, donde ambas vías son relevantes, encontramos ambas isoformas (70). Algunos estudios sugieren que la ACC2 sería la isoforma involucrada en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos, ya que se encuentra asociada a la mitocondria y produciría malonil-CoA próximo a la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) (71,72). Como se verá más adelante la CPT1 cataliza un paso limitante en la oxidación de ácidos grasos, y es inhibida por el malonil-CoA (73).

La acetil-CoA carboxilasa tiene tres regiones funcionales; una proteína portadora de biotina, la biotina carboxilasa que activa al CO_2 uniéndolo a un nitrógeno del anillo de la biotina en una reacción dependiente de ATP y una transcarboxilasa que transfiere el CO_2 activado desde la biotina hasta el acetil-CoA, produciendo el malonil-CoA. La reacción catalizada por la ACC constituye el principal punto de regulación de la síntesis de ácidos grasos. La ACC está regulada alostéricamente por modificación covalente (fosforilación/defosforilación), interacciones proteína-proteína, y también a nivel transcripcional (70).

En la mayoría de los eucariotas, la síntesis de ácidos grasos transcurre principalmente en el citosol celular mediante una secuencia repetida de cuatro reacciones catalizadas por un complejo que recibe el nombre de ácido graso sintasa tipo I (FAS I, o FAS del inglés: fatty acid synthase). La FAS I humana es codificada por un único gen y forma un homodímero de 540

kDa (74). A lo largo de todo el proceso los intermediarios permanecen unidos covalentemente, en forma de tioésteres, a uno de los dos grupos tiol de la enzima (Esquema 2). Se adicionan en cada secuencia dos átomos de carbono provenientes del malonil-CoA, inicialmente a un acetil-CoA y luego a un acil-CoA más largo.



Esquema 2. La síntesis de ácidos grasos por la FAS involucra la adición de unidades de dos carbonos. Cada grupo malonilo y acetilo (o la cadena en crecimiento) es activado por unión, mediante enlace tioéster, a tioles del complejo ácido graso sintasa. El primer paso es la condensación de un grupo acilo activado (el primer acilo es el acetil-CoA) con dos átomos de carbono provenientes del malonil-CoA, con la eliminación de CO₂ del grupo malonilo. El producto β-ceto es reducido a un alcohol, posteriormente se elimina una molécula de H₂O generando un doble enlace que es reducido en el último paso formando una cadena saturada. Figura adaptada de (66).

Cada grupo malonilo es activado por el enlace tioéster que lo une a la ácido graso sintasa (74). El primer paso es la condensación del grupo acilo activado con dos átomos de carbono procedentes del malonil activado y la eliminación de CO₂ del grupo malonilo. El producto β-ceto se reduce a alcohol, luego la eliminación de una molécula de H₂O resulta en la formación de un doble enlace y por último el doble enlace se reduce para formar el correspondiente grupo acilo graso saturado (Esquema 2). Los electrones para las dos reacciones de reducción provienen del NADPH. Luego de siete ciclos se libera el producto de la enzima, el ácido palmítico (75). La mayoría de los eucariotas contienen una FAS adicional en sus mitocondrias, FAS de tipo II (mtFASII) implicada en la biosíntesis del ácido lipoico (76). La síntesis de ácidos grasos es un proceso costoso energéticamente, y finamente regulado. El principal punto de control es el paso catalizado por la ACC. El malonil-CoA, producto de la reacción, y el palmitoil-CoA, principal producto de la síntesis de ácidos grasos, actúan como inhibidores de la ACC. Mientras que el citrato que es exportado de la mitocondria cuando hay exceso de acetil-CoA y ATP, es un activador alostérico de la enzima (66). La ACC también está regulada por

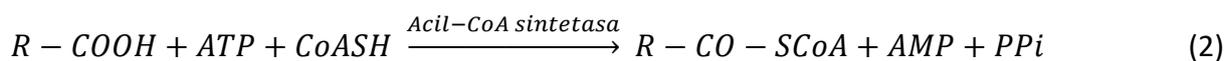
modificación covalente. Diversas fosforilaciones inhiben a la enzima, AMPK fosforila a ACC1 en los residuos de Ser79, Ser1200 y Ser1215, y la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) la fosforila en los residuos de Ser77 y Ser1200 (77). La fosforilación en la Ser79 y en la Ser1200 son las que ejercen mayor impacto en la actividad enzimática. La interacción de la proteína BRCA con ACC también inhibe su actividad, esta forma de regulación es relevante durante el ciclo celular. La interacción ACC-BRCA depende de la fosforilación de la Ser1263 (78), que evita que se desfosfore la Ser79 (79). Por otra parte, la ACC2 también es inhibida por AMPK que cataliza la fosforilación en la Ser221 (80).

La familia de factores de transcripción proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP, del inglés sterol regulatory element binding proteins) regulan la síntesis lipídica a través del control que ejercen en la expresión de proteínas de la vía como por ejemplo ACC, FAS y ATP-citrato liasa (ACL) (81,82). Se conocen tres isoformas SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 que se diferencian por sus roles en la síntesis lipídica, SREBP-1a y SREBP-1c están implicados en la regulación de la síntesis de ácidos grasos. Los SREBP interactúan con otros factores de transcripción y coactivadores transcripcionales como la proteína de unión a CREB (CBP, del inglés CREB binding protein) y p300. CBP y p300 son acetiltransferasas que catalizan la acetilación de lisinas de histonas y facilitan el acceso de SREBP a los promotores de sus genes blanco. La histona desacetilasa 1 cataliza la desacetilación de las lisinas del promotor del SREBP inhibiendo la transcripción de los genes que regula (83). Por otra parte en el hígado se ha observado que p300 cataliza la acetilación de SREBP-1c y esta modificación postraduccional aumenta su actividad transcripcional. Mientras que la sirtuina 1 (SIRT1) desacetila a SREBP-1c disminuyendo su estabilidad y la unión a los promotores (84). Otras modificaciones postraduccionales como la fosforilación también modulan la actividad de SREBP, en particular la fosforilación de SREBP-1c en la Ser372 por AMPK evita su clivaje y translocación al núcleo inhibiendo la síntesis lipídica (85). Tanto la acetilación como la fosforilación evitan la degradación mediada por ubiquitina de estos factores y aumentan su estabilidad (86–88).

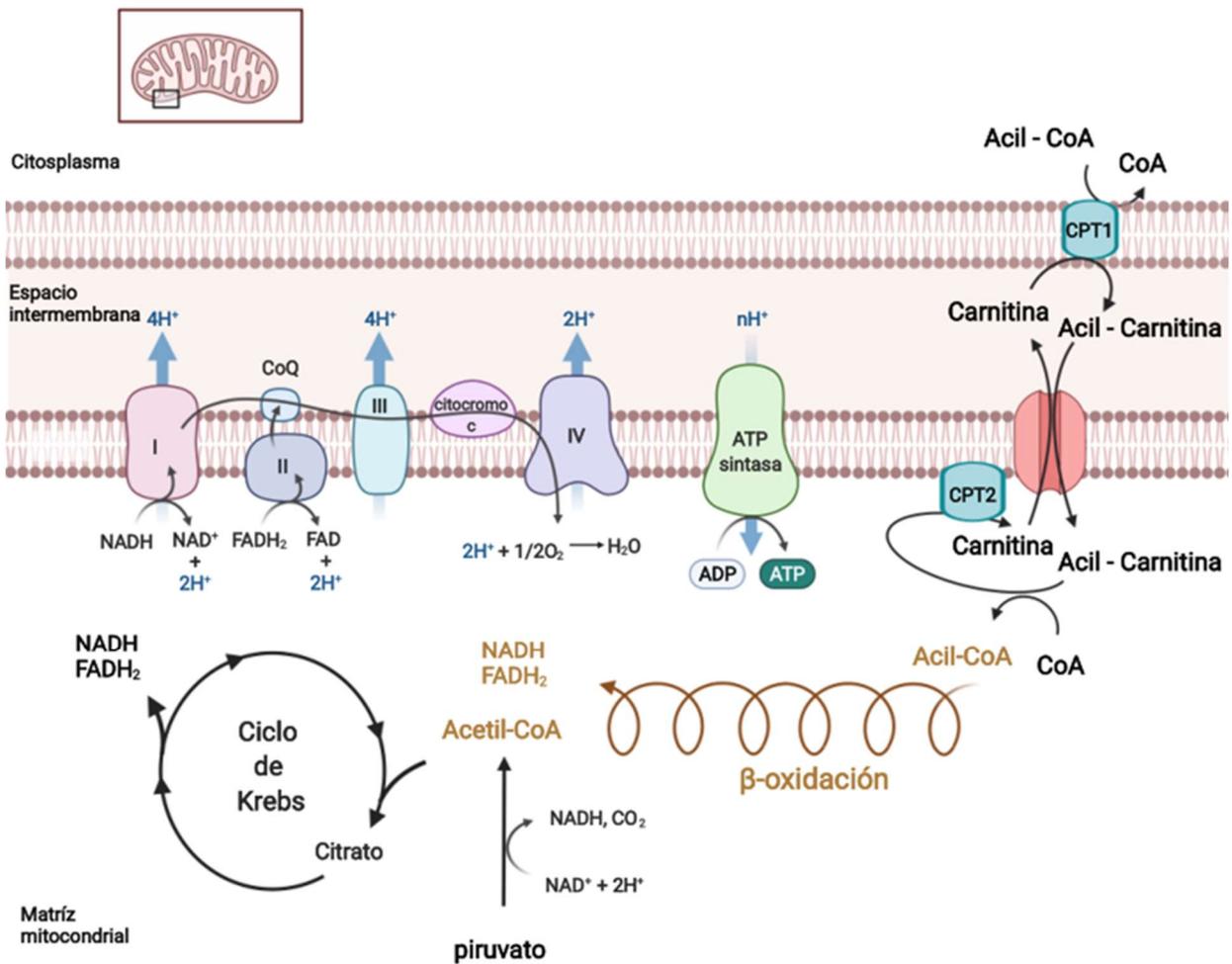
4.2- Oxidación de ácidos grasos

Oxidación de los ácidos grasos de cadena larga.

La oxidación de ácidos grasos de cadena larga a acetil-CoA es una ruta central de obtención de energía en la mayoría de los organismos y tejidos. Las células pueden obtener ácidos grasos de la dieta, del tejido adiposo, en donde son almacenados, o de organelos intracelulares como peroxisomas o lisosomas. Una vez que se encuentra en el citosol celular el ácido graso es rápidamente activado formando el correspondiente acil-CoA (ver reacción 2). Esta tioesterificación del ácido graso con la coenzima A es catalizada por acil-CoA sintetetasas que presentan diferentes localizaciones subcelulares, incluyendo a la membrana mitocondrial externa, la membrana del peroxisoma, del retículo y la citoplasmática (89–92).



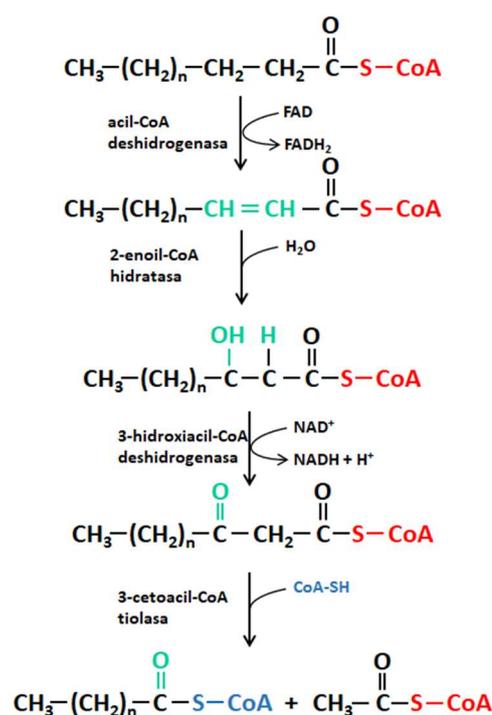
Los acil-CoA formados no pueden atravesar la membrana mitocondrial interna libremente, necesitan de la ayuda de un sistema de transporte compuesto por tres enzimas: carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), el transportador carnitina/acil-carnitina (CACT) y la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2) (75,93,94). Las tres enzimas son proteínas de membrana, la CPT1 localizada en la membrana mitocondrial externa tiene como sustratos a la carnitina y al acil-CoA y como productos acil-carnitina y CoA (Esquema 3). La CACT localizada en la membrana mitocondrial interna permite el intercambio de acil-carnitina hacia la matriz mitocondrial por una carnitina hacia el espacio intermembrana (95) y el ciclo se completa cuando la CPT2 ubicada en la cara interna de la membrana mitocondrial interna regenera al acil-CoA y carnitina libre (Esquema 3).



Esquema 3. Catabolismo mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga y piruvato. Inicialmente los ácidos grasos se activan a acil-CoA en el citosol. El sistema de transporte del acil-CoA a la mitocondria involucra tres enzimas de la membrana mitocondrial interna. Una en la cara externa, la CPT1 que transfiere el acilo del acil-CoA a la carnitina formando acil-carnitina. Una translocasa CACAT (rojo) que intercambia una acil-carnitina hacia el interior mitocondrial por una carnitina al espacio intermembrana y la CPT2 que revierte la acción de CPT1 liberando un acil-CoA hacia la matriz mitocondrial. Una vez que los acil-CoA se encuentran en la matriz mitocondrial son oxidados en la β-oxidación, rindiendo acetil-CoA, NADH y FADH₂. El acetil-CoA formado en la mitocondria por esta y otras vías (como la descarboxilación oxidativa del piruvato) puede condensarse con oxalacetato para formar citrato ingresando de esta forma al ciclo de Krebs. Los productos de la oxidación del acetil-CoA en el ciclo de Krebs son: CO₂, NADH y FADH₂. Finalmente, los transportadores de electrones, NADH y FADH₂, ceden sus electrones a la cadena transportadora de electrones donde son transportados hasta el O₂, el flujo de electrones se acopla a la exportación de H⁺ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, conservando la energía en un gradiente de H⁺ que luego es aprovechada por la ATP sintasa para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi.

Una vez que el acil-CoA ingresa a la mitocondria es oxidado hasta acetil-CoA en la vía conocida como β-oxidación (Esquema 3) (75,96). La β-oxidación involucra la acción de cuatro enzimas para acortar al ácido graso en unidades de dos átomos de carbono (bajo la forma de acetil-

CoA) desde el extremo carboxilo terminal. La primera enzima de la β -oxidación es la acil-CoA deshidrogenasa (ACAD) que se clasifica según el largo de la cadena del ácido graso a oxidar. Para catalizar la oxidación de ácidos grasos de cadena larga la célula utiliza las ACAD de ácido graso de cadena larga (LCAD, del inglés: long chain fatty acid dehydrogenase) o las ACAD de ácido graso de cadena muy larga (VLCAD, del inglés: very long chain fatty acid dehydrogenase) (97). En humanos LCAD no tiene un rol relevante en la oxidación de los ácidos grasos, pero participa en la oxidación de ácidos grasos en roedores (96). Las ACAD tienen como cofactor al FAD y transfieren los electrones a la proteína transferidora de electrones (ETF, del inglés: *electron transfer flavoprotein*), una flavoenzima. La ETF reducida es oxidada por la ETF:ubiquinona óxido-reductasa que cede los electrones a la ubiquinona en la cadena respiratoria mitocondrial (98). Las enzimas que catalizan los siguientes pasos de la β -oxidación son: enoil-CoA hidratasa (EH), 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HAD) y 3-cetoacil-CoA tiasa (CAT). Las actividades de la EH, HAD y CAT se encuentran en una proteína de la membrana mitocondrial interna conocida como proteína trifuncional (99). La oxidación de



Esquema 4. La β -oxidación mitocondrial. En cada paso de esta secuencia de cuatro reacciones un residuo acetilo es removido bajo la forma de acetil-CoA desde el extremo carboxilo terminal. Figura adaptada de Lehninger Principios de Bioquímica (66).

ácidos grasos de cadena insaturada o con número impar de átomos de carbono necesita de

otras enzimas auxiliares (75,99). Las moléculas de acetil-CoA producidas entran al ciclo del ácido cítrico para su oxidación completa a CO₂. Los transportadores de electrones generados en las reacciones de oxidación de los ácidos grasos y del acetil-CoA (NADH, FADH₂), ceden eventualmente sus electrones a la cadena respiratoria en la membrana mitocondrial interna, impulsando la síntesis de ATP.

Oxidación de los ácidos grasos saturados de cadena corta y mediana

A diferencia de los ácidos grasos de cadena larga los ácidos grasos de cadena corta y mediana son activados dentro de la mitocondria (91). Estos ácidos grasos no requieren de la carnitina para su transporte a la matriz mitocondrial en donde serán activados a acil-CoA (100,101). Los acil-CoA formados son entonces oxidados en la β -oxidación tal como fue descrito para los ácidos grasos de cadena larga, con la diferencia que los acil-CoA de cadena corta y mediana serán sustratos de las acil-CoA deshidrogenasas de ácidos grasos de cadena corta (SCAD) y mediana respectivamente (MCAD) (97). Para los ácidos grasos de cadena mediana los siguientes pasos de la β -oxidación son catalizados por la enzima trifuncional aunque también se ha descrito una enoil-CoA hidratasa en la matriz mitocondrial que tiene como sustrato a los derivados 2-enoil-CoA de cadena mediana (102). Los derivados 2-enoil-CoA de ácidos grasos de cuatro y seis átomos de carbono son convertidos en L-3-hidroxiacil-CoA en una reacción catalizada por la enoil-CoA hidratasa de ácidos grasos de cadena corta (crotonasa) (103). El L-3-hidroxiacil-CoA es el sustrato de la tercera reacción de la β -oxidación que es catalizada por la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta. El último paso de la vía es catalizado por la acetoacetyl tiolasa (104) y resulta en la liberación de un acetil-CoA y un acil-CoA dos carbonos más corto (Esquema 4).

Oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga

En eucariotas superiores la oxidación mitocondrial es la principal vía de oxidación de ácidos grasos, pero no la única. La oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga, ramificados o ácidos dicarboxílicos, tiene lugar en los peroxisomas (105). La activación de los ácidos grasos para su oxidación peroxisomal tiene lugar en la cara externa de la membrana peroxisomal y luego el acil-CoA formado es transportado hacia el interior por transportadores ABC. Luego, el proceso de oxidación es similar al de la β -oxidación mitocondrial. La flavoenzima que

cataliza el primer paso es la acil-CoA oxidasa que tiene al oxígeno como aceptor de electrones, por lo que se genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en lugar de $FADH_2$ (106). El H_2O_2 formado es dismutado a oxígeno (O_2) y agua (H_2O) en una reacción catalizada por la catalasa. El producto de la acil-CoA oxidasa sufre los mismos pasos de la β -oxidación, tal cual transcurre en la mitocondria, dando como productos, acetil-CoA, acil-CoA y ácidos grasos de cadena mediana bajo la forma de ésteres de carnitina que son enviados a la mitocondria donde sufren la oxidación a acetil-CoA (105).

Regulación de la oxidación de ácidos grasos

El transporte de grupos acilos grasos citosólicos a la matriz mitocondrial constituye el paso limitante de la velocidad de oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, y es principal punto de regulación de esta vía. El malonil-CoA, el primer intermediario de la biosíntesis citosólica de ácidos grasos, es un inhibidor de la CPT1 y garantiza la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos recién sintetizados evitando la activación simultánea de las dos vías (107,108).

La AMPK, es una importante enzima reguladora de la síntesis y la oxidación de los ácidos grasos. Esta enzima se activa frente a situaciones de desbalance energético celular donde aumentan los niveles de AMP. Más adelante se describe en detalle la estructura y regulación de esta quinasa. Como ya se mencionó, la AMPK activa cataliza la fosforilación de diversas enzimas blanco, entre ellas la ACC. La fosforilación de la ACC1 en la Ser79 y de la ACC2 en la Ser122 inhibe a estas enzimas, y por tanto la síntesis de malonil-CoA, promoviendo el transporte de acil-grasos a la mitocondria, activando la β -oxidación para reponer el déficit de ATP (72). La presencia de la ACC2 a nivel de la membrana externa mitocondrial sugiere que esta enzima cumpliría un rol relevante en la regulación de la actividad de CPT1 y la oxidación de ácidos grasos (109).

Las enzimas de la β -oxidación están reguladas por productos de la vía y metabolitos que señalan que existe energía suficiente. Una relación $[NADH]/[NAD^+]$ elevada inhibe a la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y concentraciones altas de acetil-CoA inhiben a la tiolasa (110). Las actividades de las enzimas de la vía también se inhiben si las concentraciones de sus productos aumentan, y una elevada concentración del 3-cetoacil-CoA puede inhibir a la

enoil-CoA hidratasa y a la acil-CoA deshidrogenasa. También vale la pena destacar que recientemente se han realizado estudios en ratones que indican que la actividad de LCAD puede ser regulada por acetilación y desacetilación de las lisinas 42 (Lys42) y 318 (Lys318) de la enzima. La sirtuina 3 (SIRT3) cataliza la desacetilación de las Lys42 y Lys318 aumentando la actividad de LCAD (111,112). En las VLCAD se han identificado varias lisinas involucradas en la regulación de la actividad enzimática. La SIRT3 desacetila y las SIRT5 desuccinila a la lisina 299 (Lys299) estabilizando al cofactor FAD en el sitio activo. Además, se encuentran otras tres lisinas (Lys482, Lys492 y Lys507) en la VLCAD que pueden estar acetiladas o succiniladas. La SIRT3 desacetila a la Lys507 mientras que la SIRT5 desuccinila a las Lys482, Lys492 y Lys507. Ambas modificaciones postraduccionales promueven la unión de la VLCAD con la cardiolipina y la desacetilación por SIRTs libera a la enzima aumentando su actividad (113).

Las proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos también se encuentran bajo regulación transcripcional. La familia de factores de transcripción llamados receptores activados por proliferadores peroxisomales, PPAR (del inglés, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) estimulan a la oxidación de ácidos grasos aumentando la expresión de diversos genes involucrados con la vía. Los ligandos que se unen y lo activan son ácidos grasos y algunos de sus derivados. Las enzimas de la β -oxidación que se encuentran bajo esta regulación son la acil-CoA sintetasa y la CPT1. PPAR α también regula a otras proteínas que indirectamente contribuyen a la oxidación de los ácidos grasos como CD36 encargada del transporte de ácidos grasos a través de la membrana citoplasmática, la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) en el citoplasma, y la malonil-CoA descarboxilasa que cataliza la descarboxilación del malonil-CoA y favorece la entrada de ácidos grasos a la mitocondria al evitar la inhibición de CPT1 (114–116).

El coactivador-1 α de PPARy (PGC-1 α , del inglés *PPARy co-activator alpha*) es un regulador de la oxidación de ácidos grasos y de la biogénesis mitocondrial. PGC-1 α es un factor de regulación co transcripcional que activa a diversos factores de transcripción del metabolismo oxidativo. Incluyendo a PPAR α (117), los factores nucleares respiratorios 1 y 2 (NRF1 y NRF2) promotores de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo (118,119) como FOXO, aumentan la entrada de ácidos grasos a la célula mediada por CD36 así como su posterior oxidación (120–122). La actividad de PGC-1 α es modulada por modificaciones

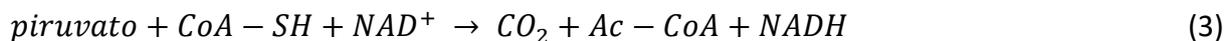
postraduccionales. Su actividad aumenta cuando es fosforilada por la AMPK (123,124) o desacetilada por la sirtuina 1 (SIRT1) (125,126). Las modificaciones postraduccionales que sufre PGC-1 α regulan su actividad en respuesta al aumento en la actividad de AMPK, que responde a un aumento en los niveles de AMP/ATP, y el aumento en la actividad SIRT1 que responde a un aumento en la relación NAD⁺/NADH (127).

5- Metabolismo energético mitocondrial

Las mitocondrias son organelos que se encuentran en la mayoría de las células eucariotas. Las mitocondrias varían de manera considerable en tamaño, forma y cantidad por célula, dependiendo del origen y estado metabólico celular. Están delimitadas por una membrana externa y contienen además una membrana interna extensamente invaginada. El número de invaginaciones, denominadas crestas, varía con la actividad respiratoria del tipo celular. Esto es debido a que las proteínas que llevan a cabo el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están embebidas en la membrana mitocondrial interna. En la mitocondria convergen varias vías del catabolismo celular, y aunque constituye el principal centro productor de energía de la mayoría de las células eucariotas, sus roles van más allá de la síntesis de ATP (128,129). Incluyen también la apoptosis, la regulación del calcio, la producción de especies reactivas del oxígeno, y constituye una plataforma estructural para el ensamblaje de complejos como el inflamasoma (130).

Como se mencionó anteriormente, la mitocondria alberga varias rutas catabólicas, rutas oxidativas de conversión de nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) a metabolitos más sencillos. En estas reacciones se genera poder reductor (NADH, NADPH, FADH₂), y energía (ATP). Una característica destacable del catabolismo es que convierte a un gran número de sustancias diversas en intermediarios comunes.

La degradación de los principales nutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) converge en la producción de un intermediario común, la acetil-CoA (66). Como se señaló anteriormente, el acetil-CoA es un producto de la β -oxidación mitocondrial y también puede ser generado por la descarboxilación oxidativa del piruvato, en una reacción de catalizada por la piruvato deshidrogenasa (reacción 3 y Esquema 3).



Los esqueletos carbonados de 11 de los 20 aminoácidos también pueden degradarse a acetil-CoA, ya sea de manera directa (aminoácidos cetogénicos: Leu, Lys y Trp) o a través de la formación previa de piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs (aminoácidos glucogénicos: Ala, Gly, Cys, Ser, Thr, Tyr, Phe, Ile). En algunas condiciones, el acetil-CoA puede ser generado también a partir de los cuerpos cetónicos, acetoacetato y β -hidroxibutirato (131).

El acetil-CoA producido a nivel mitocondrial mediante las distintas vías, tiene principalmente dos destinos metabólicos: la degradación a dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) en el Ciclo de Krebs en la mitocondria, o actuar como precursor para distintos procesos biosintéticos, la mayoría de los cuales ocurren en el citosol, como la síntesis de ácidos grasos y colesterol, y algunos en la mitocondria, como la síntesis de cuerpos cetónicos (132).

5.1- Ciclo de Krebs

El Ciclo de Krebs también conocido como Ciclo del Ácido Cítrico o Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos consiste en ocho reacciones diferentes, estas se encuentran catalizadas por las enzimas citrato sintasa (CS), aconitasa (ACO), isocitrato deshidrogenasa (IDH), α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH), succinil-CoA sintetasa, succininato deshidrogenasa (SDH), fumarasa y malato deshidrogenasa. Las actividades enzimáticas se encuentran organizadas en complejos supramoleculares que permiten la canalización de los sustratos (133). En el Ciclo Krebs el acetil-CoA se oxida completamente a CO_2 y H_2O y los equivalentes de reducción liberados reducen a los cofactores FAD y NAD^+ a FADH_2 y NADH , respectivamente. Esta vía se encuentra regulada por la disponibilidad de sustratos, la inhibición por los productos acumulados y la retroinhibición alostérica de las enzimas que catalizan etapas tempranas del ciclo. Por lo tanto, las relaciones NADH/NAD^+ y ATP/ADP cumplen un rol importante en la regulación del flujo de la vía, cuando dichas relaciones aumentan disminuye el flujo por el

Ciclo Krebs y viceversa (132,134). Las tres enzimas principales que regulan la velocidad del flujo por el ciclo catalizan pasos irreversibles del mismo y son: CS, IDH y α -KGDH, de esta manera la acumulación de citrato bloquea a la CS, el succinil -CoA inhibe a la α -KGDH y también a la CS y el producto final de la vía, el ATP, inhibe tanto a la CS como a al IDH. La inhibición de la CS por el ATP es revertida en presencia de ADP que es un activador alostérico de la enzima. El NADH producto de las reacciones catalizadas por la IDH, la α -KGDH y la malato deshidrogenasa, se acumula en ciertas situaciones metabólicas, inhibe a las primeras dos deshidrogenasas. Por último, en el músculo, el Ca^{2+} activa a la IDH y la α -KGDH (66). Como veremos más adelante, las enzimas de la vía también son reguladas por la SIRT3.

Algunos intermediarios del Ciclo Krebs participan en rutas biosintéticas, por ejemplo, son precursores de la síntesis del grupo hemo, de bases nitrogenadas, de glucosa y ácidos grasos, entre otros. Por ejemplo, el acetil-CoA formado en la mitocondria puede ser exportado al citosol, en donde es utilizado como precursor de rutas biosintéticas. Debido a que el acetil-CoA no atraviesa la membrana mitocondrial interna es exportado bajo la forma citrato. Una vez en el citosol, el citrato se convierte nuevamente en acetil-CoA en una reacción catalizada por la enzima ATP-citrato liasa (ACL, reacción 4) (132,134).



5.2- Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

Los nucleótidos reducidos NADH y FADH₂ formados en el Ciclo Krebs, en la β -oxidación y en otras reacciones mitocondriales ceden sus electrones a los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones en donde son conducidos hacia el aceptor final, el O₂, el cual es reducido a H₂O. La energía liberada por el transporte de electrones es acoplada al transporte de protones (H⁺) hacia el espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico que es utilizado por la ATP sintasa para a síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (132) (Esquema 3). El NADH cede sus electrones al complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) de la cadena respiratoria y se oxida a NAD⁺. Se necesitan dos electrones del NADH para reducir la

ubiquinona (Q) a ubiquinol (QH₂), y esto se acompaña del transporte vectorial, de la matriz al espacio intermembrana, de cuatro protones a través de la membrana mitocondrial interna. El complejo I también es una de las principales fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (135).

El complejo II o succinato deshidrogenasa, también llamado succinato-coenzima Q reductasa o succinato mitocondrial: ubiquinona oxidoreductasa es el único complejo de cadena respiratoria que no bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna. Forma parte del ciclo de Krebs, donde cataliza la oxidación de succinato a fumarato, junto con la reducción de ubiquinona a ubiquinol. Varios sustratos de las deshidrogenasas mitocondriales canalizan sus electrones a la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona. Entre ellas se encuentran las acildeshidrogenasas que catalizan el primer paso de la β -oxidación (ver 4.2: Oxidación de ácidos grasos). El glicerol 3-fosfato producido en el citosol a partir de la reducción de la dihidroxiacetona fosfato (intermediario de la glucólisis) o la fosforilación del glicerol, es oxidado por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ubicada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna que también cede los electrones a la ubiquinona (136).

El ubiquinol es un sustrato para el complejo III. El complejo III, también conocido como citocromo bc₁, acopla la transferencia de electrones de QH₂ al citocromo c con la translocación de 4 protones a través de membrana mitocondrial interna. El citocromo c es una proteína soluble del espacio intermembrana que se desplaza al complejo IV para ceder los electrones. El complejo IV, también llamada citocromo c oxidasa es la oxidasa terminal en la cadena respiratoria y reduce el O₂ a H₂O mientras bombea un protón desde la matriz al espacio intermembrana por cada electrón que transfiere (136). El complejo III también es una fuente de ROS (135).

El gradiente de protones creado por la cadena respiratoria impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato. La ATP sintasa tiene dos componentes: la subunidad F₁ es una proteína periférica de membrana y la subunidad F_o es una proteína integral de membrana. La subunidad F₁ presenta una disposición alterna de tres subunidades α y tres β , dispuestas alrededor de la subunidad γ . En la superficie de la enzima, la reacción de síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato es fácilmente reversible, sin embargo, el ATP sintetizado es incapaz de abandonar la superficie de la enzima en ausencia de la subunidad F_o. Se ha propuesto un

mecanismo denominado catálisis rotacional que es impulsado por el pasaje de protones por la unidad Fo. El mecanismo de la ATP sintasa implica la unión de ADP y fosfato a una subunidad β , a continuación, la subunidad cambia de conformación adoptando la forma β -ATP que lo une fuertemente. Finalmente, la subunidad β cambia a la conformación β -vacía, que tiene una afinidad muy baja por el ATP y lo libera. Posteriormente la subunidad β adopta la conformación β -ADP uniendo ADP y fosfato iniciando una nueva ronda de síntesis. La corriente de protones a través de Fo hace que rote su subunidad c anclada a la subunidad γ de F1 y con cada rotación la subunidad γ se pone en contacto con una nueva subunidad β provocando su cambio a la conformación β -vacía (136,137).

El gradiente de protones generado se utiliza, además de para la síntesis de ATP, para la importación y exportación de proteínas y metabolitos hacia y desde la matriz mitocondrial, y en algunos tejidos para la obtención de calor (138,139).

6- Regulación del metabolismo energético por AMPK

La proteína AMPK es una serin/treonin quinasa capaz de sensar los cambios energéticos intracelulares. Es un heterotrímero compuesto por una subunidad α catalítica y dos subunidades regulatorias, las subunidades β y γ (140) (Esquema 5). La subunidad α en el extremo N-terminal presenta un dominio serin/treonin quinasa convencional que contiene el residuo treonina 172 (Thr172) que modula la actividad de la enzima a través de su fosforilación/desfosforilación. A continuación, se encuentra el dominio autoinhibitorio seguido del extremo C-terminal que permite la formación del complejo con las subunidades β y γ . La subunidad β contiene en el extremo N-terminal, un módulo de unión carbohidratos y el extremo C-terminal permite la unión con las otras dos subunidades. La subunidad γ presenta cuatro repetidos del motivo cistationina- β -sintasa que forman dos dominios de Bateman responsables de unir ligandos que contienen adenosina en su estructura (141). La capacidad de la subunidad γ para unirse a AMP, ADP y ATP confiere a la AMPK la capacidad de detectar el estado energético de célula (142).

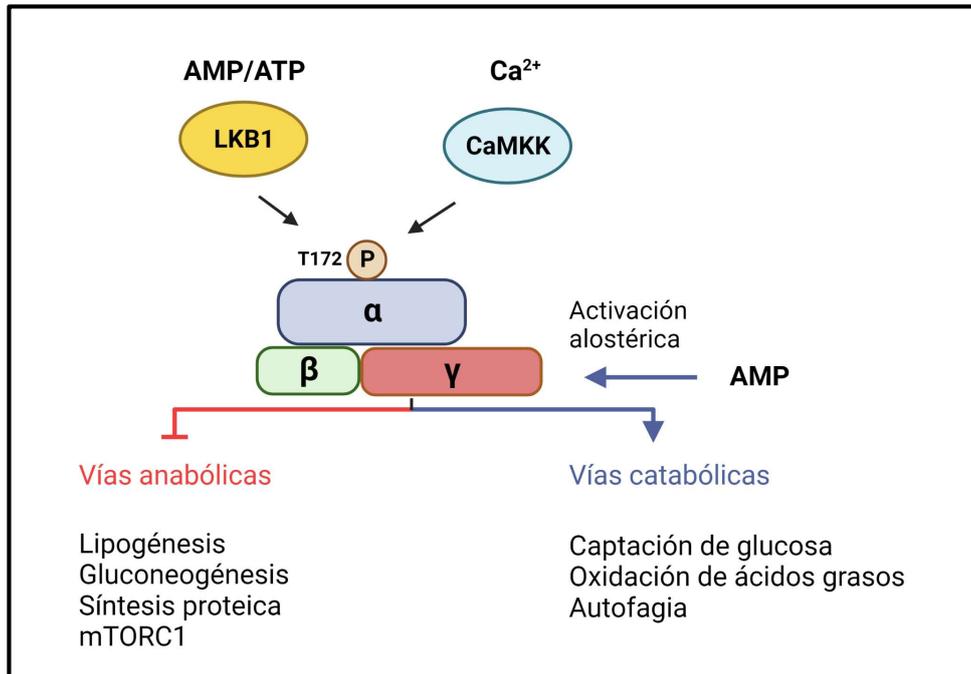
El AMP modula positivamente la actividad de la AMPK, promoviendo la fosforilación en Thr172 por la LKB1 (143) o la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CMKK2,

calcium/calmodulin-dependent kinase kinase 2) (144) (Esquema 5), e impidiendo su desfosforilación por fosfatasa. Al mismo tiempo el AMP actúa como un modulador alostérico positivo de la AMPK fosforilada. La AMPK fosforilada y activa, fosforila a su vez diversos blancos con el fin de activar el catabolismo y la producción de energía e inhibir el anabolismo (145,146) (Esquema 5).

Como se mencionó previamente AMPK regula el metabolismo lipídico. Esta quinasa fosforila e inhibe a la ACC1 y ACC2 y también fosforila e inhibe a la HMG-CoA reductasa, encargada de catalizar el paso limitante en la síntesis de colesterol. La AMPK también regula el metabolismo a nivel transcripcional, ya que fosforila e inhibe a los factores de transcripción SREBP, la proteína de unión de respuesta a carbohidratos (ChREBP, del inglés, *carbohydrate-responsive element binding protein*) y el factor nuclear de hepatocito 4 α (HNF4 α , *hepatocyte nuclear factor 4 α*) impactando negativamente en la síntesis de lípidos y de carbohidratos (85,147,148). AMPK también aumenta la captación de glucosa a través de la translocación de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 a la superficie celular (141,149), aumenta la glucólisis mediante la fosforilación de la 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa 3 y estimula la β -oxidación evitando la inhibición de la CPT1 (141).

La AMPK, además induce procesos celulares como la autofagia y la mitofagia fosforilando las proteínas diana de mamíferos del complejo de rapamicina 1 (mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1*), serina/tronina quinasa ULK1, y la fosfatidilinositol 3-quinasa tipo 3 (PIK3C3) o regulando la expresión de genes vinculados a los mismos (150). En particular, la activación de la vía LKB1/AMPK por ATM conduce a la represión del complejo 1 de mTOR (mTORC1) e induce la autofagia (32). Además, como ya mencionamos, AMPK favorece la biogénesis mitocondrial ya que es el principal regulador de PGC-1 α . Por último, promueve la fisión mitocondrial fosforilando al factor de fisión mitocondrial (MFF1), que recluta a la proteína relacionada con la dinamina-1 (DRP-1) a la membrana externa mitocondrial (109).

Vale la pena mencionar que la quinasa ATM, perteneciente a la vía de Respuesta al Daño al ADN (DDR), activa a la vía LKB/AMPK frente a un aumento del estrés oxidativo (35). Además, AMPK es capaz de fosforilar a p53 en la Ser15, el mismo residuo fosforilado por ATM, e inducir un cese de la proliferación celular (151). Estas vías son particularmente interesantes en el contexto del estudio de los cambios metabólicos en la senescencia celular.



Esquema 5. Regulación del metabolismo intermediario por la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK). La AMPK consta de tres subunidades: α , β y γ . La subunidad α es la subunidad catalítica y presenta el residuo de Thr172 que puede ser fosforilado por las quinasas LKB1 y CaMKK, la fosforilación del residuo Thr172 activa a la AMPK. En la subunidad γ se encuentra el sitio de regulación alostérica por AMP. La AMPK fosforila a su vez diversos blancos con el fin de activar el catabolismo y la producción de energía e inhibir el anabolismo. En azul y en rojo se indica la regulación positiva y negativa respectivamente. Figura adaptada de (152).

7- Regulación del metabolismo energético por Sirtuinas

La acetilación de proteínas involucra la adición de grupos acetilo del acetil-CoA a los grupos ϵ -amino de residuos lisina. Es un proceso dinámico que involucra la acción de acetiltransferasas, enzimas encargadas de transferir un grupo acetilo desde el acetil-CoA a las lisinas, y de desacetilasas, enzimas responsables de la remoción del grupo acetilo (153). También se ha propuesto que la acetilación de lisinas en la mitocondria puede darse por un mecanismo no enzimático (154). Entre las desacetilasas se encuentran las histonas deasaetiladas de clase I, II y IV que presentan un mecanismo catalítico dependiente de Zn^{2+} y las histonas desacetilasas de clase III o sirtuinas que presentan un mecanismo catalítico independiente de Zn^{2+} .

Las sirtuinas utilizan al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) como segundo sustrato y tienen como productos a la proteína desacetilada, nicotinamida y ADP-ribosa acetilada. En

mamíferos se han identificado siete isoenzimas de sirtuinas (SIRT1-SIRT7) que se diferencian en la localización subcelular y en sus blancos proteicos. Estas enzimas participan en la regulación de distintos procesos biológicos, tales como el ciclo celular, procesos inflamatorios y el metabolismo energético (155). La sirtuina 1 (SIRT1) se ubica principalmente en el núcleo, aunque puede translocarse al citoplasma. Entre sus blancos biológicos se encuentran los factores de transcripción p53, PGC-1 β y el factor inducible por hipoxia-1- α (HIF-1 α) que regulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos. También desacetila histonas regulando el silenciamiento génico. La pérdida de la SIRT1 induce la senescencia en distintos modelos celulares (156,157) y se ha propuesto que SIRT1 inhibe la secreción de factores en fibroblastos senescentes (158). La sirtuina 2 (SIRT2) es citoplasmática pero se transporta transitoriamente al núcleo durante la transición G2/M del ciclo celular, donde desacetila a la histona 4 (H4K16Ac) regulando así la condensación cromosómica durante la mitosis (159). Además de la actividad desacetilasa posee actividad ADP-ribosiltransferasa. Uno de sus principales blanco en el citosol es la tubulina (160) y puede regular distintas vías metabólicas en varios tejidos y tipos de células (161), por ejemplo desacetila a la ATP citrato liasa (ACL) promoviendo su ubiquitinación y degradación (162) y desacetila a la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Lys403) en células de leucemia aumentando su actividad y la proliferación celular (163).

Las sirtuinas 3, 4 y 5 (SIRT3, SIRT 4 y SIRT5 respectivamente) están en la mitocondria. La SIRT3 regula la actividad de varias proteínas del metabolismo energético, controlando el flujo de las vías oxidativas (164). Entre sus blancos encontramos a los complejos I y II de la cadena respiratoria (165,166) y la acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena larga (111), enzimas del ciclo de Krebs como la SDH y la IDH2 (167,168) y otras enzimas relevantes como la glutamato deshidrogenasa (169) y la acetil-CoA sintetasa 2 (170,171). SIRT3 también desacetila y activa a la enzima antioxidante superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) (172) y a la proteína trifuncional de la β -oxidación de ácidos grasos. La acetilación de las lisinas 350, 383 y 406 de la proteína trifuncional por la acetilasa mitocondrial GCN5L1 (GCN5L1, *general control of amino acid synthesis 5-like 1*) disminuye su actividad y la desacetilación catalizada por SIRT3 revierte el efecto (173,174). Las SIRT4 y 5 presentan baja eficiencia como desacetilasas. La SIRT4 tiene actividad ADP-ribosiltransferasa, modula el catabolismo de la glutamina inhibiendo la actividad de la glutamato deshidrogenasa (175,176) y posee efectos antiinflamatorios evitando la translocación de NF- κ B al núcleo (177). También presenta

actividad lipoamidasa, hidroliza la lipoamida de la subunidad E2 del complejo piruvato deshidrogenasa disminuyendo su actividad (178). SIRT5 presenta actividad desuccinilasa y demaloinasa, desempeña un papel importante en la β -oxidación de lípidos y la cetogénesis. La pérdida de SIRT5 conduce a la acumulación de acil-carnitinas de cadena mediana y larga, y la acumulación de β -hidroxibutirato (179). También regula positivamente la enzima carbamoil fosfato sintetasa perteneciente al ciclo de la urea (180).

Por otra parte, la sirtuina 6 (SIRT6) se encuentra en el núcleo donde cataliza la desacetilación de H3K9 y silencia la expresión de NF- κ B afectando los procesos inflamatorios (181); también silencia la expresión de HIF-1 α disminuyendo la glicólisis y favoreciendo el metabolismo oxidativo mitocondrial (182). Por otra parte, presenta actividad deacilasa (en particular demiristoilasa) y fuera del núcleo se asocia con efectos proinflamatorios a través de la demiristoilación y liberación de TNF- α (183). La presencia de ácidos grasos de cadena larga aumenta su actividad desacetilasa y disminuye su actividad demiristoilasa potenciando su rol antiinflamatorio (184).

La SIRT1 forma un complejo con FOXO3a y NRF1 sobre el promotor de SIRT6 promoviendo su expresión y el metabolismo oxidativo, e inhibiendo el anabolismo (185). La deleción de SIRT6 en músculo esquelético de ratones disminuye la actividad de AMPK y la expresión de genes involucrados en la captación de glucosa, la oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa. La sobreexpresión de SIRT6 tiene el efecto contrario: aumenta la expresión de genes de la β -oxidación y fosforilación oxidativa que impacta positivamente en el consumo de oxígeno basal y en la máxima capacidad respiratoria (186).

Por último, la sirtuina 7 (SIRT7) se localiza en el núcleo donde participa en la DDR reclutando a 53BP1 (187), y en el nucleolo regulando la biogénesis de ribosomas y el procesamiento del ARN ribosomal (188).

8- Metabolismo de la célula senescente

A pesar de experimentar un cese de la proliferación, las células senescentes son metabólicamente activas y existen varios reportes de cambios en vías catabólicas. Entre ellos

encontramos numerosos reportes de disfunción mitocondrial, sin embargo dada la variedad de eventos en los que la mitocondria está involucrada, bajo este término se encuentran células con características diferentes. Por un lado, se ha visto un aumento en la masa mitocondrial acompañado de un aumento en los niveles de oxidantes mitocondriales y marcadores de biogénesis mitocondrial en la senescencia replicativa, en la inducida por oncogenes y por daño al ADN (189–194). En la senescencia inducida por agentes que dañan al ADN, se observa que este incremento depende de la activación de una cascada de fosforilación que involucra a ATM, Akt, mTORC1 y el regulador de la biogénesis mitocondrial PGC1 β (190,192). Se plantea que el aumento en la formación de oxidantes mitocondriales, asociado al aumento en la masa mitocondrial, es necesario para que la DDR se mantenga en forma persistente, para el establecimiento del fenotipo secretor y la senescencia celular. También se ha visto en algunos modelos, que el aumento en la masa mitocondrial estaría asociado al aumento en el tamaño celular que sufren las células senescentes y no implicaría una mayor densidad mitocondrial por célula (193,194). Mientras que en relación al aumento en los niveles de oxidantes mitocondriales se ha observado que tanto el transporte de electrones por la cadena respiratoria, como la actividad de la NADPH oxidasa (NOX4) pueden dar origen a los mismos (195–197). Vale la pena destacar que tanto la inhibición de la formación de oxidantes (cultivando las células en condiciones de hipoxia) como el agregado de antioxidantes inhiben la inducción de la senescencia inducida por el oncogén RAS (192).

Por otra parte, varios autores muestran que tanto en la senescencia replicativa, como en aquella inducida por oncogenes o por agentes que dañan al ADN, hay una mayor actividad de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa mitocondrial (193,194,198–201). Algunos reportes sugieren la existencia de una reprogramación metabólica con una disminución de la glucólisis y producción de lactato y un aumento de la fosforilación oxidativa como fuente de ATP (194,202). Mientras que otros reportan un aumento tanto en la fermentación de la glucosa a lactato como en la fosforilación oxidativa mitocondrial, sugerente de un aumento generalizado del catabolismo celular (193,198–200).

En relación a las vías metabólicas, en la senescencia inducida por el oncogén BRAF^{V600E} y por el oncogén RAS^{G12V} se observó un aumento en la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) impulsado por una caída en los niveles de la piruvato deshidrogenasa

kinasa (PDK), y un aumento en la piruvato deshidrogenasa fosfatasa 2 (PDP2) que desfosforila a PDH y la activa (201,202). Por otra parte, en la senescencia inducida por el oncogén RAS^{G12V} también se ha observado un aumento en la β -oxidación de ácidos grasos (203) que conduce, al igual que el aumento en la actividad de la PDH (201), a un aumento del consumo de oxígeno mitocondrial. En concordancia con estos resultados se ha observado un aumento en la fosforilación y activación de la AMPK en la senescencia inducida por oncogenes (191,203,204) y en la senescencia inducida por daño al ADN, tanto por radiación (205) como por agentes genotóxicos (200). Mientras que en la senescencia replicativa (198) se ha visto un aumento en la relación de AMP/ATP, que podría activar a la AMPK.

También se ha visto que los niveles de NAD⁺ se encuentran disminuidos en la senescencia replicativa y en tejidos de mamíferos en el envejecimiento, donde se observa una disminución de los niveles de la enzima nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) (206,207). Esta enzima cataliza la conversión de nicotinamida (NAM) en mononucleótido de nicotinamida (NMN) un precursor directo de NAD⁺. Sin embargo, lo contrario se observa en la OIS, en donde los niveles de NAD⁺ y la relación NAD⁺/NADH se encuentran aumentados como consecuencia de un aumento en los niveles de la NAMPT (204).

Estos cambios metabólicos cumplen roles importantes en el establecimiento del fenotipo senescente. La fosforilación e inhibición de la actividad PDH (por aumento en la PDK1 o disminución de la PDP2) revierte el fenotipo senescente, ya que restaura la proliferación, reduce la actividad SA- β Gal y la secreción de citoquinas en la senescencia inducida por oncogenes (201). La inhibición de la actividad de enzimas de la vía de biosíntesis de NAD⁺, como la NAMPT o la nicotinamida mononucleótido adenosiltransferasa (NMNAT), así como de la carnitina palmitoiltransferasa, una enzima necesaria para el catabolismo de ácidos grasos en la mitocondria, impactan negativamente en la secreción de factores proinflamatorios por las células senescentes, pero no restauran la proliferación celular (203,204). El silenciamiento de la expresión de NAMPT también inhibe la fosforilación de p38 y la subunidad p65 de NF- κ B, reguladores del fenotipo secretor en la senescencia inducida por el oncogén RAS^{G12V} (204).

En lo que refiere al anabolismo celular, el establecimiento de la senescencia inducida por oncogenes se acompaña de una disminución en los niveles de deoxirribonucleótidos trifosfato

(dNTP). El mismo se debe a la represión de la expresión de la ribonucleótido reductasa M2, enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis de dRNT, por p53 y pRb. Los fibroblastos senescentes cultivados durante catorce días en presencia de dRNT exógenos son capaces de revertir el fenotipo senescente (208). En la senescencia inducida por oncogenes se ha observado también una disminución de la síntesis de ácidos grasos debida a un aumento en la fosforilación de la enzima ACC por AMPK (203).

En la senescencia replicativa se observa una disminución de la enzima málica mitocondrial dependiente de NAD(P)⁺ (ME2), y la sobreexpresión de esta enzima dilata la entrada en la senescencia (209). Mientras que el silenciamiento de la expresión de ME2, o de la isoforma citosólica de la enzima málica (ME1), induce a la senescencia celular (209). Se ha observado que el factor de transcripción p53 reprime la expresión de las enzimas ME1 y ME2, y recíprocamente, la disminución de la expresión de ME1 o ME2 aumenta los niveles, fosforilación y actividad de p53, induciendo la senescencia celular en fibroblastos (209). Una consecuencia de la caída en la actividad de las enzimas ME1 y ME2 es la disminución de los niveles de NADPH, metabolito implicado en la síntesis lipídica (209). Vale la pena destacar que p53 también inhibe a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad de la vía de las pentosas. Por tanto, p53 regula la producción de NADPH a distintos niveles, con un efecto negativo sobre vías del anabolismo (210).

9- La disfunción mitocondrial induce la senescencia celular

Aunque la senescencia celular se acompaña en muchos casos de un aumento en vías metabólicas mitocondriales, varios autores han mostrado que agentes o eventos que afectan la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial son capaces *per se* de inducir senescencia celular. La exposición a rotenona o antimicina A, inhibidores de los complejos I y III, así como la depleción del ADNmt, la inhibición de la lanzadera de malato-aspartato, inducen la senescencia celular pero inhiben la secreción de múltiples componentes del SASP (211–213). El silenciamiento de la SIRT3, sirtuina conocida por su rol activador del catabolismo mitocondrial, tiene un efecto similar promoviendo la senescencia celular pero alterando el SASP (211). El silenciamiento de la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) resulta en un

aumento en los niveles de oxidantes, la caída en la actividad SDH y la aparición de varios marcadores de senescencia (212). De hecho, se ha acuñado el término senescencia asociada a la disfunción mitocondrial (MiDAS, del inglés: *mitochondrial dysfunction-associated senescence*) para referirse a este fenómeno, y se plantea que el mismo depende de una disminución en la relación NAD/NADH, de la fosforilación y activación de AMPK y fosforilación de p53 en la Ser15 por esta quinasa (211).

Por otra parte se ha visto en melanocitos que el silenciamiento de la enzima PDK1 que conduce a la desfosforilación y activación de la PDH y al aumento en la respiración mitocondrial, también es capaz de inducir la senescencia celular (201), sugiriendo que la caída en la actividad de la cadena de transporte de electrones no sería el evento promotor de la senescencia.

Las células senescentes también se acumulan en modelos murinos de disfunción mitocondrial y envejecimiento prematuro. Por ejemplo, en ratones transgénicos portadores de una mutación en la polimerasa γ mitocondrial (POLG), que acumulan mutaciones en el ADNmt y envejecen prematuramente, se ha visto un aumento de células senescentes a nivel del tejido adiposo y la epidermis (211). Además se ha constatado tanto un aumento en el número de células senescentes como una disminución en la función mitocondrial durante el envejecimiento del organismo (214–216). Estos reportes sugieren a la disfunción mitocondrial como un impulsor de la senescencia celular *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudio del metabolismo de los ácidos grasos en fibroblastos humanos senescentes por exposición a agentes que dañan el ADN o expresión del oncogén H-RAS^{G12V}, evaluando la vinculación con el fenotipo secretor y la regulación por sirtuinas.

Objetivos específicos y actividades

- 1- Establecer modelos de senescencia inducida por el oncogén H-RAS^{G12V}, peróxido de hidrógeno o doxorubicina.
- 2- Estudiar la síntesis de ácidos grasos en las células senescentes.
- 3- Estudiar alteraciones en la función mitocondrial y β -oxidación de ácidos grasos en la senescencia inducida por el oncogén RAS
- 4- Evaluar en la senescencia inducida por el oncogén RAS la vinculación entre la adquisición del fenotipo secretor y el aumento en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos, y su regulación por NF- κ B
- 5- Indagar si el aumento en el metabolismo oxidativo de las células senescentes se debe a cambios en la acetilación de proteínas

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich a no ser que se indique lo contrario.

2- Cultivo celular

Los fibroblastos fetales de pulmón humano IMR-90 se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC). Los fibroblastos cutáneos humanos BJERRAS fueron donados gentilmente por el Dr. Utz Herbig (Rutgers New Jersey Medical School, Estados Unidos). Estas células se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 5 mM glucosa, 10% (v/v) suero fetal bovino (SFB, Gibco), 50 U/ mL penicilina y 50 µg/ mL estreptomycin. Las células 293T fueron cedidas por el Dr. Toren Finkel (National Institutes of Health, Bethesda Maryland, EEUU) se cultivaron en DMEM 25 mM de glucosa suplementado con 10% (v/v) SFB, 50 U/ mL penicilina y 50 µg/mL estreptomycin. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en una incubadora con CO₂ (95 % de aire y 5 % de CO₂) y se subcultivaron utilizando una solución de tripsina/EDTA (0.05/0.02 % m/v).

3- Inducción de la senescencia por exposición a H₂O₂

Se sembraron los fibroblastos IMR-90 con una densidad de $1-4 \times 10^4$ células/cm² 24 h antes del tratamiento. Se expusieron a 600 µM de H₂O₂ durante 2 horas en el medio de cultivo con SFB a 37 °C y 5 % de CO₂ (3,4,217). A los cuatro días de la incubación se dividieron al tercio, y al quinto día se volvieron a exponer a 600 µM de H₂O₂ en las condiciones descritas. La concentración stock de H₂O₂ se determinó espectrofotométricamente ($\epsilon_{240 \text{ nm}} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) previo a cada ensayo (218).

4- Inducción de la senescencia por exposición a doxorubicina

Se sembraron los fibroblastos IMR-90 con una densidad de $1 - 4 \times 10^4$ células/cm² 24 h antes del tratamiento, y se expusieron a 0.2 µM de doxorubicina durante 24 horas en el medio de cultivo con SFB a 37 °C y 5 % de CO₂.

5- Inducción de la senescencia por expresión del oncogén RAS

A continuación, se describen los procedimientos utilizados para inducir la senescencia por expresión del oncogén RAS¹ por dos métodos diferentes:

5.1- Transducción de células IMR-90 con lentivirus portadores del plásmido que codifica a H-RAS^{G12V}

El plásmido pLenti CMV/TO RasV12 Puro (w119-1) para la expresión de la proteína H-RAS^{G12V} portadora de una sustitución glicina –valina en posición 12 (G12V) fue cedido amablemente por Eric Campeau (plásmido Addgene #22262). Los plásmidos pCMV-dR8.2 dvpr y pCMV-VSVG fueron donados por Bob Weinberg (plásmidos Addgene #8455 y #8454, respectivamente (219)). Los lentivirus control se generaron con el plásmido pLKO.1 (Addgene #10878). Los lentivirus portadores de los plásmidos se produjeron en células 293T de acuerdo con los protocolos establecidos por el Broad Institute RNAi Consortium (220). Un día antes de la transfección se sembraron 2.5×10^6 células 293T en placas de 10 cm. Se transfectaron las células 293T con 1 μg de plásmido pCMV-dR8.2 dvpr, 0.125 μg de plásmido pCMV-VSVG y 1 μg del plásmido portador del gen H-RAS^{G12V} o pLKO.1 en presencia de Turbofect (Thermo Fisher Scientific). A las 24 horas se cambió el medio y 24 horas después se colectó el medio con las partículas lentivirales, se filtró con filtros de 0.4 μm , se centrifugó y almacenó a -80°C . La transducción de las células IMR-90 con los lentivirus se realizó en medio completo con 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de hexadimetrina (Polybrene), con una multiplicidad de infección de 1-5. Las células infectadas se seleccionaron en medio de cultivo suplementado con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puomicina durante 7 días. Se verificaron los niveles de la proteína H-RAS^{G12V} por Western blot con un anticuerpo específico anti-RAS (Cell Signaling Tech #3339, dilución 1:1000). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas de bioseguridad establecidas en (221). Los desechos biológicos sólidos generados se descartaron por medio de un acuerdo entre la Facultad de Medicina y la compañía Aborgama, que prevé la esterilización de los mismos utilizando un autoclave.

5.2- Expresión de la proteína H-RAS^{G12V} fusionada a un dominio del receptor de la hormona esteroidea (HBD, hormone binding domain) en cultivos de BJERRAS

¹ A lo largo del texto se utilizarán de forma indistinta los términos: oncogén RAS, H-RAS^{G12V} y RAS^{G12V}.

Los fibroblastos cutáneos BJERRAS expresan a la proteína de fusión ERRAS en forma inducible por 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT). ERRAS está compuesta por H-RAS^{G12V} y una forma mutante del dominio de unión al ligando del receptor de estrógenos (ER). La mutación en G525R en ER determina que la proteína sea insensible al 17 β estradiol, pero responda a concentraciones bajas del ligando sintético 4-OHT. Para inducir la senescencia el medio de cultivo se suplementó con 200 nM de 4-OHT durante los días indicados en cada experimento (222). La expresión de la proteína H-RAS^{G12V} se verificó por Western blot.

6- Proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular se realizaron curvas de crecimiento del cultivo. Las células se colectaron a distintos tiempos luego del tratamiento utilizando tripsina/EDTA (0.05/0.02 % m/v). Cada dos o tres días se tripsinizaron las células, se incubaron con Trypan Blue (0.4 %) y se contaron utilizando cámara de Neubauer y microscopio óptico o con el contador automático (Countess, Invitrogen). Esta tinción nos permitió diferenciar las células muertas de las células vivas, ya que las últimas son impermeables al Trypan Blue (223).

La proliferación celular también se evaluó por inmunofluorescencia con la incorporación de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) al ADN celular (224). El cultivo celular se mantuvo con BrdU (BD Pharmingen) 10 μ M durante 24 o 48 horas (se especifica en cada experimento) y luego se fijaron las células con metanol durante 5 min a -20 °C. Posteriormente se desnaturalizó el ADN incubando a las células fijadas con HCl 2 N y Tritón X-100 0.5% en buffer fosfato salino (PBS: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se bloquearon las células con una solución 3 % de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La incorporación de BrdU se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-BrdU (1:50) (Becton Dickinson) en una solución 3 % BSA, Tween 0.1 % en PBS durante 1 hora. Se descartó el anticuerpo primario y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 488 anti-IgG (H+L) de ratón (Thermo Fisher Scientific, #A28175). Se incubaron a las células con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Thermo Fisher Scientific) 1 μ g/ml durante 5 minutos a temperatura ambiente para teñir los núcleos. El porcentaje de células positivas fue calculado

contando más de 100 células en cinco campos elegidos al azar. Se analizaron como mínimo tres placas por condición en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE200.

7- Actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia

Se determinó la actividad SA- β -Gal empleando el sustrato artificial cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal, Life Technologies), de acuerdo a lo descrito (8). Los fibroblastos cultivados en placas de 6 pocillos se fijaron durante 5 minutos con formaldehído 3 % (v/v) en PBS, y se incubaron toda la noche a 37 °C y en oscuridad con X-gal 1 mg/mL en una solución con: 5 mM ferrocianuro de potasio, 5 mM ferricianuro de potasio, 40 mM ácido cítrico, 40 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio y 2 μ M cloruro de magnesio. Se ajustó el pH de la solución a pH 6 con NaOH. Todas las soluciones se prepararon en el día del ensayo incluyendo un stock 20x del reactivo X-gal disuelto en N, N-dimetilformamida. Las células se analizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE200, se calculó el porcentaje de células teñidas positivamente contando más de 100 células en 5 campos elegidos al azar.

8- Ensayos de Inmunofluorescencia

Los fibroblastos cultivados sobre placas de permanox (Thermo Fisher Scientific), se fijaron con paraformaldehído 4 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se permeabilizaron con 0.2 % Triton X-100 en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, se bloquearon 0.2 % Tritón X-100 y 3 % BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y finalmente se incubaron con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Para estudiar los focos de daño al ADN se utilizaron los anticuerpos primarios anti H2AX fosforilada (Ser139, γ -H2A.X) (clon JBW301 1:1000, Millipore) o anti 53BP1 (1:200, Cell Signalling #4937), para estudiar la localización subcelular de p65 se utilizó anti p65 (1:50, Cell Signalling #8242) y para estudiar la localización de SIRT6 se utilizó anti SIRT6 (1:50, Cell Signaling #12486S). A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los

anticuerpos secundarios utilizados fueron Alexa Fluor® 594 anti-IgG (H+L) anti-ratón (1:800, Thermo Fisher Scientific, #A32742) y anti-conejo IgG (H+L) conjugado con rodamina (1:1000, Jackson ImmunoResearch #111-025-144) para detectar los focos de γ -H2AX y 53BP1. Para detectar a p65 y SIRT6 se utilizó el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific #A11034). Entre cada paso se realizaron tres lavados con PBS. Las proteínas marcadas se visualizaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE200 o con un microscopio confocal de fluorescencia Leica, SP5. Se contaron más de 100 células en 5 campos elegidos al azar en cada condición. Los núcleos se tiñeron con DAPI como fue descrito anteriormente en el punto 6 de materiales y métodos (225).

9- Extracción de proteínas, electroforesis y Western blot

Se lisaron los fibroblastos en un buffer de lisis a 4 °C (20 mM Tris pH 7.5, 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl) en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa: EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, pirofosfato de sodio 25 mM, β -glicerofosfato 1 mM, Na_2VO_4 1 mM, fluoruro de sodio (NaF) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, inhibidor de proteasas Sigma FAST e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem). Para evaluar los niveles de acetilación se agregaron al buffer de lisis inhibidores de desacetilasas 5 mM nicotinamida y 1 μM tricostatina A. La concentración de proteínas se determinó con la técnica del ácido bicinonínico (Pierce, Thermo Scientific). Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. En algunos experimentos se utilizaron geles Tris-acetato con un gradiente de poliacrilamida entre 3 % y 8% (Thermo Fischer Scientific). Para llevar a cabo los Western blots las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (LI-COR Bioscience), la transferencia se realizó a 20 V durante toda la noche a 4 °C en buffer Tris-Glicina, 20 % (v/v) metanol. Luego se bloquearon las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente en buffer Tris salino (TBS: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM) con Tween 0.1 % y leche descremada 5 %. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4 °C; se anexa tabla con los anticuerpos primarios utilizados. Para revelar se utilizaron los anticuerpos secundarios: IRDye® 800 anti-IgG (H+L) de conejo (#926-32211, 1:15000) y IRDye® 680 anti-IgG (H+L) de ratón (#926-68070, 1:10000) de LI-COR Bioscience. Se realizaron tres lavados con TBS Tween 0.1 %, entre cada paso. Se utilizó el

equipo Odyssey (LI-COR Bioscience) para detectar las bandas en las membranas y las imágenes se analizaron con el software Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

10- Secreción de citoquinas

La secreción de citoquinas se evaluó por medio de un ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se incubaron los fibroblastos durante 6 horas en medio DMEM sin SFB [9]. El medio se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos y 4 °C para remover células muertas y restos de células y se almacenó a -80 °C. Se analizó el contenido de IL-1 β , IL-6, IL-8 y GRO- α por medio de ELISA utilizando kits (DuoSet ELISA kits, R&D Systems o ELISA MAX™ Deluxe Set, BioLegend). Los resultados se normalizaron tomando en cuenta la concentración de proteínas del lisado celular medida por la técnica del ácido bicinonínico (Pierce, Thermo Scientific) o contando el número de células totales (203,226).

11- Expresión génica por RT-qPCR

Se aisló el ARN total con TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) y se realizó la precipitación del ARN con isopropanol, posteriormente se cuantificó el ARN aislado en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific). Luego se obtuvo, a partir de 1 μ g de ARN total, el ADN copia mediante transcripción reversa con primers al azar y la transcriptasa reversa SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo las PCR en el analizador Corbett Rotor-Gene 6000 (Thermo Fisher Scientific) con el kit QuantiTect® SYBR Green® (Quiagen). Todas las PCR incluyeron la amplificación de β -actina como gen normalizador. Para cada gen, se calculó la expresión relativa a la expresión de actina y al control por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (227). Se utilizaron los siguientes cebadores para ACC1 y β -actina *forward* y *reverse* respectivamente:

ACC1: 5'-ATTGGGGCTTACCTTGCCG-3' y 5'-CGAGGACTTTGTTGAGGGCT-3'

β -actina: 5'-CTACGAGCTGCCTGACGG-3' y 5'-AGGACTCCATGCCAGGAA-3'

La expresión de SIRT1, SIRT3, SIRT6 fue evaluada en el Instituto Pasteur de Montevideo en colaboración con la Dra. Bresque y el Dr. Escande. Se utilizaron los siguientes cebadores *forward* y *reverse* respectivamente:

SIRT1: 5'-TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGG-3' y 5'-ACAGCTTCACAGTCAACTTTGT-3'

SIRT3: 5'-GACATTCGGGCTGACGTGAT-3' y 5'-GACATTCGGGCTGACGTGAT-3'

SIRT6: 5'-ACTGGCGAGGCTGGTCTG-3' y 5'-GCTCTCAAAGGTGGTGTCG-3'

β-actina: 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' y 5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'

12- Evaluación de la relación ADNmit/ADNnuc

El ADN total de los cultivos celulares se extrajo con el reactivo DNAzol (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante, la precipitación del ADN con etanol 100% se realizó a -20 °C durante 20 minutos. El ADN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm y se controló la pureza de las muestras calculando la relación A260/A280 medida en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron los siguientes cebadores obtenidos de la literatura (228): 5'-ACCGCGGTCATACGATTAAC-3' (*forward*) y 5'-CCCAGTTTGGGTCTTAGCTG-3' (*reverse*) para el gen del ARN ribosomal 12S codificado por el ADN mitocondrial; y 5'-CACCCACTCCCTCTTAGCCAAT-3' (*forward*) y 5'-GGCCATATGTGTTGGAGATTGAGAC-3' (*reverse*) para el gen del ARN ribosomal 18S codificado por el ADN nuclear. Se utilizaron tubos separados para la amplificación de ADNmit y ADNnuc, donde se colocaron 15 ng de ADN total. Se utilizó el kit QuantiTect® SYBR Green® (Qiagen) con 0.5 μM de cada primer. Las medidas se realizaron en el analizador Corbett Rotor-Gene 6000 (Thermo Fisher Scientific). La relación ADNmit/ADNnuc se calculó como $2^{(Ct_{nuc}-Ct_{mit})}$ y se expresaron los resultados relativos a la condición control.

13- Análisis de lípidos por TLC

Para realizar la extracción lipídica se levantaron entre $0.5-2 \times 10^6$ células/condición con tripsina/EDTA (0.05/0.02 % m/v), se centrifugaron a 800 g 5 minutos y el pellet se resuspendió

en 1 mL de agua. Se agregaron 2.5 mL de hexano/isopropanol/ácido acético (30:20:2) y se mezcló vigorosamente. Se agregaron 2.5 mL de hexano, se mezcló nuevamente y se centrifugó 5 min a 1800 rpm para separar las fases. Se pasaron 3 mL de la fase superior a tubos de vidrio, se evaporó el solvente en condiciones de vacío (vacío 100 mBar y 45 °C) y el producto se resuspendió en 100 µL de hexano. Para llevar a cabo las cromatografías de capa fina (TLC, del inglés thin layer chromatography) se mezcló y sembró todo el volumen en la placa, utilizando un capilar. Para la corrida se utilizó primero la fase móvil cloroformo/metanol/ agua (60:30:5) hasta la mitad de la fase estacionaria (fase normal, sílica) y después se utilizó la fase móvil hexano/dietil éter/ácido acético (80:30:1). Se reveló con yodo y/o etanol/ácido sulfúrico (95:5) y calor. En la TLC se pueden discriminar los siguientes lípidos: ésteres de colesterol (EC), triglicéridos (TAG), ácidos grasos libres (AGL), colesterol (C) y fosfolípidos (FL).

14- Síntesis de ácidos grasos

La síntesis lipídica *de novo* se estudió a través de la incorporación de [2-¹⁴C]-acetato a la fracción soluble en disolvente orgánico de las células (229). En el día del experimento se lavaron las células con PBS y se incubaron durante 2 horas en DMEM con glucosa 25 mM y SFB 0.1 %. Se le agregó la sal de sodio del [2-¹⁴C] ácido acético al medio de cultivo durante 3 h (1 µCi, Perkin Elmer) a 37 °C. Las células se lavaron con PBS, se recolectaron usando solución de disociación tripsina/EDTA (0.05/0.02 % m/v), y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. El pellet se lavó con PBS y se centrifugó nuevamente. Luego se resuspendió en 0.75 mL CHCl₃:MeOH (1:2 v/ v), se le añadió 0.25 mL de CH₃Cl, 0.25 mL dH₂O y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó y se recuperó la fase superior (230). La radioactividad se determinó usando un contador de centelleo líquido (Perkin-Elmer). Se realizaron controles con un inhibidor de la FAS (4-metilen-2-octil-5-oxotetrahidrofurano-3-ácido carboxílico, C75 100 µM) (231) o de la ACC (5-(tetradeciloxi)-2-ácido furoico, TOFA) (232).

15- Medidas de velocidad de consumo de O₂ y acidificación extracelular

Las velocidades de consumo de O₂ y de acidificación extracelular se determinaron simultáneamente con el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Agilent). Los valores obtenidos se normalizaron tomando en cuenta la cantidad de proteínas del lisado celular, medida por la técnica del ácido bicinconínico (Pierce, Thermo Fisher Scientific) (233). Se sembraron las células en placas de cultivo V7 de poliestireno (Agilent). El día del ensayo se reemplazó el medio de cultivo por el medio del ensayo (DMEM suplementado con NaCl 32 mM, glucosa 5 mM, piruvato de sodio 1 mM, glutamina 2 mM, pH 7.4) y se incubó durante 1 hora a 37 °C en incubadora sin CO₂. El consumo de O₂ se midió antes y después del agregado secuencial de inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa. Se utilizaron: un inhibidor de la ATP sintasa (oligomicina 0.5 μM) que nos permitió evaluar el consumo de oxígeno de la célula dependiente e independiente de la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa, un desacoplante (carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona, FCCP 1 μM) que nos indicó cual es el máximo consumo de oxígeno que puede tener la célula en situaciones de demanda energética, y un inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria (antimicina A, AA 1 μM) para distinguir el consumo de oxígeno mitocondrial del no mitocondrial. La respiración resistente al agregado de antimicina A se sustrajo a todas las medidas para determinar el consumo de oxígeno debido exclusivamente al transporte de electrones en la cadena respiratoria (233,234).

A partir de los ensayos de consumo de oxígeno se calculó el índice de control respiratorio (RCR, *respiratory control ratio*) como la relación entre el consumo de oxígeno máximo (obtenido en presencia de FCCP) y el consumo de oxígeno independiente de la síntesis de ATP (resistente al agregado de oligomicina). Este índice toma en cuenta el estado de acople mitocondrial y la capacidad de oxidación de sustratos (233,235) y es indicativo de la función mitocondrial. También se determinó la capacidad de reserva como la relación entre el consumo de oxígeno máximo (obtenido en presencia de FCCP) y el consumo de oxígeno basal, que da una idea de cuán cerca de su límite bioenergético una célula está operando y cuan preparada está para responder a un aumento en la demanda ATP. Por último se determinó la eficiencia de acoplamiento, que representa la fracción basal del consumo de oxígeno destinada a la síntesis de ATP, esta se calculó como la relación entre la respiración sensible a oligomicina y la respiración basal (233).

16- β -oxidación mitocondrial

Se midió el consumo de oxígeno basal en presencia de oleato (OA) conjugado con BSA (OA:BSA 0.1 mM:0.2 % m/ v). Se añadió etomoxir 100 μ M y por último se agregó antimicina A 2.5 μ M para descontar el consumo de oxígeno de fuentes no mitocondriales. Se realizaron controles agregando BSA sin conjugar. Los valores obtenidos se normalizaron tomando en cuenta la concentración de proteínas del lisado celular medido por la técnica del ácido bicinónico (203).

17- Fraccionamiento subcelular

Se partió de dos placas de 140 cm² de fibroblastos por condición. Se lavaron las células con PBS a 4 °C, y se levantaron mecánicamente en buffer de fraccionamiento (BF: sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, citrato de sodio 2 mM, y succinato de sodio 1 mM). Se centrifugaron las células a 1000 g durante 5 minutos y el *pellet* se resuspendió en 1 mL de BF; y se homogenizaron a usando un Potter-Elvehem realizando 10 pasajes del émbolo a 800 rpm. Se centrifugó el lisado celular a 1500 g durante 10 min, y se obtuvo el *pellet* (que contenía a la fracción nuclear) y el sobrenadante (que contenía a las fracciones citosólica y mitocondrial) que se centrifugó a 13000 g, 10 minutos. El *pellet*, con la fracción mitocondrial, se resuspendió en 200 μ l de BF con 1 % Triton X-100. Antes de guardar las muestras a -80 °C, para realizar Western blot, se le agregaron los inhibidores de proteasas (EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₂VO₄ 1 mM, PMSF 1 mM, inhibidor de proteasas Sigma FAST) y desacetilasas (nicotinamida 5 mM y tricostatina A 1 μ M). El *pellet* que contenía a la fracción nuclear se resuspendió en 1 mL de buffer hipotónico (Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, pH 7.4 con inhibidores de proteasas y desacetilasas), se homogenizó a usando un Potter-Elvehem con 30 pasajes de émbolo a 1800 rpm. Se centrifugó a 1000 g, 15 minutos y el *pellet* que contenía a las proteínas nucleares se resuspendió en 200 μ L de buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, NP-40 0.5 %), se incubó rotando 20 min y se sonicó. Se centrifugó a 10000 g 10 min y se guardó el sobrenadante que contenía a las proteínas nucleares solubilizadas y el resto de las fracciones subcelulares a -80 °C. El resto del procedimiento se realizó a 4 °C (236).

18- Actividad aconitasa

Se estudió la actividad aconitasa en las fracciones subcelulares por espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro UV Visible SHIMADZU UV-2450. Se midió la concentración de cis-aconitato a 240 nm ($\epsilon = 3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) después del agregado de isocitrato 8 mM en buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7.8. Los ensayos se realizaron en ausencia y presencia de un inhibidor de la enzima, fluorocitrato 35 mM, para discriminar el aumento en la absorbancia ocasionado por la reacción en estudio, de aquellos debidos a otras reacciones que pudieran estar transcurriendo en paralelo (237).

19- Análisis de datos, estadística, gráficos y esquemas

Se utilizó el software GraphPad Prism para generar los gráficos y realizar los análisis estadísticos. Las comparaciones entre dos grupos se analizaron mediante test de Student de dos colas para muestras pareadas o no pareadas, según correspondía, con valores de P: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ y *** $p < 0.0001$. Para comparaciones de más de dos grupos se utilizó el test ANOVA de una o dos vías, dependiendo del caso, y análisis Tukey, para comparaciones múltiples considerando una diferencia significativa con un valor de $P < 0.05$. En todos los casos graficamos la media \pm el desvío estándar (SD). En todos los experimentos el valor de n representa el número de muestras biológicas independientes (pocillos, placas o cubreobjetos independientes por grupo o condición). Cuando se aplicó estadística paramétrica se supuso normalidad y homogeneidad de varianzas. Los esquemas se crearon con BioRender.com

RESULTADOS

1- Modelos de senescencia celular

Las células senescentes presentan algunas características comunes, pero son fenotípicamente heterogéneas; y los marcadores que presentan varían según el tipo celular y el estímulo inductor de la senescencia (238). En este trabajo se propuso caracterizar algunos aspectos del metabolismo celular en modelos de senescencia celular inducidos por diferentes estímulos: exposición a H_2O_2 , exposición a doxorubicina o expresión del oncogén (H-RAS^{G12V}), en una misma línea celular, los fibroblastos humanos IMR-90. Por último, se confirmaron algunos de los resultados en otro modelo de senescencia, inducida por la expresión del oncogén RAS en fibroblastos cutáneos (BJERRAS).

1.1- Inducción de senescencia celular por exposición a H_2O_2

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un oxidante relativamente débil, pero al reaccionar con metales reducidos, como por ejemplo Fe^{2+} , el H_2O_2 forma un ion hidroxilo (OH^-) y un radical hidroxilo (OH^*) (reacción de Fenton), una especie extremadamente reactiva. El radical hidroxilo, oxida componentes celulares como lípidos, proteínas, bases nitrogenadas, y puede inducir cortes de hebra simple y doble en el ADN (239–241).

Para establecer el modelo de senescencia por exposición a H_2O_2 se comenzó realizando una curva de dosis respuesta, exponiendo las células IMR-90 a distintas concentraciones de H_2O_2 (0 - 600 μM) en el medio de cultivo (DMEM, SFB 10 %) durante 2 horas y se contó, a las 48 horas, las células vivas utilizando tinción de exclusión con Trypan blue. Se observó una disminución en el número de células del cultivo dependiente de la concentración de H_2O_2 agregada. Luego se realizaron curvas de crecimiento evaluando el número de células del cultivo a diferentes tiempos después de la exposición a H_2O_2 . Se realizaron estos experimentos a distintas concentraciones de H_2O_2 y llevando a cabo una o dos exposiciones a H_2O_2 (no se muestra). Tomando en cuenta los datos obtenidos y los reportados en la literatura (217) se decidió realizar dos exposiciones durante 2 horas a H_2O_2 600 μM en medio de cultivo (DMEM, SFB 10 %) separadas por un intervalo de 5 días.

Luego de la exposición a H_2O_2 se evaluó la activación de la respuesta al daño al ADN (DDR) al primer y séptimo día de la segunda exposición (Fig. 1). Al primer día de la segunda exposición a H_2O_2 se observó un aumento en la fosforilación de ATM en la serina 1981, esta modificación postraducciona l conduce a la activación de la quinasa ATM. De acuerdo con esto se observó también la fosforilación de dos de los sustratos de ATM, p53 en la serina 15 y H2AX en la serina 139. También se observó que el factor de transcripción p53 aumentó sus niveles y aparecieron focos nucleares de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX). Estos cambios evidenciaron la activación de la DDR, y se acompañaron con la hipofosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb), indicando que la exposición a H_2O_2 conduce tempranamente a la detención del ciclo celular. Luego se evaluaron los niveles y fosforilación de estas proteínas al séptimo día de la segunda exposición al H_2O_2 , y para nuestra sorpresa no se encontró a ATM fosforilada ni a los sustratos de esta quinasa p53 y H2AX fosforilados, indicando que la DDR no se encontraba activa. Sin embargo, pRb se encontraba hipofosforilada, sugiriendo que las células expuestas al H_2O_2 continuaban con el ciclo celular detenido al día siete de la doble exposición al H_2O_2 .

Con el objetivo de confirmar si la hipofosforilación de pRb era suficiente para detener la proliferación celular se contaron las células viables en los cultivos utilizando tinción de exclusión con Trypan blue. A partir del segundo día de la exposición a H_2O_2 se observó una disminución significativa de las mismas en los cultivos tratados con respecto a la condición control (Fig. 2A). También se estudió la incorporación de BrdU al ADN (Fig. 2B), un análogo de la timidina que se incorpora al ADN en la fase S del ciclo celular. Se observó que las células expuestas a H_2O_2 incorporaron menos BrdU al día 1 y 7 del tratamiento, con respecto a la condición control.

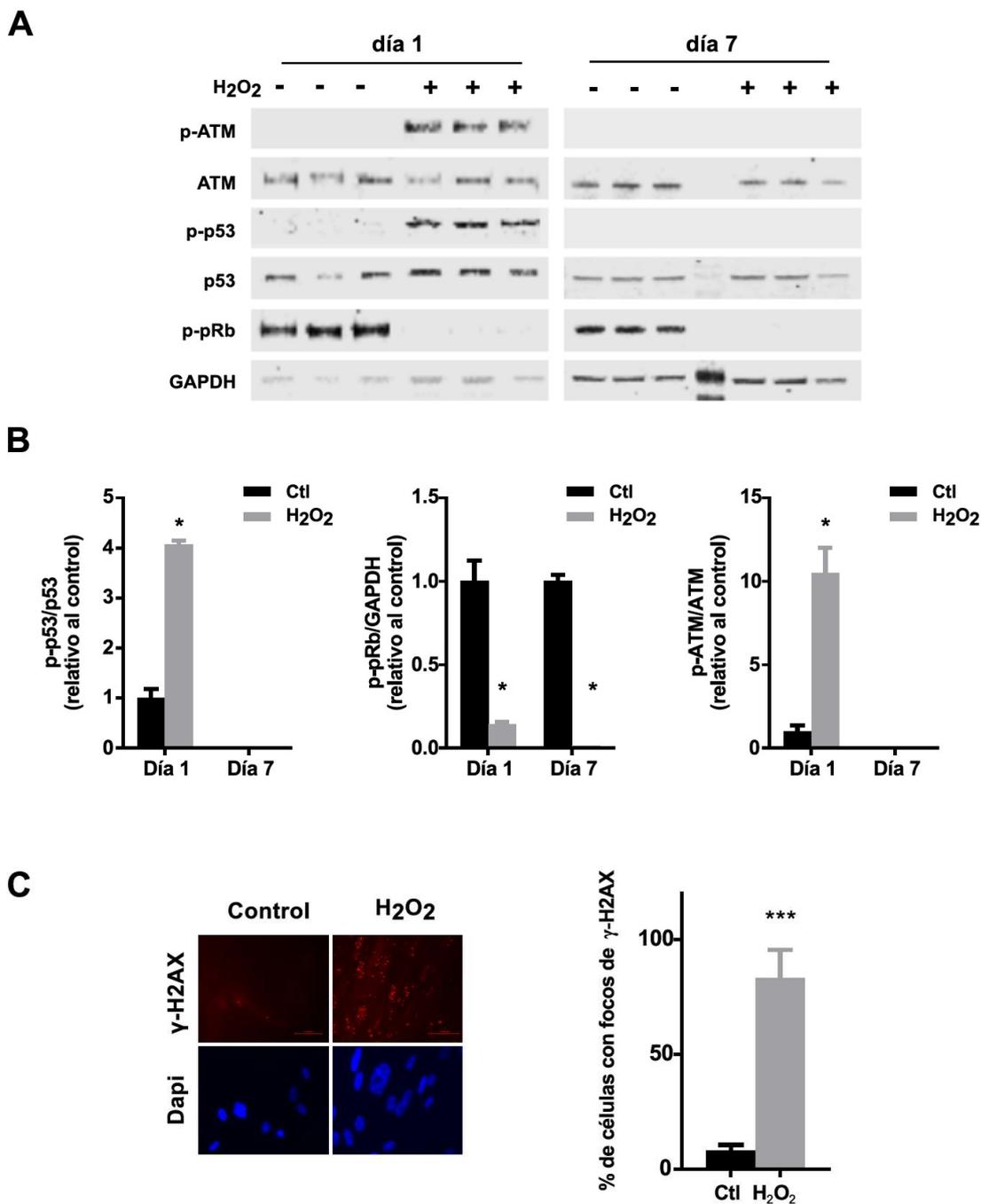


Figura 1. La exposición a H₂O₂ activa transitoriamente la DDR. Los fibroblastos IMR-90 fueron incubados en ausencia (Control) o presencia de H₂O₂ (600 μ M) durante 2 horas, en dos ocasiones. **A-** A los días 1 y 7 de la segunda exposición se lisaron las células y se analizó por Western blot los niveles de ATM, p53, p-ATM (Ser1981), p-p53 (Ser15) y p-pRb (Ser 807/811). **B-** Se cuantificaron los niveles de las proteínas de los Western blot del panel A y normalizaron respecto a los niveles de GAPDH, los resultados se expresan relativos al control (Ctl) (n=3). **C-** Al día 1 de la segunda exposición se realizó una inmunofluorescencia para γ -H2AX, (Ser139) y se determinó el porcentaje de células con focos nucleares. Los núcleos se tiñeron con DAPI (n=3). Los resultados representan el promedio \pm SD y las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, Ctl vs H₂O₂, * p < 0.05, *** p < 0.0001.

Por otra parte, se midió la actividad β -Galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal). Como se observa en la Fig. 2C la exposición al oxidante induce un aumento significativo en la actividad SA- β -Gal a partir del día 7, sugerente de un aumento de la cantidad de lisosomas. A los 12 días luego de la última exposición el 95 ± 1 % de las células expuestas a H_2O_2 presenta una tinción positiva para la enzima, mientras que tan sólo el 3.7 ± 0.4 % de las células control se encuentra teñida.

Para terminar de caracterizar el modelo de senescencia por exposición H_2O_2 se evaluó la existencia de un fenotipo secretor en las células IMR-90. Mediante ELISA se intentó cuantificar la secreción de citoquinas Gro- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 a los días 1, 7 y 14 post tratamiento con H_2O_2 en presencia de un control positivo. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de estas citoquinas en el medio de cultivo de las células tratadas o sin tratar (Fig. 6).

Estos resultados indican que el tratamiento con H_2O_2 indujo la senescencia en las células IMR-90, caracterizada por el cese en la proliferación celular, aumento en el número de células positivas para SA- β -Gal, y activación de la DDR. Sin embargo, se notó que en este modelo la activación de la DDR fue transitoria y no se detectó la presencia de un fenotipo secretor.

1.2- Inducción de la senescencia celular por exposición a doxorrubicina

La doxorrubicina es un quimioterápico que se utiliza para tratar una variedad de tumores. Su efecto lo ejerce a través de la inhibición de la topoisomerasa II, generando cortes en una hebra de ADN o en las dos hebras (242). Para obtener cultivos de células senescentes por exposición a doxorrubicina se expusieron las células IMR-90 a $0.2 \mu M$ de doxorrubicina durante 24 horas en DMEM (10 % SFB) y se prosiguió a identificar marcadores de senescencia celular (6). Mediante Western blot se evaluaron los niveles de fosforilación de ATM, p53 y pRb y los niveles totales de ATM y p53 (Fig. 3A). Análogamente al modelo de senescencia por exposición a H_2O_2 se observó al día 1 del tratamiento un aumento en la fosforilación de la ATM en la Ser1891 que no se sostuvo en el tiempo. La fosforilación de la Ser15 de p53 y los niveles de este factor de transcripción presentan el mismo curso temporal. Los marcadores de la DDR aumentaron al primer día de la exposición, pero a partir del cuarto día del tratamiento se observó una caída, y a los siete días ya no se detectaron. También se observó que la

fosforilación y formación de focos de γ -H2AX aumentó significativamente en las células tratadas con respecto a la condición control, un día después del tratamiento (Fig. 3B).

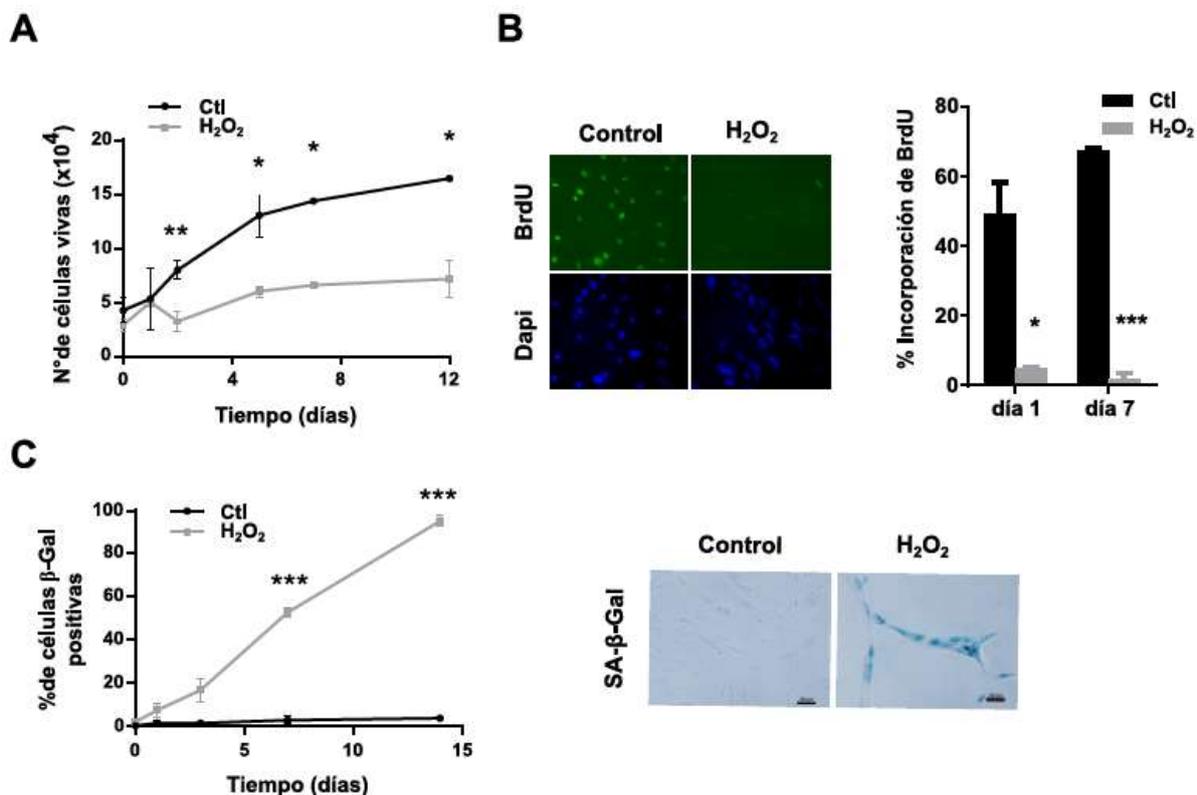


Figura 2. La exposición a H₂O₂ inhibe la proliferación celular y aumenta la actividad SA-β-Gal. **A-** Se incubaron fibroblastos de pulmón humano IMR-90 en ausencia o presencia de H₂O₂ como se indica en la Fig. 1. Se contó el número de células vivas, a distintos tiempos, utilizando tinción de exclusión con Tripán Blue (n=4). **B-** Se evaluó la proliferación a los días 1 y 7 después de la segunda exposición a H₂O₂ mediante la incorporación de BrdU al ADN, realizando una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-BrdU. Los núcleos se tiñeron con DAPI (n= 3). **C-** Se evaluó la actividad SA-β-Gal en células, a distintos tiempos. Se muestra el porcentaje de células que presentan tinción positiva y se presenta una imagen representativa de microscopía óptica, campo claro (100x) de las células al día 7 (n = 3). Los resultados representan el promedio ± SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, Ctl vs H₂O₂, * p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001.

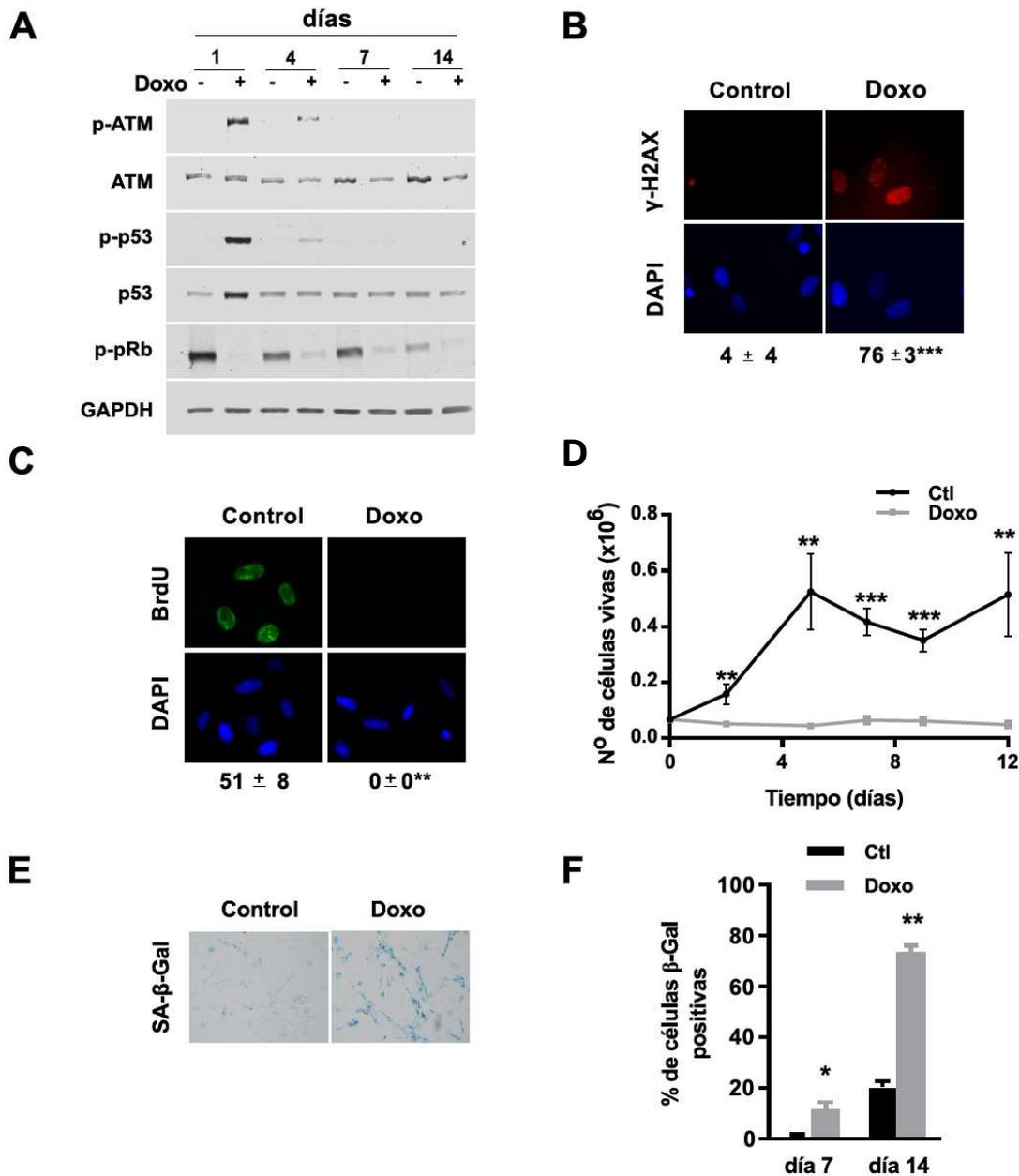


Figura 3. A- La exposición a doxorubicina activa transitoriamente la DDR, inhibe la proliferación celular y aumenta la actividad SA-β-Gal. Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestos a doxorubicina 0.2 μM por 24 horas. **A-** se lisaron a los tiempos indicados y se analizaron por Western blots los niveles de ATM, p53, p-ATM (Ser1981), p-p53 (Ser15) y p-pRb (Ser 807/811). **B-** Un día después se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti γ-H2AX, (S139) y se determinó el porcentaje de células con focos nucleares. Los núcleos se tiñeron con DAPI (n=3). **C-** Se evaluó la proliferación un día después de la exposición a Doxo midiendo la incorporación de BrdU al ADN. Los núcleos se tiñeron con DAPI (n=3). **D-** Se contó el número de células vivas, a distintos tiempos, utilizando Trypan Blue (n=3). **E-** Se evaluó la actividad SA-β-Gal. Se presenta una imagen de microscopía óptica, campo claro (100x) de las células luego de 14 días de la exposición. **F-** Se muestra el porcentaje de células que presentan tinción positiva a distintos tiempos luego de la exposición (n=3). Los resultados representan el promedio ± SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, Ctl vs H₂O₂, *p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001, (n=3).

Al igual que en las células expuestas a H₂O₂ la activación transitoria de la DDR por exposición a doxorubicina desencadenó un cese persistente en la proliferación celular, ya que las células tratadas presentaron menores niveles de fosforilación de pRb a todos los tiempos evaluados desde la exposición a doxorubicina (Fig. 3A). También se observa una disminución en la fosforilación de pRb en las células control a medida que pasa el tiempo. El cambio observado en la fosforilación de pRb en las células control se debe a que disminuye su proliferación a medida que el cultivo se acerca a la confluencia. Para confirmar el cese de la proliferación celular se incubaron las células tratadas y control con BrdU un día después de la exposición, y se evaluó la incorporación del mismo al ADN. Como se muestra en la Figura 3C las células tratadas no incorporaron BrdU mientras que un 51 ± 8 % de las células control si lo hicieron. También se evaluó el número de células viables en cultivo a diferentes días post-tratamiento y se observó que el número de células tratadas en cultivo se mantiene constante en el tiempo mientras que las células control aumentan con el paso de los días (Fig. 3D). Finalmente, para confirmar la inducción de la senescencia por doxorubicina se evaluó la actividad SA-β-Gal, observándose un aumento de la actividad enzimática en las células tratadas (74 ± 4 %) con respecto a las células control (21 ± 4 %) a los 15 días del tratamiento (Fig. 3E y F). También se evaluó la secreción de citoquinas y solo se observó un aumento significativo en las células tratadas con respecto del control, para la interleuquina IL-8 (Fig. 6).

En conjunto los resultados indican que la exposición a doxorubicina indujo la senescencia de las células IMR-90. En forma semejante a lo observado en las células expuestas a H₂O₂, se observó una activación transitoria de la DDR, el cese de la proliferación celular, así como un aumento de la actividad SA-β-Gal.

1.3- Inducción de la senescencia celular por expresión de RAS oncogénico

En varios trabajos se ha demostrado que una fuerte señal mitogénica, generada por la activación de un oncogén o la pérdida de un supresor tumoral, desencadena la senescencia celular; este fenómeno recibe el nombre de senescencia inducida por oncogenes (OIS, del inglés *oncogene induced senescence*) (201,203,208). La OIS generada por la expresión del oncogén RAS^{G12V} fue reportada inicialmente por Serrano y colegas (5) y ha sido estudiada

extensamente. La proteína RAS es una pequeña GTPasa, que participa en vías de señalización vinculadas a receptores de superficie (243). En la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la forma activa de RAS (unida a GTP) se une y activa a la quinasa RAF, que a su vez fosforila y activa a las quinasas MEK1/2, que a su vez fosforilan y activan a las MAPK 1 y 3, también conocidas como ERK-1 y ERK-2. Estas últimas fosforilan múltiples blancos biológicos que regulan la proliferación celular y otros procesos relevantes para la vida celular (244). RAS también regula la vía de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) (243). En humanos, tres genes codifican a las distintas isoformas de la proteína RAS (*KRAS*, *HRAS* y *NRAS*). Estos genes se encuentran mutados en muchos tumores siendo las mutaciones en los codones 12, 13 y 61 las más comunes (245). La sustitución G12V se encuentra en un 55% de las formas mutadas de la isoforma H-RAS, y resulta en la activación constitutiva de la enzima (243).

Para inducir la senescencia con el oncogén RAS se transdujeron células IMR-90 con lentivirus portadores de un plásmido que codifica a H-RAS^{G12V} o un plásmido control y posteriormente se seleccionaron las células infectadas con puromicina. En la Figura 4A se observan los elevados niveles que se obtienen de la proteína RAS en las células portadoras del plásmido H-RAS^{G12V} comparadas con las portadoras del plásmido control. El nivel de p16, un inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas, es mayor, y pRb se encuentra hipofosforilada a los 14 días de la transducción, indicando que la expresión del oncogén RAS induce el cese de la proliferación (Fig. 4A). La actividad SA- β -Gal en las células que expresan al oncogén RAS es significativamente superior a la actividad en las células control a partir del día 12 post transducción y esta diferencia se mantiene hasta el día 17 (Fig. 4B). El último marcador de senescencia estudiado en este modelo fue el fenotipo secretor. Se evaluó la expresión de los genes de varias citoquinas: IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α (Fig. 4C) observándose un aumento en las células senescentes con respecto al control. Estos resultados concuerdan con los reportados e indican que la expresión de citoquinas es un proceso regulado a nivel transcripcional en la senescencia celular (40,51). Luego se midió la secreción de las mismas cuatro citoquinas evaluadas en los otros dos modelos de senescencia GRO- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 por medio de ELISA. El estudio se realizó a los 14 días post transducción, siendo significativamente superior la secreción de citoquinas por las células senescentes con respecto a las células control (Fig. 6).

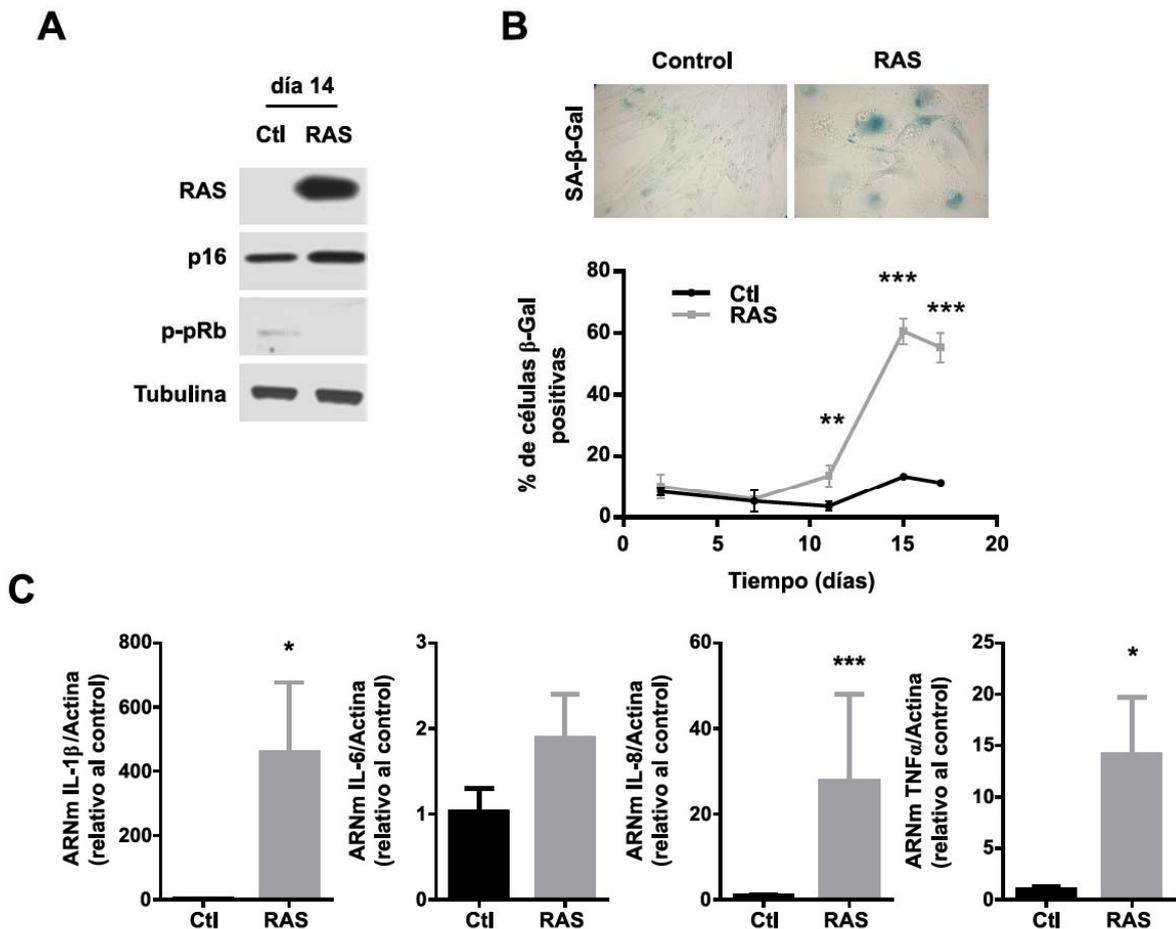


Figura 4. Senescencia inducida por RAS oncogénico. Se incubaron fibroblastos IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puromicina. Al día 14 del inicio de la selección se llevaron a cabo los siguientes experimentos **A-** Western blots utilizando los anticuerpos anti RAS, p16, p-pRb (Ser 807/811) y tubulina como control de carga. **B-** Actividad SA-β-Gal, se presenta una imagen representativa de microscopia óptica, campo claro (100x) y abajo los porcentajes de células positivas a los días indicados desde el inicio de la selección con puromicina. **C-** Evaluación de la expresión de citoquinas por medio de RT-qPCR. Los resultados representan el promedio ± SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, Ctl vs RAS, * p < 0.05, ** p < 0.001, *** p < 0.0001, (n=3).

1.4- Inducción de la senescencia por el oncogén RAS en fibroblastos de piel (BJERRAS)

También se caracterizó otro modelo de senescencia inducida por oncogenes en fibroblastos cutáneos BJ. La línea celular de BJERRAS, expresa constitutivamente a la proteína H-RAS^{G12V} fusionada a un dominio del receptor de la hormona esteroidea (HBD, *hormone binding domain*). En ausencia de 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) la proteína de fusión se une al complejo HSP90 y es degradada por el proteosoma. La unión de 4OHT al HBD produce la liberación del

complejo HSP90, y aumenta el nivel intracelular de la proteína oncogénica H-RAS^{G12V} activa (222,246).

Se incorporó este segundo modelo de inducción de la senescencia porque presentaba algunas ventajas sobre el modelo de inducción de la senescencia por RAS que se venía utilizando. En las células BJERRAS la regulación de la expresión de H-RAS^{G12V} es postranscripcional, por esto se alcanzan niveles altos de la proteína de forma rápida luego del agregado de 4OHT al medio de cultivo, que permiten evaluar lo que ocurre en las primeras etapas de expresión del oncogén. En cambio en el modelo de expresión de H-RAS^{G12V} a través de la transducción con lentivirus, la selección con puomicina impide evaluar que ocurre en las primeras etapas de expresión del oncogén, ya que en este periodo encontramos una mezcla de células vivas y muertas. Además, el modelo de senescencia de células BJERRAS permite, modular los niveles del oncogén RAS variando la concentración de 4OHT, e incluso suprimir la expresión del oncogén retirando el 4OHT.

Se indujo la activación de H-RAS^{G12V} en fibroblastos BJERRAS exponiendo a las células a 4OHT y se buscaron marcadores de senescencia celular. Los resultados indican que a partir del primer día de la exposición al estímulo inductor se detectó a la proteína RAS por Western blot. A partir del tercer día se observó un aumento en los niveles de marcadores de detención del ciclo celular, los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p16 y p21, así como de p53 el factor de transcripción que regula la expresión de p21 (Fig. 5A). Se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células SA-β-Gal positivas en el cultivo al día 12 de la inducción de H-RAS^{G12V}, con respecto a las células incubadas en ausencia de inductor (Fig. 5B). Luego se evaluó el fenotipo secretor mediante ELISA, y se observó un aumento significativo de IL-8 secretada a partir del sexto día de incubación con 4OHT (Fig. 5C), aunque no se detectó a IL-6 en el medio. Lo observado en este modelo está de acuerdo con los reportes de otros autores (49,246).

En suma, se logró establecer distintos modelos de senescencia celular inducidos por daño al ADN y por expresión de un oncogén. Si se comparan los tres modelos de senescencia inducidos en fibroblastos IMR-90 se destacan dos diferencias importantes entre el modelo de

senescencia inducida por el oncogén RAS y los modelos de senescencia celular inducidos por exposición a H₂O₂ o a doxorubicina.

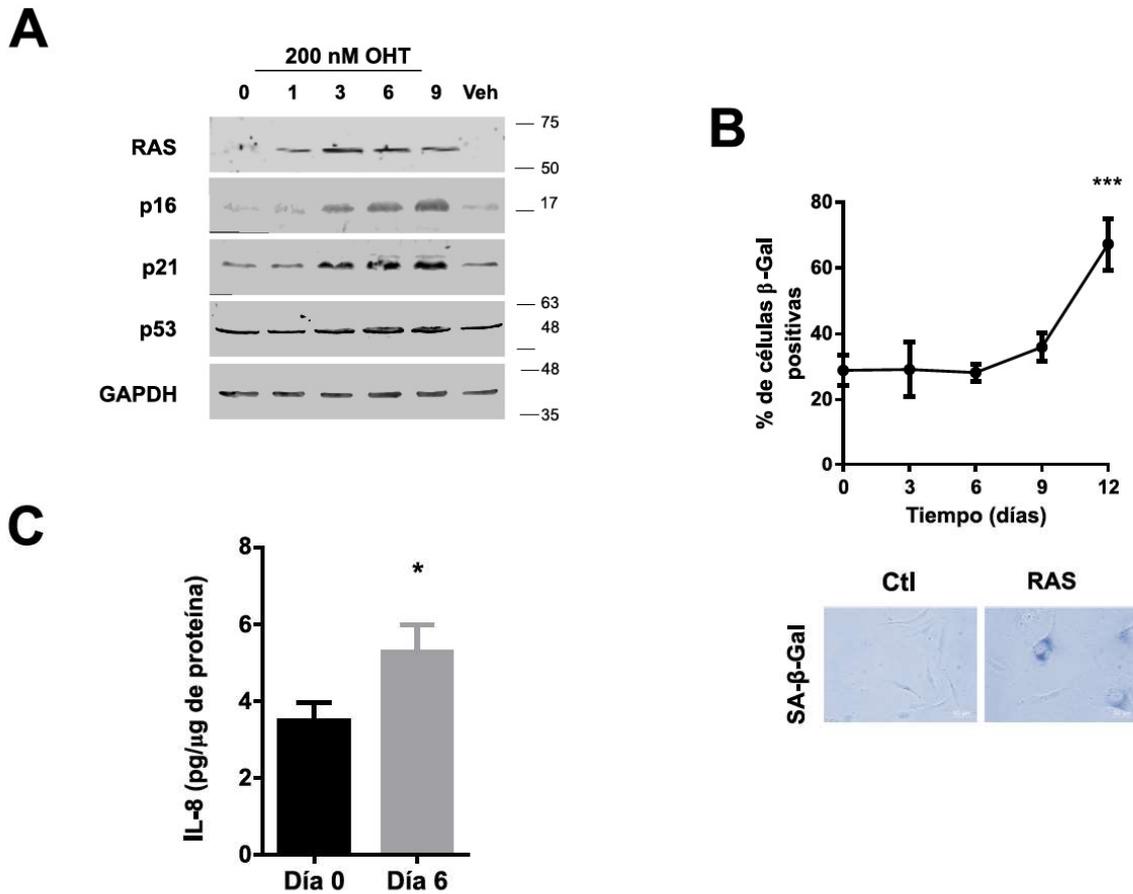


Figura 5. Marcadores de senescencia en fibroblastos BJERRAS. Los fibroblastos BJERRAS se expusieron a 4OHT (200 nM) y se llevaron a cabo los siguientes experimentos. **A-** Western blots a los días indicados con anticuerpos que reconocen a RAS, p16, p21, p53 y GAPDH como control de carga **B-** Actividad SA-β-Gal, se indican los porcentajes de células positivas a los días indicados desde el inicio de la incubación con 4OHT (n = 4), abajo se presenta una imagen representativa de microscopía óptica, campo claro (100x) **C-** Secreción de IL-8 (n = 4) evaluada por medio de ELISA. Los resultados indican los promedios ± SD. Se realizó ANOVA de una vía, *p < 0.05, ***p < 0.0001.

En primer lugar, la activación de la DDR en los primeros modelos estudiados (H₂O₂ y doxorubicina) es transitoria, ocurre inmediatamente luego del estímulo y posteriormente cae. Mientras que en el modelo de senescencia inducida por RAS la DDR se mantiene activa de forma permanente encontrándose marcadores de daño al ADN varios días después de inducida la expresión del oncogén, tanto en los fibroblastos IMR-90 como BJ (195,247).

La otra característica diferente entre los modelos de senescencia es que el modelo de senescencia por expresión de RAS oncogénico presenta un fuerte fenotipo secretor mientras que los otros dos modelos de senescencia celular (exposición a H₂O₂ o doxorubicina) los fibroblastos IMR-90 no secretan citoquinas o la secreción es mucho menor (Fig. 6). Notamos que la secreción de citoquinas en los fibroblastos BJERRAS fue mucho menor a aquella detectada en los IMR-90, pudiendo deberse a diferencias en el tipo celular.

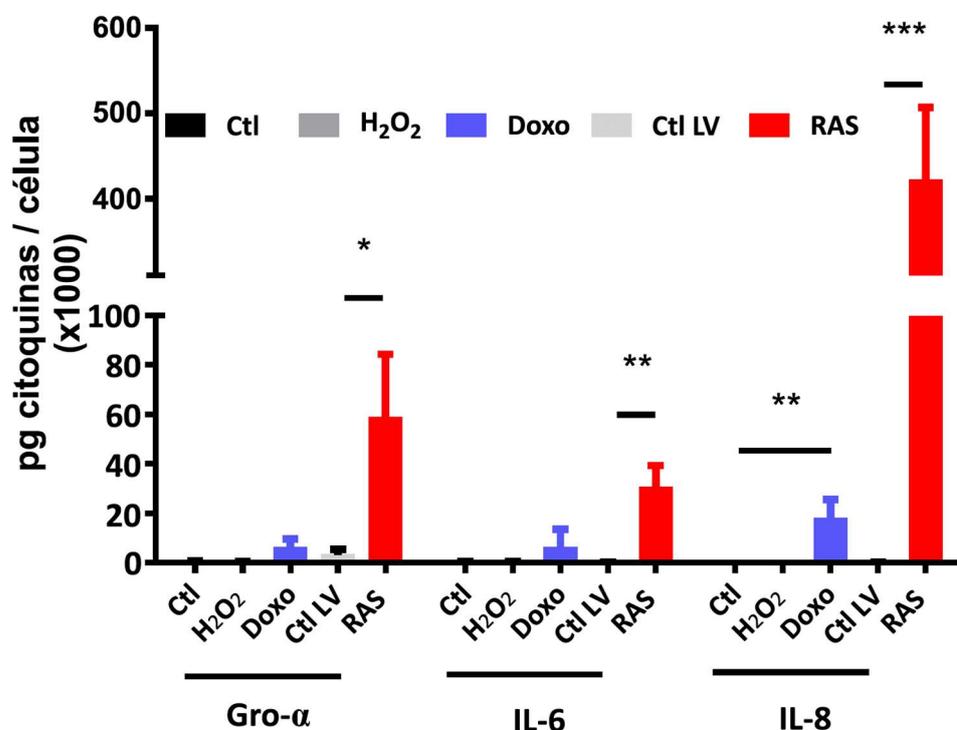


Figura 6. Fenotipo secretor de las células IMR-90 senescentes. Se trataron fibroblastos IMR-90 con H₂O₂ (600 μM, 2 horas, 2 exposiciones), doxorubicina (doxo, 0.2 μM, 24 h) o se transdujeron con lentivirus portadores del plásmido H-RAS^{G12V}. Al día 15 del estímulo inductor de la senescencia se recolectaron los sobrenadantes y se evaluó la secreción de citoquinas mediante ELISA. Los resultados representan el promedio ± SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, Ctl vs tratadas, *p < 0.05, **p < 0.001, (n = 4).

2- Metabolismo de ácidos grasos

Una vez establecidos los modelos de senescencia celular se estudió de forma comparativa el metabolismo de los ácidos grasos en estas células. La proliferación celular requiere un anabolismo activo para proporcionar componentes básicos para las nuevas células, y varios reportes apuntan a una regulación coordinada entre la proliferación y el metabolismo (248–254). En particular, se ha visto un aumento en la síntesis de ácidos grasos en células con altas tasas de proliferación como las células cancerosas, donde se encuentran aumentados los niveles del factor de transcripción SREBP y las enzimas ACL, ACC y FAS (255). Por esto se propuso estudiar la síntesis de ácidos grasos de las células senescentes donde la proliferación se encuentra inhibida, junto con la β -oxidación de los ácidos grasos ya que estas dos vías se regulan en forma coordinada. Se hizo foco en la enzima ACC1 ya que, como se mencionó en la introducción, ACC1 cataliza el primer paso en la síntesis de ácidos grasos y es el principal punto de regulación de la vía. ACC1 también regula la oxidación de los ácidos grasos ya que el malonil-CoA, producto de la reacción que cataliza, inhibe la entrada de ácidos grasos de cadena larga a la mitocondria (73).

2.1- Síntesis de ácidos grasos

2.1.1- Síntesis de ácidos grasos en células senescentes por exposición a H₂O₂

En el modelo de senescencia por exposición a H₂O₂ se estudió la síntesis de ácidos grasos con distintas aproximaciones. Se evaluaron los niveles de ACC1 luego de la incubación con H₂O₂ y se observó una disminución significativa de los mismos a las 24 horas post tratamiento (Fig. 7A). A los 7 días del tratamiento se mantienen bajos los niveles de la enzima ACC1 pero la diferencia con el control no fue significativa ($p = 0.33$, $n=5$) (Fig. 7B). También se evaluó la fosforilación de esta enzima en la Ser79, así como los niveles y fosforilación de la AMPK. A diferencia de lo reportado en la senescencia inducida por el oncogén RAS, no se observó un aumento significativo en los niveles de ACC1 fosforilada en las células tratadas respecto a las células sin tratar (Fig. 7), ni aumento en AMPK o fosfo- AMPK (Thr172).

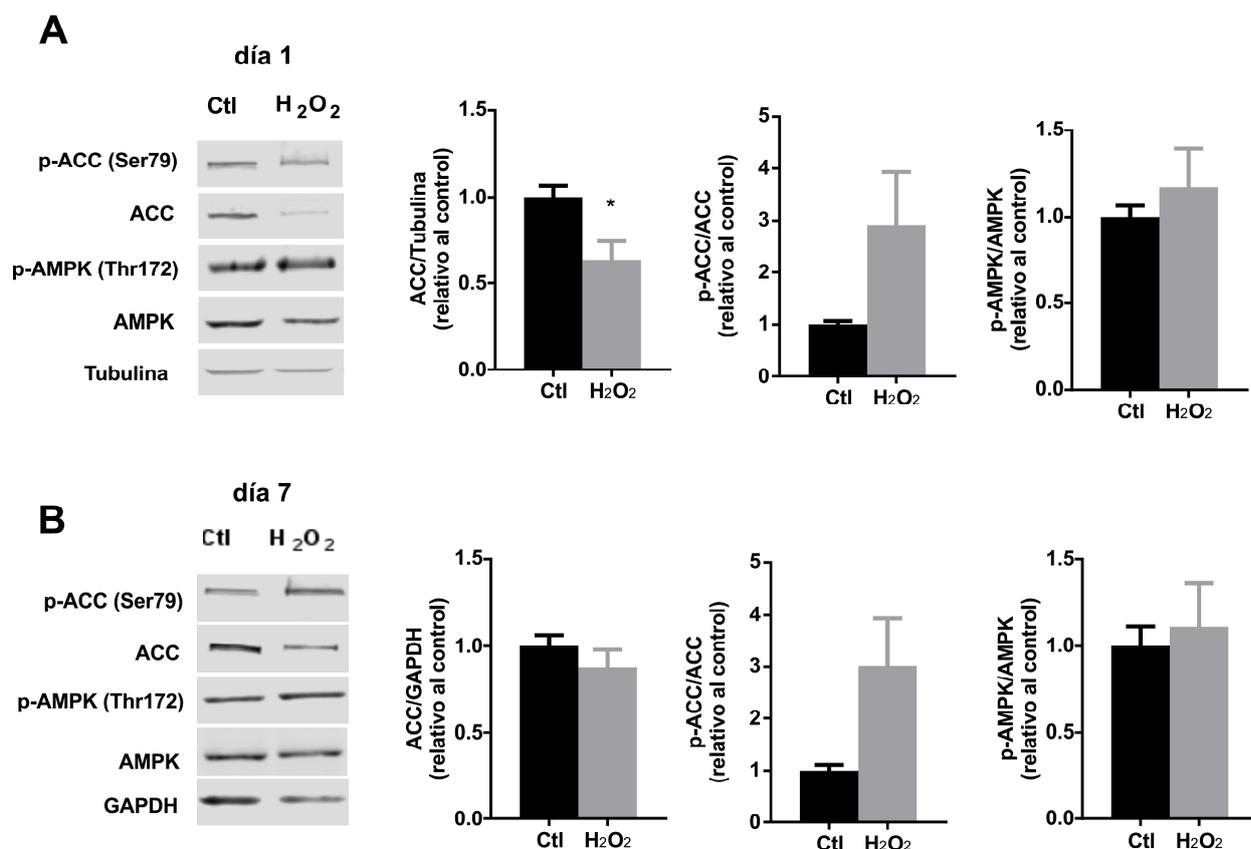


Figura 7. Disminución transitoria de los niveles de ACC1 en las células expuestas a H₂O₂. Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestos a H₂O₂ y se realizaron Western blot a los días 1 (A) y 7 (B) de la exposición a H₂O₂. Se utilizaron los anticuerpos anti ACC, p-ACC (Ser79), AMPK, p-AMPK (Thr172). Se utilizó GAPDH como control de carga. Se muestran Western blot representativos y las cuantificaciones relativas al control. Los resultados son el promedio \pm SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, * $p < 0.05$ ($n \geq 3$).

Para evaluar si el descenso en los niveles de ACC1 se encontraba regulado a nivel transcripcional se evaluaron los niveles de ARNm de ACC1 y se observó una disminución significativa un día después del tratamiento con H₂O₂ (Fig. 8). Estos resultados sugieren que la caída en los niveles de ACC1 se da por una caída en la expresión génica a nivel transcripcional.

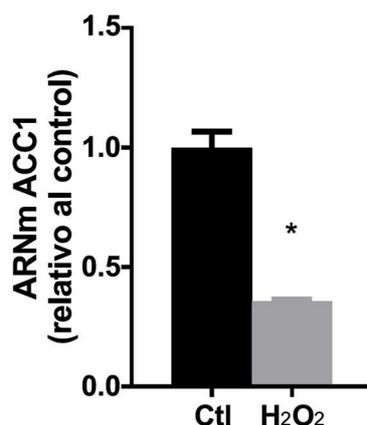


Figura 8. Disminución en los niveles de ARNm de ACC1 en las células expuestas a H₂O₂. Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestos a H₂O₂ y se realizó RT-PCR cuantitativa con primers específicos para ACC1. Los resultados representan el promedio \pm SD y las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, * $p < 0.05$, (n=3).

El descenso en los niveles de ACC1 sugiere que las células senescentes por exposición a H₂O₂ podrían presentar una disminución en la síntesis de *nov*o de ácidos grasos. Los ácidos grasos son un componente principal de los lípidos celulares y forman parte de fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. Se evaluó si los bajos niveles de ACC1 impactaban en la síntesis de lípidos endógenos midiendo la incorporación del acetato marcado con carbono-14 (¹⁴C) en los lípidos celulares, obtenidos por extracción con disolventes orgánicos. Se observó una disminución en la síntesis lipídica a las 24 horas de la exposición al H₂O₂ (Fig. 9A). El efecto fue comparable al producido por el 5-(tetradeciloxi)-2-ácido furoico (TOFA, 0.5 μ g/mL) un inhibidor de ACC1, ya que las células cultivadas con TOFA incorporaron 57 ± 10 % menos de acetato marcado a los lípidos que las células control. Luego se realizó una TLC para evaluar si la inducción de la senescencia por H₂O₂ inducía cambios en la composición lipídica de las células expuestas a H₂O₂ con respecto a las células control (Fig. 9B). Sin embargo, no se observaron cambios en la composición relativa de lípidos después del tratamiento con H₂O₂ (Fig. 9C) ni se detectaron cambios en la cantidad de lípidos normalizados por contenido proteico celular utilizando este método (Fig. 9D).

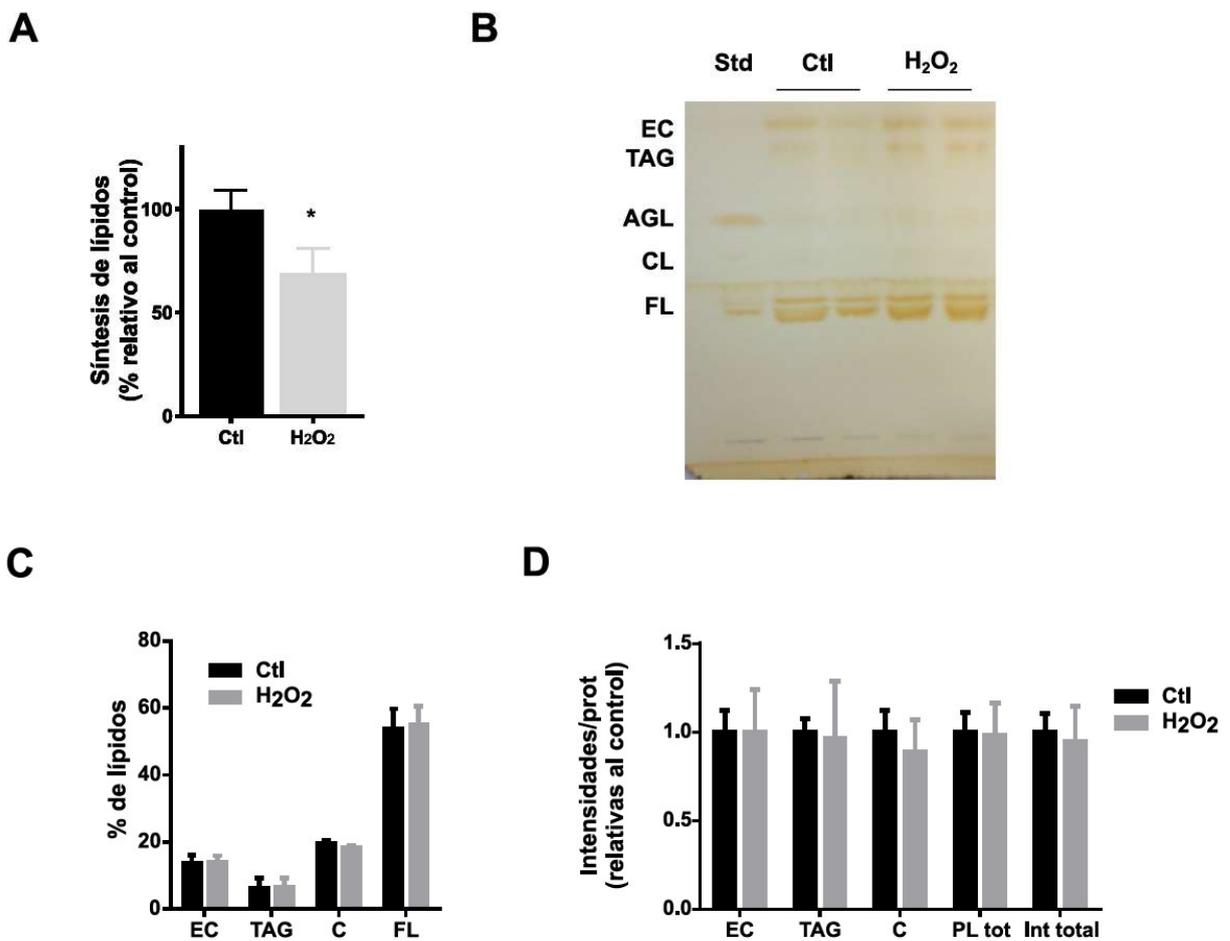


Figura 9. La síntesis lipídica disminuye en las células senescentes expuestas a H₂O₂ sin alterar la proporción relativa de los distintos lípidos. Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestos a H₂O₂. **A-** Se determinó la síntesis lipídica al día del tratamiento con H₂O₂ mediante la incorporación de [¹⁴C]-acetato. Los resultados se normalizaron teniendo en cuenta el número de células. **B-** Se analizó la composición lipídica, por medio de una TLC en una placa de sílica revelada con yodo. Se discriminan los siguientes lípidos: ésteres de colesterol (EC), triglicéridos (TAG), ácidos grasos libres (AGL), colesterol (C) y fosfolípidos (FL). Los estándares sembrados son: AGL, C y FL. **C y D-** Se cuantificaron las bandas de la TLC correspondientes a los distintos lípidos y se calculó el % de cada banda (**C**) o se normalizó por mg proteína celular (**D**). Los resultados representan el promedio ± SD y las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, * p < 0.05, (n ≥ 3).

2.1.2- Síntesis de ácidos grasos en la senescencia inducida por doxorrubicina

También se estudió la síntesis de ácidos grasos en el modelo de senescencia celular por exposición a doxorrubicina. Los resultados se asemejan a los observados para el modelo de senescencia celular inducido por H₂O₂; los niveles de ACC1 disminuyen significativamente al

día 1 de la exposición en las células senescentes y la fosforilación de la enzima no aumenta de forma significativa (Figs. 10A y B). Los cambios observados al primer día de la exposición se pierden en los días sucesivos; a los 14 días de la exposición ya no se observa en las células

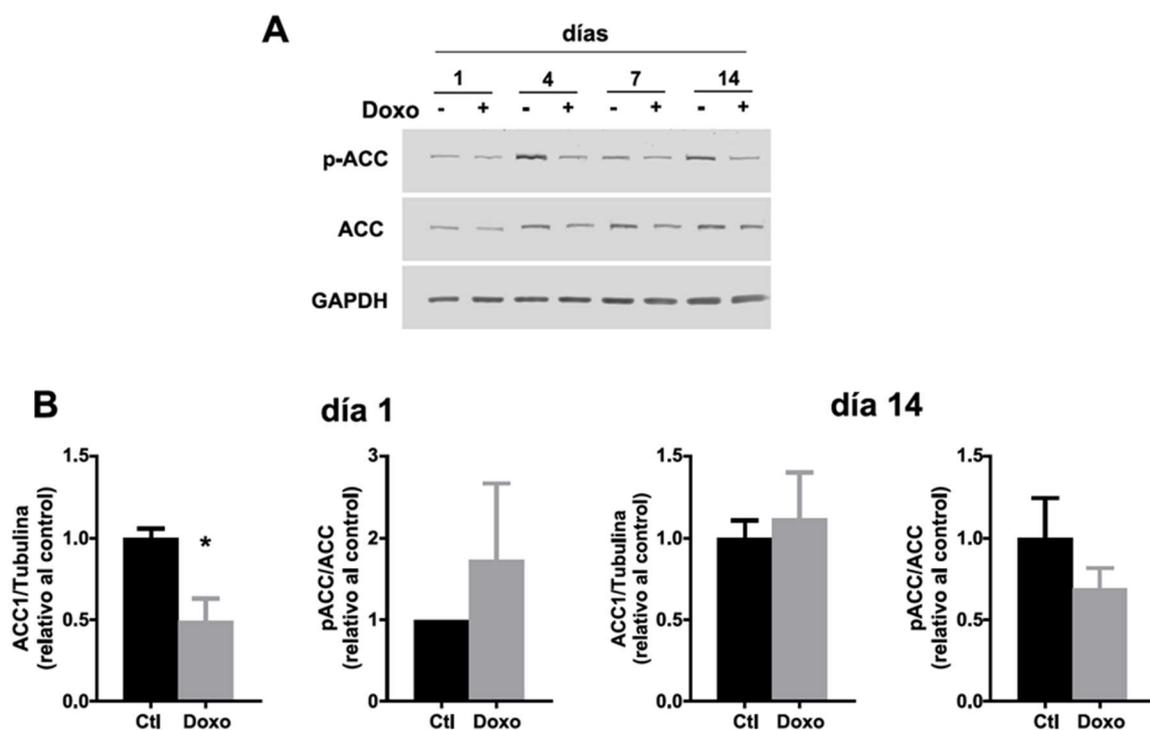


Figura 10. Disminución transitoria de los niveles de ACC1 en las células senescentes por exposición a doxorubicina. **A-** Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestos a doxorubicina y se realizaron Western blot a los días indicados luego de la exposición. Se utilizaron los anticuerpos anti ACC, p-ACC (Ser79) y anti GAPDH como control de carga. Se muestran Western blots representativos. **B-** Cuantificaciones de Western blots. Los resultados están expresados como el promedio \pm desvío estándar. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, * $p < 0.05$ ($n \geq 3$).

senescentes el descenso en los niveles de ACC1 ni el aumento en su fosforilación. Al hacer foco a tiempos más cercanos al tratamiento con doxorubicina (Fig. 11) se evidenció que el descenso en los niveles de ACC1 era inmediato al tratamiento y ocurría simultáneamente a la fosforilación de ATM (Figs. 11A y B), un indicador de la activación de la DDR. Acompañando este resultado se observó también un aumento en los niveles y fosforilación del factor de transcripción p53, sustrato de ATM, que promueve la expresión de p21, con la consecuente hipofosforilación de pRb señal de detención del ciclo celular (Fig. 11A).

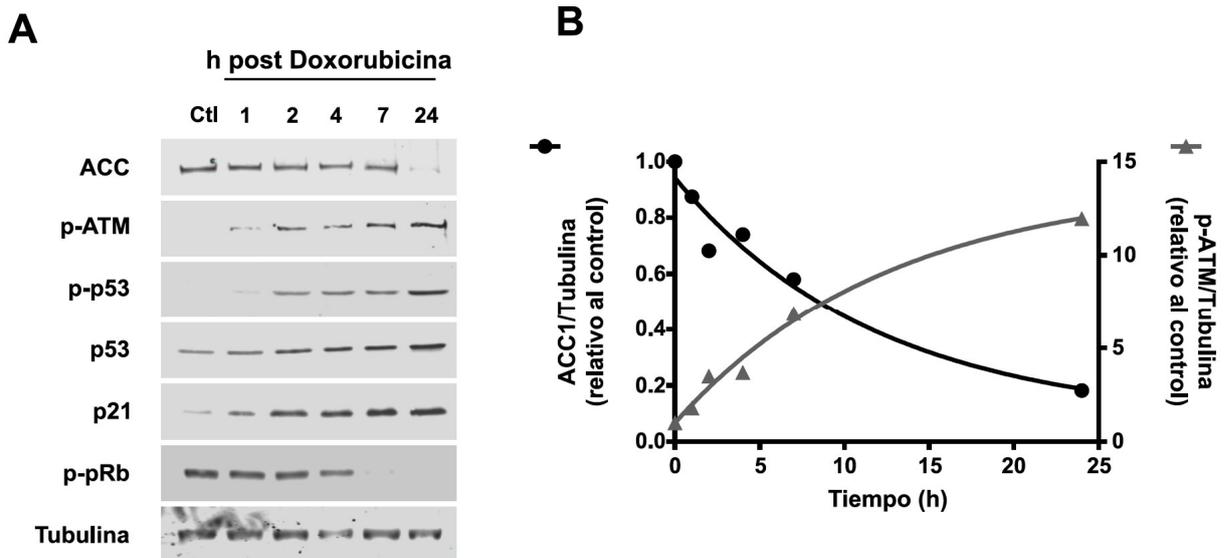


Figura 11. Los niveles de ACC disminuyen inmediatamente luego de la exposición a doxorubicina. A- Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestos a doxorubicina y se realizaron Western blots a las horas indicadas luego de la exposición. Se utilizaron los anticuerpos anti ACC, p-ATM (Ser1981), p-p53 (Ser15), p53, p21, p-pRb (Ser807/811) y anti tubulina como control de carga. B- Cuantificación de Western blots representativos (n=2).

En este modelo también se observó que los niveles de ARNm de ACC1 disminuyen luego del tratamiento, indicando que la caída en los niveles proteína de ACC1 se correlacionaba con una disminución en la expresión génica (Fig. 12A). Al igual a lo visto en la senescencia inducida por H₂O₂, la disminución en los niveles de ACC1 impactó negativamente en la síntesis lipídica, ya que se observó menor incorporación de acetato marcado en los lípidos celulares (Fig. 12B).

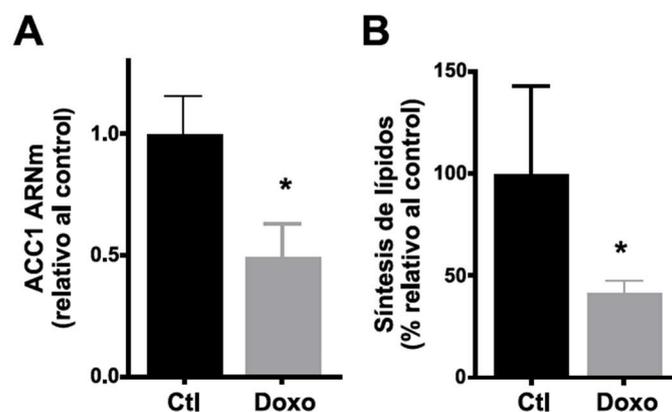


Figura 12. Disminución en los niveles de ARNm de ACC1 y síntesis lipídica en las células expuestas a doxorubicina. Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestas a doxorubicina o TOFA (0.5 µg/mL) y al día de

exposición se realizaron los siguientes experimentos: **A-** RT-PCR cuantitativa con primers específicos para ACC1 usando el kit Syber Green (Qiagen). **B-** Determinación de la síntesis lipídica mediante la incorporación de [¹⁴C]-acetato. Los resultados son el promedio ± SD, las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, Ctl vs Doxo * p < 0.05, (n=3).

En suma, se encontraron varias similitudes entre los modelos de senescencia inducidos por el oxidante H₂O₂ y el quimioterápico doxorrubicina: en ambos se observa una disminución en la expresión y niveles de ACC1, así como una caída en la síntesis lipídica a partir de acetato.

2.1.3- Síntesis de ácidos grasos en la senescencia inducida por el oncogén RAS.

En el modelo de senescencia inducida por el oncogén RAS también se ha reportado (203) una disminución en la síntesis de lípidos, pero presenta algunas diferencias con los descritos anteriormente. En este modelo se ha observado un aumento en la fosforilación e inhibición de ACC1 en la Ser79 sostenido en el tiempo, como consecuencia del aumento en la fosforilación (Thr172) y actividad de AMPK (203). Corroboramos estas diferencias realizando la inducción en paralelo de los fibroblastos IMR-90 por distintos estímulos. Como se observa en la Figura 13, a los 14 días del tratamiento ACC1 se encuentra fosforilada en la senescencia inducida por RAS, pero no en la inducida por doxorrubicina.

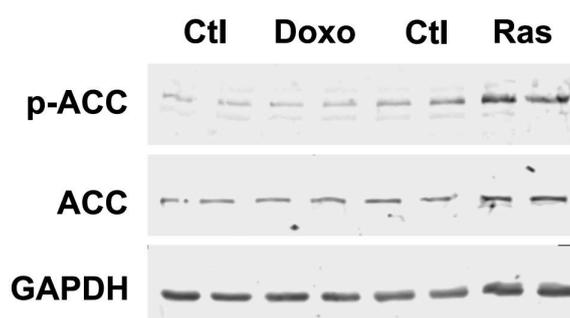


Figura 13. La fosforilación de ACC en fibroblastos IMR-90 senescentes dependen del estímulo inductor de la senescencia. Los fibroblastos IMR-90 fueron expuestos a: doxorrubicina (Doxo) o a su vehículo (Ctl) o se incubaron con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} o un plásmido control y se realizaron Western blots a los 15 días luego del tratamiento. Se utilizaron los anticuerpos anti ACC, p-ACC (Ser79) y anti GAPDH como control de carga.

Los cambios metabólicos que presentan las células IMR-90 senescentes por RAS también se observaron en las células BJERRAS luego del agregado de 4OHT. En la Figura 14 se puede percibir que desde el día posterior a la inducción de la senescencia aumenta la fosforilación de AMPK y al tercer día del estímulo aumentan los niveles y fosforilación de ACC. Ambos cambios se mantienen hasta el día nueve desde la inducción de la senescencia sugiriendo que la síntesis de ácidos grasos se encuentra inhibida.

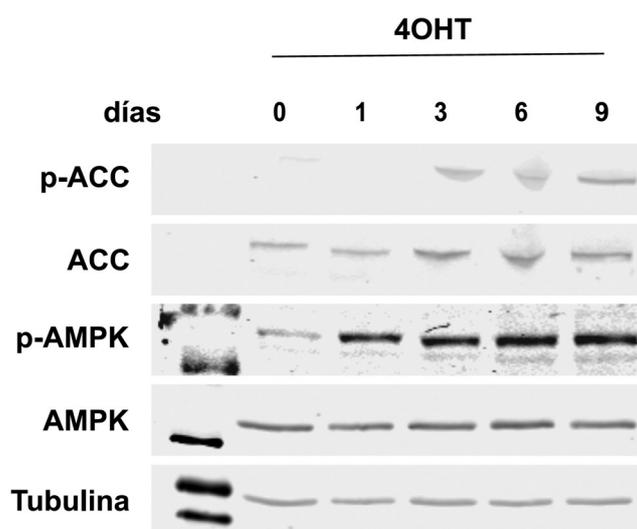


Figura 14: Niveles y fosforilación de ACC1 y AMPK en fibroblastos BJERRAS. Los fibroblastos BJERRAS se expusieron a 4OHT (200 nM) durante nueve días. Se lisaron las células a los días indicados desde el inicio de la incubación y se llevaron a cabo Western blots con anticuerpos que reconocen a ACC, p-ACC (Ser79), AMPK, p-AMPK (Thr172), y tubulina. Se muestran Western blots representativos (n=3).

2.1.4- Síntesis de ácidos grasos en células quiescentes

Para evaluar si la inhibición de la síntesis de ácidos grasos derivaba de la inducción de la senescencia o del estado no proliferativo de las células, se realizaron ensayos en fibroblastos IMR-90 quiescentes. Para inducir la quiescencia se incubaron las células en medio con 0.1% de SFB durante tres días (256) y en estas condiciones se evaluaron algunos marcadores de senescencia celular y se estudió la síntesis de ácidos grasos (Fig. 15). En la figura 15A se observa que en las células quiescentes la quinasa ATM no se encuentra fosforilada y tampoco su sustrato p53, tampoco están aumentados los niveles de p21, indicando que las células

quiescentes no presentan activación de la DDR. En la misma figura se puede observar la activación de la DDR en células expuestas a doxorubicina.

Por otra parte, los niveles de fosforilación de pRb se encuentran disminuidos tanto en las células quiescentes como en las células senescentes, indicando que el ciclo celular se encuentra detenido en ambas poblaciones celulares. Para confirmar que las células incubadas con baja concentración de suero no proliferaban se incubaron en medio con BrdU, y se observó que incorporan significativamente menos BrdU a su ADN que las células control (Fig. 15B).

Se prosiguió a estudiar los niveles de la proteína ACC1 y se observó que en los cultivos quiescentes los niveles de ACC1 eran comparables a los de los fibroblastos tratados con doxorubicina (Figs. 15A y C), lo que sugiere que la disminución de ACC1 no es específica de las células senescentes, sino más bien característica de las células de crecimiento detenido. Sin embargo, los niveles de ARNm de ACC1 en células quiescentes no acompañaron a la disminución en los niveles de proteína, siendo más del doble que los de las células de control (Fig. 15D). Estos resultados evidencian la existencia de una regulación de ACC1 a nivel postranscripcional en estas condiciones, diferente a lo visto en la senescencia inducida por doxorubicina y H₂O₂.

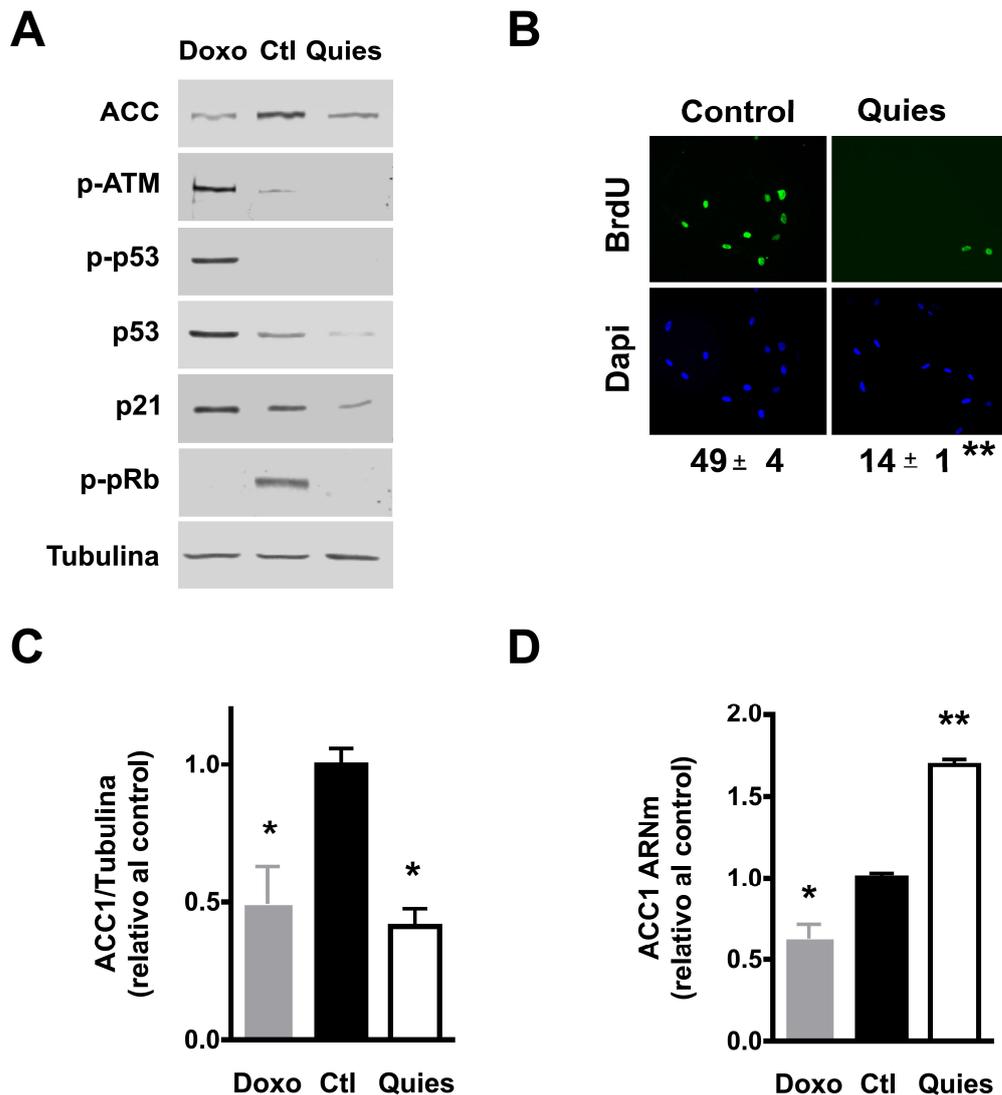


Figura 15. Disminución de los niveles de ACC1 en células quiescentes. Los fibroblastos IMR-90 se cultivaron durante siete días en medio completo (10 % SFB) (Ctl), o tras 4 días en cultivo con medio completo se indujo la quiescencia cultivando durante los últimos tres días en medio bajo en suero (0.1% SFB), o alternativamente se incubó con doxorubicina (Doxo) el último día de cultivo. Al séptimo día de cultivo se realizaron los siguientes ensayos: **A-** Se evaluaron los niveles de proteínas por Western blot con los anticuerpos anti ACC, p-ATM (Ser1981), p-53 (Ser15), p21 y p-pRb (Ser807/811) y anti tubulina como control de carga. **B-** Se evaluó la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU al ADN nuclear, los núcleos se tiñeron con DAPI. Los porcentajes de células que incorporaron BrdU se indican debajo de las imágenes. **C-** Las gráficas muestran la cuantificación ACC1 en Western blots independientes. **D-** Se muestran los niveles de ARNm de ACC1. Los resultados son los promedios \pm SD y la existencia de diferencias significativas se determinó mediante ANOVA de una vía, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ ($n \geq 4$).

2.2 - β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos en células senescentes

Los resultados previos indican que las células senescentes tienen menor síntesis lipídica. En las células senescentes por daño al ADN (H_2O_2 y doxorubicina) esto es consecuencia de una disminución de los niveles de la proteína ACC1; mientras que en las células senescentes por expresión del oncogén RAS se debe a la inhibición de la actividad de ACC1 por la fosforilación en la Ser79. Por otra parte, se conoce que la oxidación de ácidos grasos se regula de forma recíproca a su síntesis. El malonil-CoA, producto de la carboxilación de la acetil-CoA catalizada por la ACC1 inhibe a la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) necesaria para el transporte de ácidos grasos de cadena mediana y larga a la matriz mitocondrial. Teniendo en cuenta nuestros resultados, y que las vías de síntesis y degradación de ácidos grasos presentan una regulación recíproca, se planteó estudiar que ocurría con la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos en los distintos modelos de senescencia.

Para abordar este objetivo se evaluó la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial en presencia de diversos sustratos del catabolismo celular: glucosa, piruvato, glutamina y ácido oleico, en ausencia y en presencia de etomoxir, un inhibidor de la enzima CPT1 que permite discriminar cuánto oxígeno es reducido por electrones provenientes del NADH y $FADH_2$ generados en la β -oxidación (Fig. 16).

2.2.1- β -Oxidación de ácidos grasos en células senescentes por exposición a H_2O_2 o doxorubicina

En la Figura 16A se muestra un registro de la velocidad de consumo de oxígeno de los fibroblastos IMR-90, donde se observó que la respiración basal era significativamente menor en las células senescentes por exposición a H_2O_2 (3.4 ± 0.9 pmol/min* μ g) que en las células control (6.3 ± 1.2 pmol/min* μ g). Estos resultados sugieren que las células senescentes por exposición a H_2O_2 presentan una menor demanda energética que las células control. La inhibición de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria con etomoxir disminuyó la velocidad de consumo de oxígeno del cultivo control, pero no de forma significativa. Notamos que luego del agregado de etomoxir, ya no se encontraron diferencias significativas entre las velocidades de consumo de oxígeno de las células control y las células senescentes. Los resultados

sugieren que los fibroblastos IMR-90 pueden utilizar ácidos grasos como el ácido oleico, para la obtención de energía en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. Sin embargo, cuando estas células senescen por exposición a H_2O_2 pierden esta capacidad.

Se realizó el mismo ensayo en los fibroblastos senescentes por exposición a doxorubicina (Fig. 16B), y se obtuvieron resultados similares a lo visto en la senescencia por H_2O_2 . Al comparar el consumo de oxígeno basal de las células senescentes y las células control, se observó que las células control presentan mayor velocidad de consumo de oxígeno que las células senescentes. El agregado de etomoxir disminuyó el consumo de oxígeno de las células control sin afectar el consumo de oxígeno de las células senescentes, sugiriendo que en este caso el metabolismo energético de las células senescentes tampoco depende de la β -oxidación de ácidos grasos.

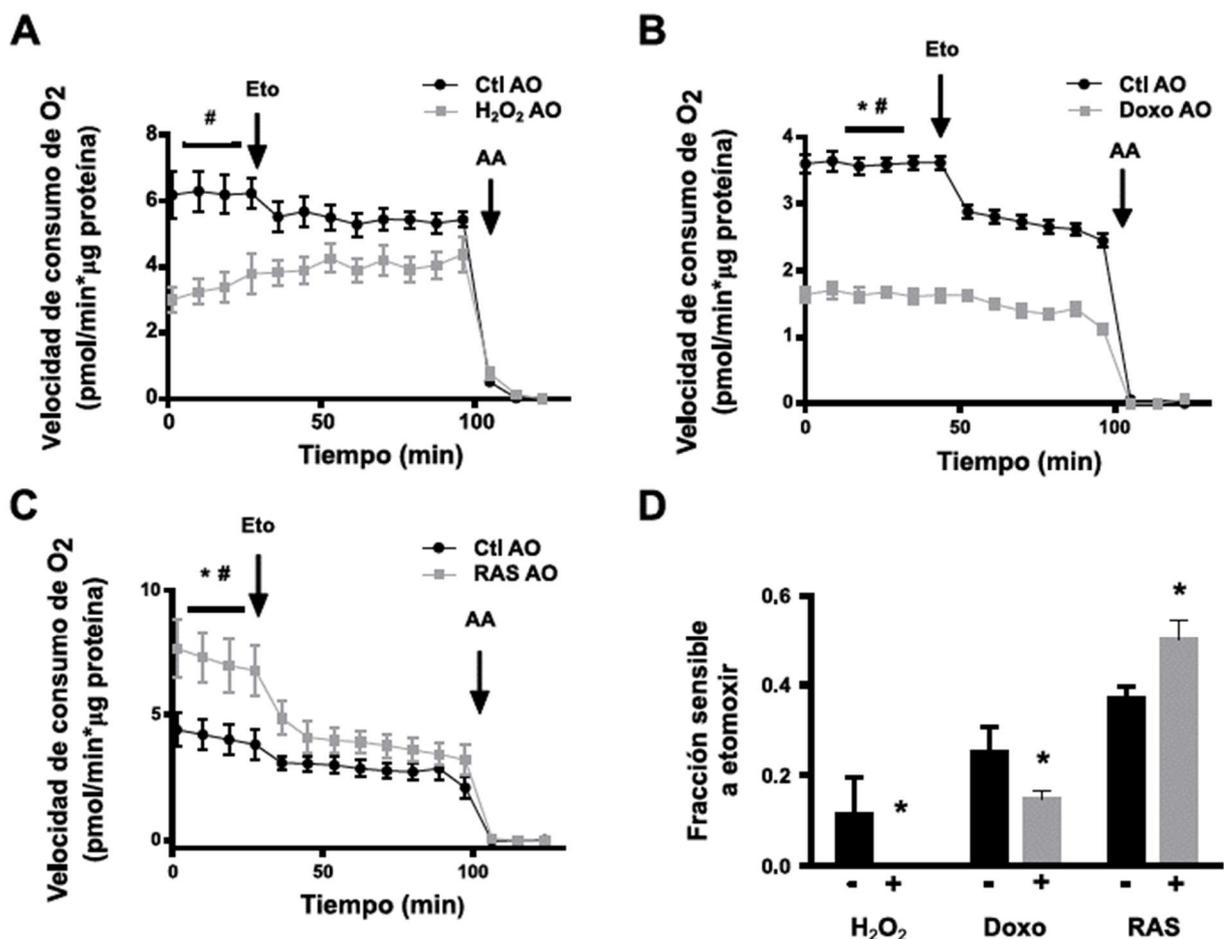


Figura 16. Oxidación de ácidos grasos en los distintos modelos de senescencia. Se determinó la velocidad de consumo de O₂ dependiente de ácidos grasos en fibroblastos IMR-90 control y senescentes por exposición a H₂O₂ (A), doxorubicina (B) o por expresión del oncogén RAS (C). Se realizaron las medidas en presencia de ácido oleico (AO) antes y después del agregado secuencial de etomoxir (Eto, 100 µM) y antimicina (AA, 2.5 µM). D- A partir de los datos de A, B y C se calculó la velocidad de consumo de oxígeno asociada a la β-oxidación, como la fracción sensible al agregado de etomoxir. En todas las gráficas los resultados son promedios ± SD y las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. En A, B y C, # Ctl AO vs tratada AO y * basal vs Eto, **p < 0.05, (n ≥ 4) y en D *p < 0.05, (n ≥ 4).

2.2.2- β-Oxidación de ácidos grasos en la senescencia inducida por el oncogén RAS

Por el contrario, como se observa en la Figura 16C, las células IMR-90 senescentes por expresión de RAS oncogénico presentan un mayor consumo de oxígeno basal que las células control. Esta diferencia se acorta frente al agregado de etomoxir, como consecuencia de una

disminución en la velocidad de consumo de oxígeno de las células senescentes, lo que está de acuerdo con reportes anteriores (203).

Los resultados obtenidos indican que existen diferencias en el metabolismo energético de las células senescentes, que dependen del estímulo desencadenante de la senescencia. En la Figura 16D se resumen las fracciones de la velocidad de consumo de oxígeno sensible a etomoxir de cada uno de los modelos de senescencia. Aquí se aprecia que el consumo de oxígeno dependiente de ácidos grasos aumenta en la senescencia inducida por el oncogén RAS mientras que disminuye en la senescencia inducida por H₂O₂ o doxorubicina.

En suma, a partir de los resultados obtenidos con relación al metabolismo de ácidos grasos, se puede decir que en los modelos de senescencia celular por daño al ADN (generados por exposición a H₂O₂ o doxorubicina) se observó una menor expresión de la enzima reguladora de la síntesis de ácidos grasos, ACC1, que impactó negativamente en la síntesis lipídica; y menor β -oxidación de ácidos grasos en estas células senescentes que en las células control. Esto es diferente a lo que sucedió en las células senescentes por expresión de RAS oncogénico en donde los niveles de ACC1 aumentaron, pero la enzima se encontraba fosforilada por acción de la AMPK (203), modificación que inhibió la actividad enzimática repercutiendo negativamente en la síntesis lipídica. En este modelo de senescencia sí se observó una regulación coordinada de la oxidación y la síntesis de los ácidos grasos, encontrándose a la β -oxidación más activa en las células senescentes que en las células control.

2.3- Función mitocondrial de células senescentes

Considerando que las células senescentes presentaban alteraciones en la respiración basal con respecto a las células control; y que su vez se observaron efectos distintos en las células senescentes por RAS y las células senescentes por daño al ADN, se procedió a evaluar la función mitocondrial en los tres modelos de senescencia trabajados hasta el momento. Para estudiar la función mitocondrial en células, se midió la velocidad de consumo de oxígeno basal en presencia de glucosa, piruvato y glutamina, y después del agregado de inhibidores y un desacoplante de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa (Fig. 17). Se

determinaron los parámetros e índices respiratorios a partir de los valores obtenidos antes y luego de la adición de los distintos compuestos.

2.3.1- Función mitocondrial de células senescentes por exposición a H₂O₂ o doxorrubicina

En los modelos de senescencia por daño al ADN, generados por exposición a H₂O₂ o doxorrubicina, no se observaron diferencias en la velocidad de consumo de oxígeno ni en los parámetros respiratorios entre las células senescentes y las células control (Fig. 17A y B).

Al comparar la respiración basal obtenida en estos ensayos (Fig. 17) en presencia de glucosa, piruvato y glutamina (sin agregado de inhibidores o desacoplantes), con los resultados de la Figura 16, donde además de estos sustratos se agrega ácido oleico, notamos diferencias. En los modelos de exposición a H₂O₂ y doxorrubicina se observa una caída en la velocidad de consumo de oxígeno basal en presencia de ácido oleico, con respecto al control (Fig. 16A y B), que se pierde en ausencia de ácido oleico (Fig. 17A y B). Estos resultados sugieren que las células senescentes por daño al ADN (H₂O₂ y doxorrubicina) presentan una menor oxidación de los ácidos grasos que las no senescentes, y por tanto una menor respiración dependiente de este sustrato que las células control.

2.3.2- Función mitocondrial de células senescentes por expresión del oncogén RAS

Mientras que en las células senescentes por expresión del oncogén RAS se notó un importante aumento en la respiración con respecto a la situación control (Fig. 17C). La respiración basal fue más alta en las células senescentes que en las células control, tanto en ausencia (Fig. 17C) como en presencia de ácido oleico (Fig. 16C), indicando una mayor capacidad de oxidación de nutrientes de distinto tipo incluyendo los ácidos grasos.

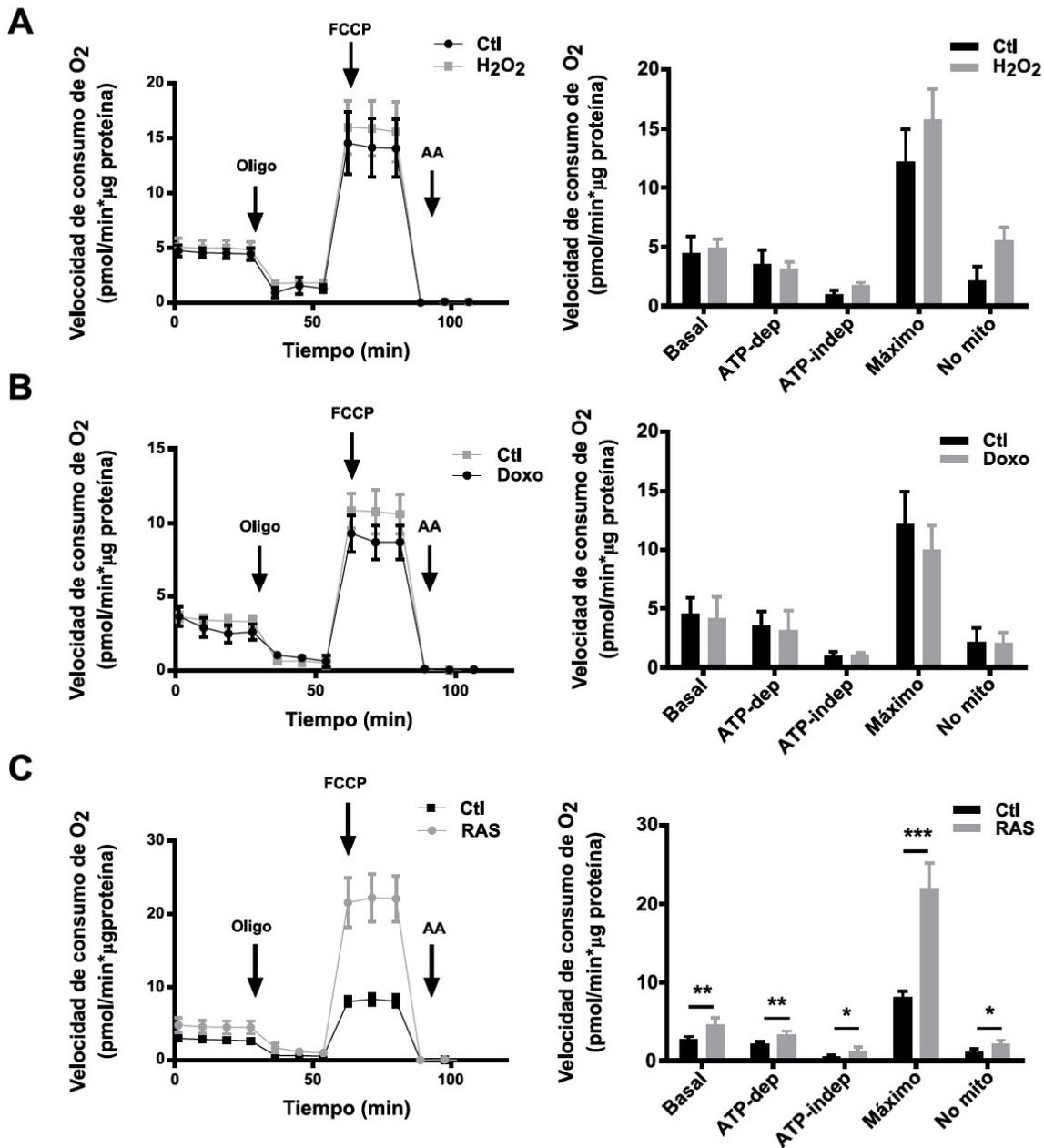


Figura 17. Función mitocondrial en los distintos modelos de senescencia. Se determinó la velocidad de consumo de O₂ de fibroblastos IMR-90 control y senescentes por exposición a H₂O₂ (A), doxorubicina (B) o por expresión del oncogén RAS (C). Se realizaron medidas antes y después del agregado secuencial de oligomicina (Oligo, 0.5 μM), FCCP (1 μM, dos agregados) y antimicina A (AA, 1 μM). En las gráficas de la izquierda se presenta la velocidad de consumo de O₂ normalizada por la cantidad de proteínas y en las gráficas de la derecha se muestran los parámetros respiratorios obtenidos a partir de las medidas de consumo de O₂. Los resultados representan el promedio ± SD (n = 9 - 10). Las diferencias significativas entre condiciones se determinaron mediante test de Student. *p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001.

La respiración basal depende de la demanda energética que sufre la célula, es decir la necesidad de síntesis de ATP. Al inhibir a la ATP sintasa con el agregado de oligomicina se

puede determinar cuánto consumo de oxígeno está vinculado con la síntesis de ATP y cuánto es independiente de la síntesis de ATP. Las células senescentes por expresión de RAS presentaron mayor velocidad de consumo de oxígeno ligado a la síntesis de ATP y también mayor velocidad de consumo de oxígeno independiente de la síntesis de ATP (Fig. 16C). El agregado de FCCP desacopla el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, porque disminuye la diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana mitocondrial interna, favoreciendo el flujo de electrones hacia el oxígeno y disminuyendo la síntesis de ATP; y permite determinar el consumo de oxígeno máximo mitocondrial de la célula. Se observó que las células RAS presentaban una mayor velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial al agregar el desacoplante, con respecto a las células control, indicativo de un aumento en el número y/o actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. De hecho, las células senescentes por expresión del oncogén RAS presentan mayor relación de ADNmit/ADNnuclear que las células control (5.6 ± 0.2 vs 1.0 ± 0.2 , $p < 0.05$, $n = 6$) sugiriendo la existencia de un mayor número de mitocondrias en las células senescentes. Este resultado está de acuerdo con (191) en el que reportan un aumento en la masa mitocondrial de las células senescentes. Por último, las células que expresan RAS^{G12V} también presentaron un aumento significativo en el consumo de oxígeno no mitocondrial, con respecto al control, determinado al agregar antimicina A (AA). La antimicina A es un inhibidor del complejo III, que inhibe completamente el pasaje de electrones por la cadena respiratoria hacia el oxígeno, permitiendo distinguir el consumo de oxígeno por la cadena respiratoria de otras reacciones que consumen oxígeno (por ejemplo, las catalizadas por las NAD(P)H oxidasas).

También se estudió la función mitocondrial de las células BJERRAS (Fig. 18). A partir del sexto día del agregado de 4OHT se notó un aumento en las velocidades de consumo de oxígeno basal, la destinada a la síntesis de ATP, la máxima velocidad de consumo de oxígeno y la velocidad de consumo de oxígeno no mitocondrial. Estos resultados apoyan lo visto en los fibroblastos IMR-90 que expresan al oncogén RAS (Fig. 17C), y están de acuerdo con el aumento en la fosforilación de ACC1 observado a partir del día 3 del agregado de 4OHT (Fig. 14 y Fig. 19).

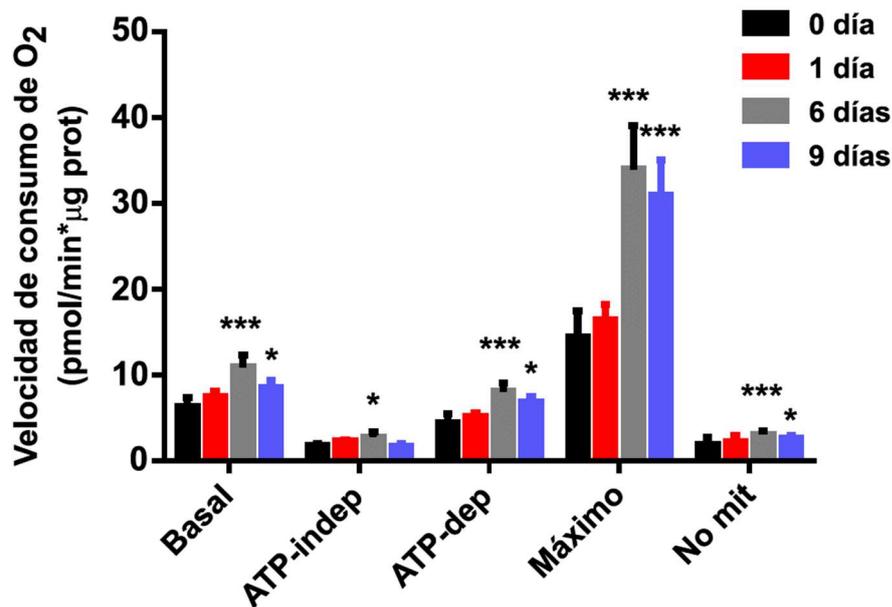


Figura 18: Función mitocondrial de fibroblastos BJ senescentes. Los fibroblastos BJERRAS se expusieron a 4OHT (200 nM) durante nueve días. Se determinó la velocidad de consumo de O₂ de los fibroblastos antes y después del agregado secuencial de oligomicina, FCCP y antimicina A y se calcularon los parámetros respiratorios. Los resultados indican los promedios \pm SD y las diferencias significativas con respecto al día 0 se determinaron con ANOVA de una vía. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$ ($n = 4 - 6$).

2.3.3- Determinación de índices respiratorios

A partir de los ensayos de consumo de oxígeno (Fig. 17) se calcularon índices respiratorios (Tabla 1). Estos se calculan como relaciones entre los parámetros respiratorios, por lo que son independientes de la cantidad de proteína de cada muestra. Se calculó el índice de control respiratorio (RCR) como la relación entre el consumo de oxígeno máximo, determinado en presencia de FCCP, y el consumo de oxígeno independiente de la síntesis de ATP, determinado en presencia de oligomicina. Este índice refleja el estado de acople mitocondrial y la capacidad de oxidación de sustratos (233). Se observó que las células senescentes por daño al ADN presentaban menor RCR que las células control indicando que en la senescencia las células experimentan una disminución de la función mitocondrial (Tabla 1). También se calculó la capacidad de reserva, como la relación entre el consumo de oxígeno máximo y el consumo de oxígeno basal; este parámetro da una idea de la capacidad de suministro de sustrato y transporte de electrones de una célula para responder frente a un aumento en la demanda

de ATP o una noxa. En este índice no se observaron diferencias entre las células senescentes por daño al ADN y las células control (Tabla 1). Por último, se determinó la eficiencia de acoplamiento, que representa la fracción basal del consumo de oxígeno destinada a la síntesis de ATP. Las células senescentes por daño al ADN presentaron menor eficiencia de acoplamiento que las células control revelando que en estas hay un menor acople entre el transporte de electrones y la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, que puede deberse a un aumento de eventos que disipan el gradiente tales como el transporte de metabolitos al interior de la mitocondria o la expresión de una proteína desacoplante (Tabla 1) (233).

En concordancia a lo observado para las células senescentes por daño al ADN, el cálculo de la eficiencia de acople para las células que expresan al oncogén RAS indica que estas células también presentan menor eficiencia de acople que las células control (Tabla 1). Sin embargo, la capacidad de reserva y el RCR de las células senescentes por RAS fueron mayores que los de las células control (Tabla 1). Esto sugiere que las células senescentes presentan, en definitiva, una mayor función mitocondrial y podrían responder mejor en una situación de demanda energética o de daño mitocondrial.

Tabla 1. Índices respiratorios mitocondriales. Se calcularon a partir de las medidas de consumo de oxígeno de la Fig 17. Los resultados representan el promedio \pm SD. Las diferencias significativas entre condiciones se determinaron mediante test de Student. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ (n = 9 – 10).

	Ctl	H ₂ O ₂	Ctl	Doxo	Ctl LV	RAS ^{G12V}
Eficiencia de acople	0.83 \pm 0.04	0.71 \pm 0.02 *	0.73 \pm 0.04	0.64 \pm 0.01 *	0.79 \pm 0.01	0.73 \pm 0.02 *
Capacidad de reserva	3.14 \pm 0.05	3.1 \pm 0.1	3.1 \pm 0.4	3.2 \pm 0.2	2.90 \pm 0.03	4.81 \pm 0.09***
Índice de control respiratorio	15 \pm 1	11 \pm 1 *	11 \pm 1	8.9 \pm 0.6 *	13.7 \pm 0.5	18 \pm 2 *

Se evaluaron los índices respiratorios: eficiencia de acople, capacidad de reserva, e índice de control respiratorio en las células senescentes BJERRAS. Se observó que los mismos aumentaban a partir del día 6 del agregado de 4OHT, siendo todos significativamente mayores que los de la condición control, al día 9. Estos índices indican una mejor función mitocondrial en las células BJERRAS senescentes que aumenta con el tiempo de inducción. Si se comparan

los resultados de ambas tablas se puede observar que la capacidad de reserva y el índice de control respiratorio, para ambos modelos de senescencia inducida por el oncogén RAS, aumentan con respecto a las células no senescentes y es una característica que no es compartida por las células senescentes por daño al ADN.

Tabla 2. Índices respiratorios mitocondriales de células BJERRAS. Se calcularon a partir de las medidas de consumo de oxígeno de la Fig. 18. Los resultados muestran el promedio \pm SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de una vía * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (n = 4 - 5).

	Ctl	día 1	día 6	día 9
Eficiencia de acople	0.70 \pm 0.05	0.69 \pm 0.01	0.74 \pm 0.03	0.80 \pm 0.04*
Capacidad de reserva	2.0 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2	3.1 \pm 0.2**	3.4 \pm 0.4**
Índice de control respiratorio	7 \pm 1	7 \pm 1	12 \pm 2**	17 \pm 2**

2.3.4- Vías de señalización activadas por la expresión del oncogén RAS

A continuación se diseñaron diferentes ensayos en cultivos de BJERRAS con el fin de evaluar el rol de la expresión de RAS oncogénico en la activación de las distintas vías de señalización y en el metabolismo energético de las células senescentes. En el primer ensayo se cultivaron fibroblastos BJERRAS en presencia de 4OHT durante 12 días, hasta alcanzar la senescencia celular y contar con la expresión de múltiples marcadores de este estado (Fig. 5 y Fig. 19). Luego se mantuvieron en cultivo en ausencia de 4OHT hasta el día 20 de iniciado el tratamiento (Fig. 19A). A distintos tiempos desde el comienzo de la exposición al inductor, se lisaron las células y se llevaron a cabo Western blot con anticuerpos para RAS, proteínas de la DDR así como ACC1, ACC1 fosforilada, AMPK y AMPK fosforilada (Figs. 19B y C).

Se observó que los niveles de RAS comenzaron a aumentar al día de iniciada la exposición a 4OHT y se mantuvieron hasta el día 12. Mientras que, una vez retirado el 4OHT del medio, los niveles de RAS comenzaron a descender hasta desaparecer casi totalmente al día 20 (Fig. 19B). Se evaluaron marcadores de la respuesta al daño al ADN observándose que al tercer día del inicio del tratamiento aumentó la fosforilación de ATM y al sexto día los niveles de p53. Ambos

marcadores de la DDR descendieron al día 20 sugiriendo que sus niveles dependen de la presencia de RAS (Fig. 19B). Por otra parte, el inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas p16 aumentó a partir del tercer día del estímulo manteniéndose elevado aún en ausencia de RAS (Fig. 19B), indicando que la inhibición de ciclo celular persiste aún en ausencia del estímulo inductor de la senescencia (Esquema 6). Luego, mediante la misma técnica, se evaluaron los niveles y fosforilación de AMPK y de la enzima ACC1. Como se observa en la Figura 19C, la fosforilación de AMPK y de ACC1, al igual que la de ATM, aumentó a partir del tercer día de exposición a 4OHT, se mantuvo elevada hasta el día 15 y disminuyó al día 20 al desaparecer RAS. Esto indica que la fosforilación y activación de AMPK, presentan un perfil similar al de la activación de la DDR.

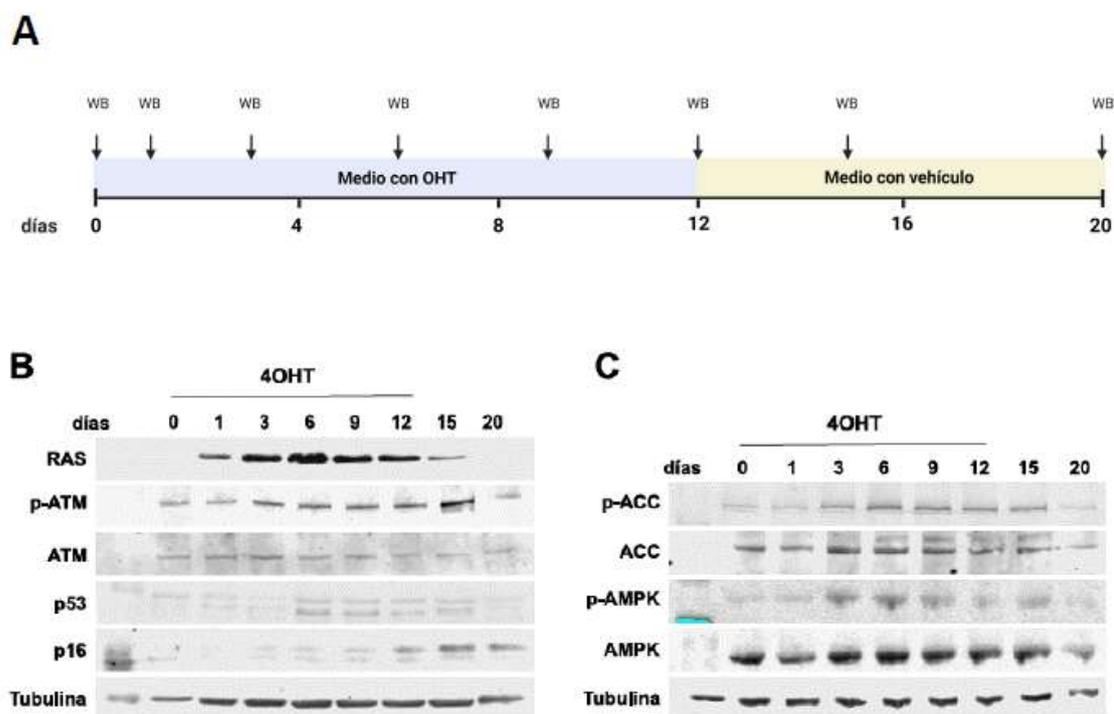


Figura 19. La fosforilación de ACC1 y AMPK descienden cuando disminuye la activación de la DDR. Los fibroblastos BJERRAS se expusieron a 4OHT (200 nM) durante doce días consecutivos, luego se cultivaron 8 días más sin 4OHT. Las células se lisaron a los días indicados desde el inicio de la exposición y se llevaron a cabo Western blots. **A-** El esquema muestra la estrategia de incubación y toma de muestra para realizar los Western blots. **B-** Western blots representativos con anticuerpos que reconocen a RAS, p-ATM (Ser1891), ATM, p53, p16 y tubulina. **C-** Western blots representativos con anticuerpos que reconocen a ACC, p-ACC (Ser79), AMPK, p-AMPK (Thr172), y tubulina.

Posteriormente, para profundizar en estas observaciones, se realizó un abordaje experimental similar. Se mantuvieron las células BJERRAS en cultivo durante 20 días en tres condiciones diferentes (Fig. 20A): i) incubadas 20 días en presencia de metanol (condición control); ii) incubadas 20 días en presencia de 4OHT (condición senescente con RAS, Sen +RAS); y iii) cultivadas 9 días en presencia de 4OHT y luego con metanol hasta el día 20 (condición senescente sin RAS, Sen -RAS). Se evaluaron los niveles y la fosforilación de diversas proteínas a tiempo final y se cuantificaron los niveles de distintos marcadores de la senescencia y del metabolismo celular (Fig. 20B).

De acuerdo con lo visto en la figura 19, la remoción del 4OHT al día 9 del cultivo condujo a un importante descenso en los niveles del oncogén RAS con respecto a los cultivos donde el 4OHT se mantuvo durante los 20 días (Fig. 20B). La fosforilación de ERK1/2 (treonina 202/204) indica que en la condición Sen +RAS la vía de las MAPK, activada por RAS, se encuentra activa mientras que en la condición Sen -RAS los niveles de fosforilación de ERK1/2 son equiparables a los de las células control. En estos cultivos también se evaluó la fosforilación de p53 en la Ser15 como marcador de la activación de la DDR, y los niveles de p21 inhibidor de las CDKs y marcador del cese de la proliferación cuya transcripción depende de la activación de p53. Como se observa en la Figura 20B la fosforilación de p53 presentó un aumento en la condición Sen +RAS, que fue mayor al incremento observado en Sen -RAS, pero las diferencias encontradas entre condiciones no fueron significativas. Sin embargo, los cambios observados en los niveles de p21 sí fueron significativos, se observó un aumento en p21 en la condición Sen +RAS con respecto al control, que se pierde en la condición Sen -RAS (Fig. 20B). Cabe destacar que los niveles de p21 correlacionaron positivamente con los niveles de RAS ($r = 0.6824$, $p < 0.05$), sugiriendo que la actividad de la DDR depende de la expresión de RAS (Esquema 6).

Por otra parte se evaluaron los niveles de p16, otro inhibidor de CDKs, cuya expresión es independiente de p53. Los niveles de p16 también aumentaron en las células senescentes que expresan a RAS (Sen +RAS) pero, a diferencia de lo visto para p21, al remover a 4OHT y por tanto a RAS no se observó una disminución significativa de los niveles de p16 en las células senescentes (Fig. 20B). También, a diferencia de lo visto para p21, los niveles de p16 en las

células Sen -RAS fueron significativamente mayores que los de las células control. Estos resultados sugieren que la vía de señalización que controla la expresión de p16 depende en menor medida de la presencia de RAS que la DDR. Los altos niveles de p16 en las condiciones Sen +RAS y Sen -RAS indican también un cese de la proliferación en ambas condiciones (Esquema 6).

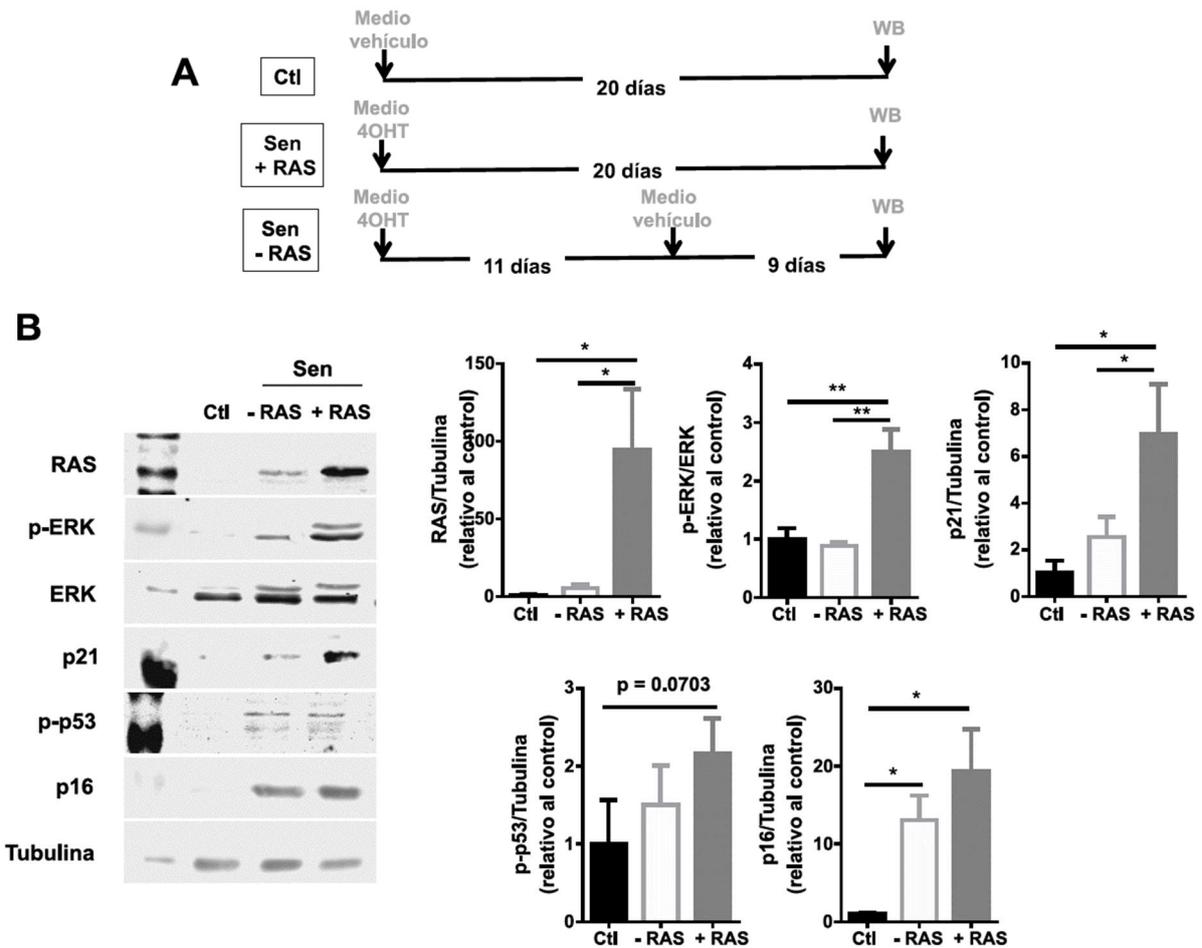


Figura 20. La activación de la DDR depende de los niveles de RAS. A- Los fibroblastos BJERRAS se mantuvieron en cultivo durante veinte días bajo tres estrategias experimentales. Se expusieron los veinte días a metanol (Ctl), o a 4OHT (200 nM) (Sen +RAS) o durante once días a 4OHT y luego se mantuvieron hasta los veinte días sin 4OHT (Sen -RAS). B- Se lisaron las células a los días indicados desde el inicio de la exposición, se llevaron a cabo Western blots y se cuantificaron las bandas. Se muestran los resultados obtenidos para RAS, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK1/2, p-p53 (Ser15), p21, p16 y tubulina. Las gráficas muestran el promedio \pm SD y las diferencias significativas se determinaron con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ ($n = 3$).

Se pasó a estudiar qué ocurría con el fenotipo secretor en estas condiciones, para lo cual se cuantificó la secreción de IL-8 por las células Sen +RAS y Sen -RAS. Se observó un aumento significativo en la secreción de IL-8 por las células senescentes que expresan a RAS, con

respecto al control, que se pierde en las células senescentes que no presentan a RAS (Fig. 21B). También se evaluaron los niveles de la proteína p65 (RelA), un componente del factor de transcripción NF- κ B responsable de la transcripción de los componentes pro-inflamatorios del fenotipo secretor de las células senescentes (49). Los niveles de esta proteína aumentaron significativamente en las células senescentes con respecto al control, siendo mayores en las células que presentan niveles más altos de RAS (Sen +RAS) (Fig. 21A). Este resultado indica que los niveles de p65 y la secreción de IL-8 dependen, al igual que la DDR, de la presencia de RAS (Esquema 6).

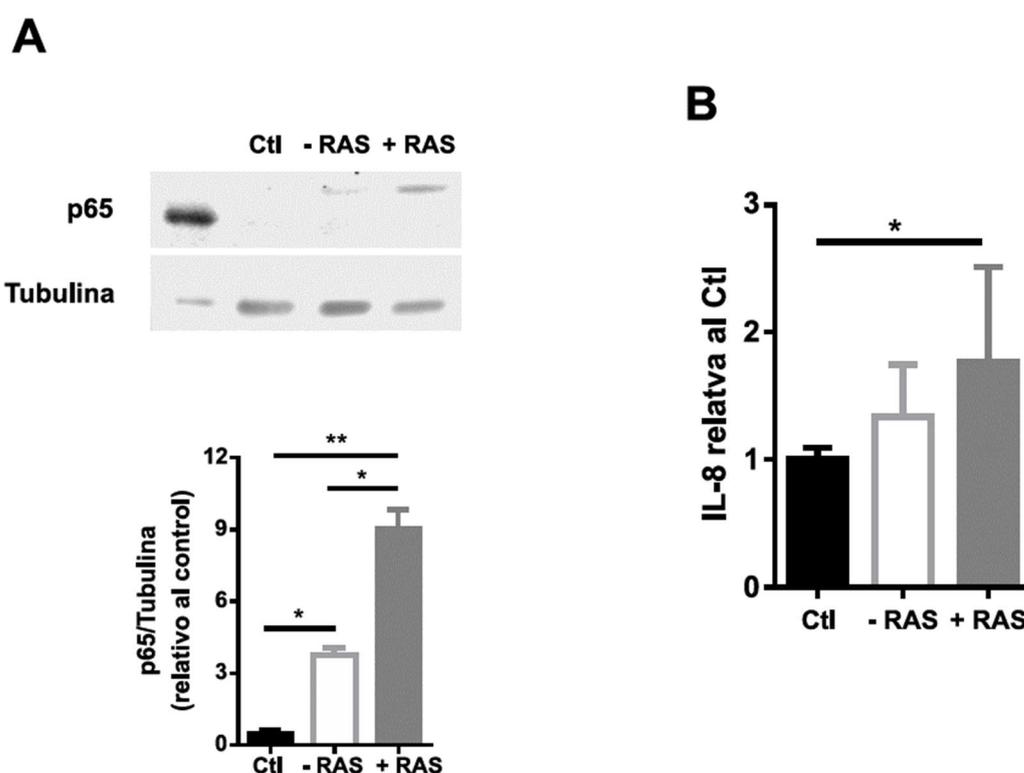
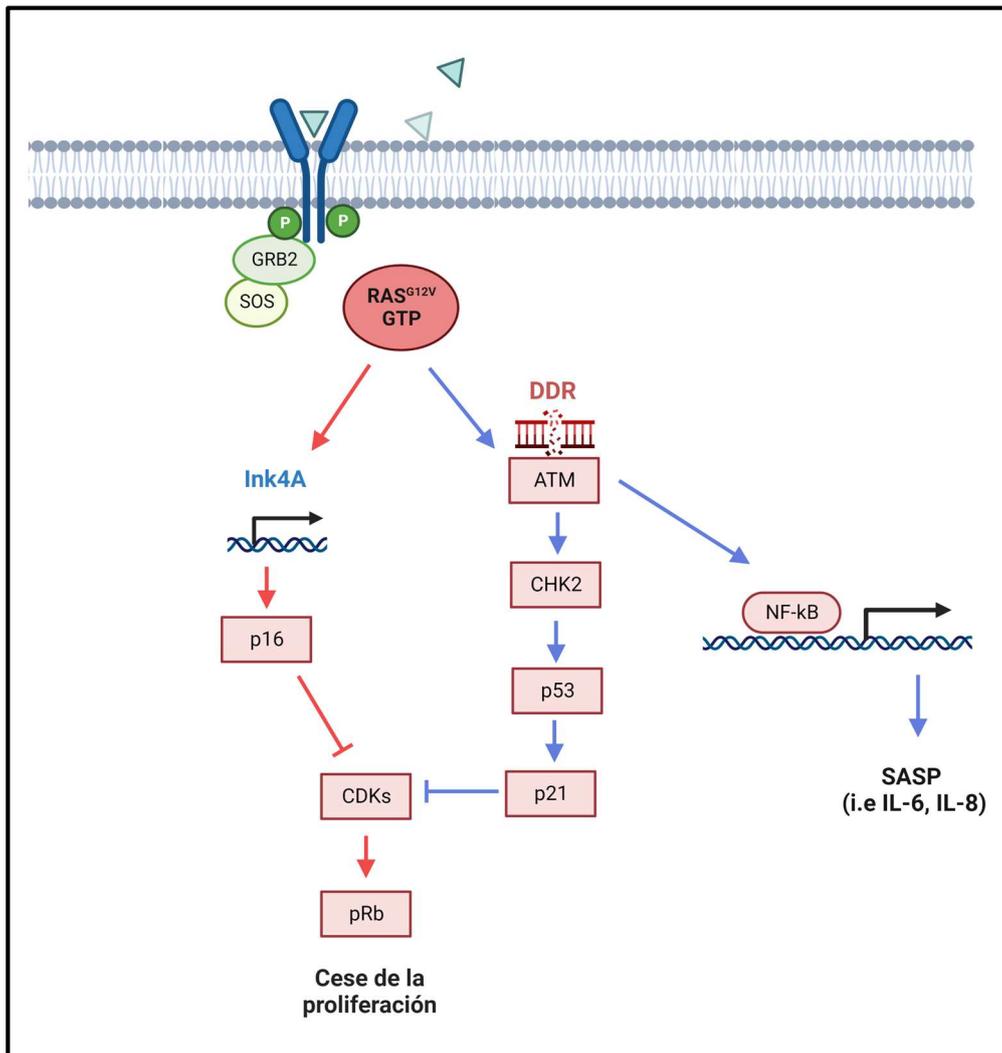


Figura 21. El fenotipo secretor depende de los niveles de RAS. Se trató a los fibroblastos BJERRAS como se describe en la figura 20A. **A-** se llevaron a cabo Western blots con un anticuerpo que reconoce a p65. **B-** Cuantificación de citoquinas secretadas mediante ELISA en el sobrenadante de los fibroblastos en cultivo. La cuantificación indica el promedio \pm SD y las diferencias significativas se determinaron con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ ($n = 3$).



Esquema 6. Vías de señalización activadas por H-RAS^{G12V}. El establecimiento de la senescencia celular inducida por H-RAS^{G12V} se acompaña de la activación de diversas vías de señalización. En el esquema se representan algunas de ellas: activación de la respuesta al daño al ADN (DDR), cese de la proliferación e inducción del fenotipo secretor (SASP), por activación de NF-κB. En azul se indican las vías que se apagan en ausencia de H-RAS^{G12V} y en rojo se indican los procesos que se mantienen en la senescencia en ausencia de RAS^{G12V}.

2.3.5- Vías metabólicas activadas por la expresión del oncogén RAS

Luego se continuó con el estudio del metabolismo energético en este modelo, determinando los niveles y fosforilación de la enzima ACC1 y la función mitocondrial de las células senescentes con distintos niveles de RAS (Sen +RAS y Sen -RAS).

En este caso se apreció un aumento en la fosforilación de ACC1 con respecto al control en los fibroblastos senescentes, siendo éste significativamente mayor en las células que presentan niveles elevados de RAS (Fig. 22A). Los niveles de ACC1 también aumentaron en las células senescentes, y se observó una diferencia significativa entre las células Sen +RAS y las células control (Fig. 22A). Además, se notó la aparición de dos bandas de distinto peso molecular que fueron reconocidas por los anticuerpos anti ACC1 fosforilada y anti ACC1 (Fig. 22A). Este diseño experimental, en el cual se modularon los niveles de RAS en células senescentes, permitió evaluar la existencia de correlaciones entre los niveles de fosforilación de ACC1 y diferentes proteínas. Se encontraron correlaciones positivas entre los niveles de ACC1 fosforilada (p-ACC) y los de RAS, p21, p16 y p65, siendo la más fuerte la encontrada entre p-ACC y p65 (Tabla 3). En este sentido, vale la pena mencionar que el perfil de fosforilación de ACC1 fue muy similar al de p65 (Figs. 21A y 22A), mostrando diferencias significativas entre las tres condiciones.

Tabla 3. Correlaciones de p-ACC con diferentes proteínas. Con los valores determinados a partir de la cuantificación de los Western blots en las figuras 20, 21 y 22 se calcularon las correlaciones entre el nivel de ACC fosforilada en la Ser79 (p-ACC) y los niveles de las proteínas que se indican en la tabla. Se muestra el coeficiente de correlación de Pearson (r) y el p valor para cada correlación.

	r	p
RAS	0.9340	0.0002
p21	0.7820	0.0128
p16	0.9340	0.0002
p65	0.9808	< 0.0001

Por último se estudió la respiración mitocondrial de las células Sen +RAS, Sen -RAS y control. Se observó que las células senescentes con niveles elevados de RAS (Sen +RAS) presentaban mayor velocidad de consumo de oxígeno que las células control, siendo todos los parámetros respiratorios determinados significativamente mayores (Fig. 22B). Sin embargo, al retirar el 4OHT y disminuir los niveles de RAS, se observó una caída en la respiración. En las células senescentes con bajos niveles de RAS (Sen -RAS), la velocidad de consumo de oxígeno basal, la ligada a la síntesis de ATP, la independiente de ATP y la no mitocondrial fueron semejantes a los de los cultivos control (Fig. 23B). El único parámetro que se mantuvo significativamente más elevado que el control fue la velocidad de consumo de oxígeno máxima (Fig. 22B), que

depende de la actividad y número de complejos respiratorios y por tanto del número de mitocondrias.

Nuevamente, al comparar los resultados obtenidos en los distintos modelos de senescencia celular se encontraron importantes diferencias. Nuestros resultados sugieren que en la senescencia inducida por el oncogén RAS hay una activación de la quinasa AMPK que conduce a la fosforilación de ACC1 y oxidación de los ácidos grasos, así como al aumento en la función mitocondrial, evaluada midiendo el consumo de oxígeno. En este sentido recordamos que AMPK promueve la biogénesis mitocondrial al fosforilar al coactivador transcripcional PGC-1 α (145). Estas alteraciones metabólicas no se observan en la senescencia inducida por daño al ADN, donde la exposición a H₂O₂ o a doxorrubicina no afecta la fosforilación de ACC1 por AMPK ni la respiración mitocondrial y reduce el consumo de oxígeno dependiente de ácidos grasos.

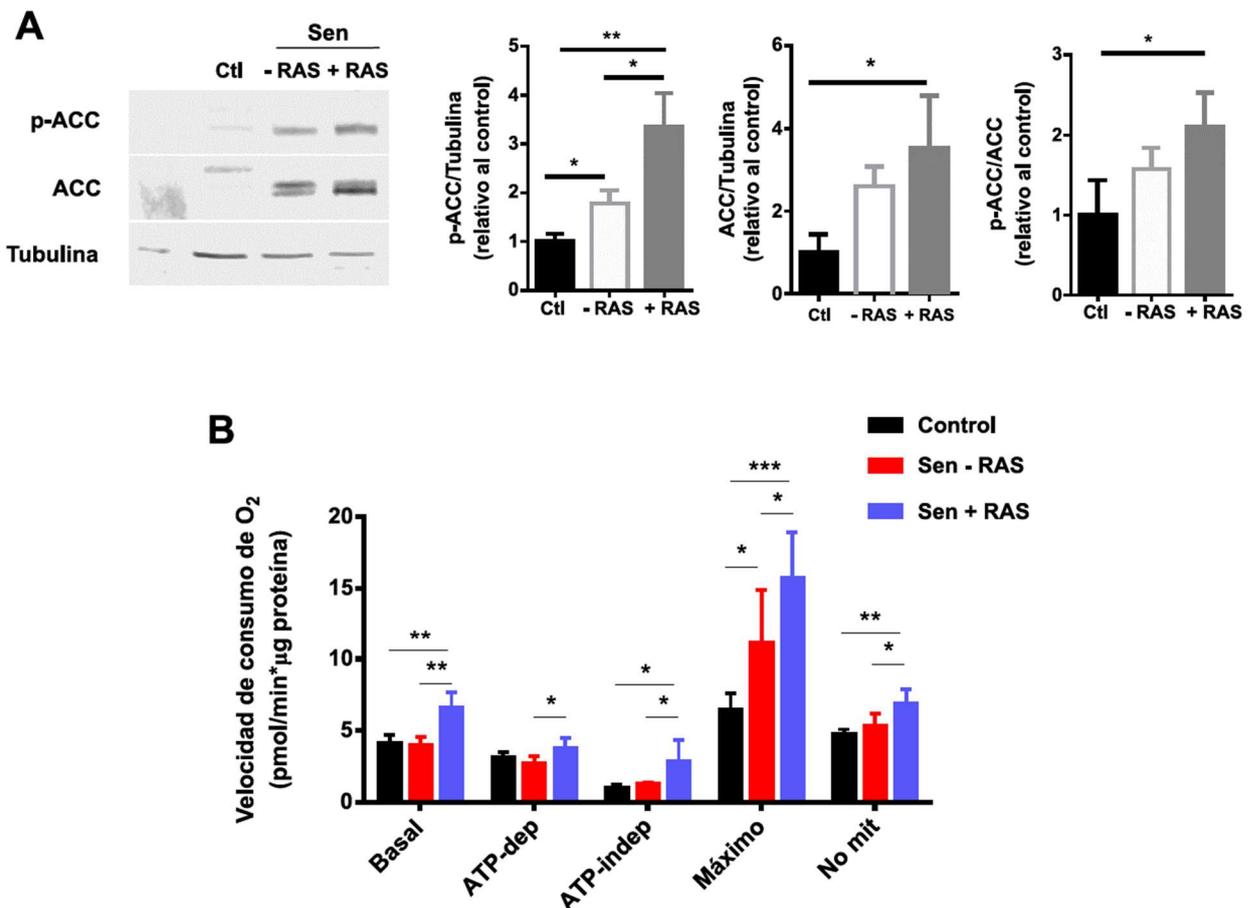


Figura 22. Función mitocondrial y la fosforilación de ACC1 depende de los niveles de RAS. Se trató a los fibroblastos BJERRAS como se describe en la figura 20A. **A-** Se lisaron a los días indicados desde el inicio de la exposición, se llevaron a cabo Western blots y se cuantificaron las bandas. Los anticuerpos utilizados reconocen a ACC, p-ACC (Ser79) y tubulina. **B-** Se determinó la velocidad de consumo de O₂ de fibroblastos BJERRAS Control (Ctl), Sen +RAS y Sen -RAS antes y después del agregado secuencial de oligomicina (0.5 μM), FCCP (1 μM, dos adiciones) y antimicina A (AA, 1 μM) y se calcularon los parámetros respiratorios obtenidos a partir de las medidas de consumo de O₂. Los resultados representan el promedio ± SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de una vía y test de Tukey para comparaciones múltiples, *p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001 (n = 6 – 7).

3- Fenotipo secretor y función mitocondrial en la senescencia inducida por el oncogén RAS

Considerando las diferencias observadas entre los distintos modelos de senescencia celular se procedió al estudio de la vinculación entre el fenotipo secretor y la función mitocondrial en las células IMR-90 senescentes por expresión del oncogén RAS.

Los fibroblastos IMR-90 senescentes por el oncogén RAS se encuentran enriquecidos en el componente de NF-κB p65 (51). Por esto, inicialmente se verificó la localización intracelular de p65 en las células por inmunocitoquímica (Fig. 23A). Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Dra. Mariana Bresque y el Dr. Carlos Escande del Institut Pasteur Montevideo. Se observó un mayor nivel de p65 nuclear en las células senescentes que en las células control (Fig. 23A), aunque la translocación al núcleo no fue tan evidente como la observada por otros autores (51). Para verificar que la secreción de citoquinas en estas células dependía de la actividad de NF-κB se utilizó BAY 11-7082, un inhibidor de la quinasa de IκBα (IKK) (257). Se valoró la toxicidad del inhibidor (10 μM), cultivando a las células en presencia del mismo durante 24 h, y no se observó una diferencia significativa en el número de células vivas con respecto al control incubado con el vehículo DMSO (no se muestra). Luego se evaluó el impacto del inhibidor en el fenotipo secretor de las células senescentes. La exposición a BAY 11-7082 inhibió fuertemente la secreción de las citoquinas IL-6 e IL-8 por parte de las células senescentes, sin afectar a las células expuestas al vehículo (Fig. 23B).

Por último se analizó qué ocurría con el consumo de oxígeno mitocondrial en presencia y ausencia del inhibidor BAY 11-7082 (Fig. 23C). Como se describió anteriormente (Fig. 17C) los parámetros respiratorios indicativos de la función mitocondrial fueron mayores en las células

senescentes inducidas por RAS que en los controles (Fig. 23C). Al evaluar la velocidad de consumo de oxígeno basal en las células senescentes en presencia de BAY 11-7082 no se observaron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros respiratorios (Fig. 23C). En presencia del inhibidor solo se observó una disminución significativa en la velocidad de consumo de oxígeno dependiente de la síntesis de ATP en las células senescentes, asemejándose a la velocidad de consumo de oxígeno de las células control. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la inhibición de NF- κ B, con la concomitante disminución en la secreción de citoquinas, impactó negativamente en la síntesis de ATP de las células senescentes. Estos resultados están de acuerdo con la idea de que la síntesis y secreción de citoquinas es un proceso energéticamente costoso que requiere de la síntesis de ATP.

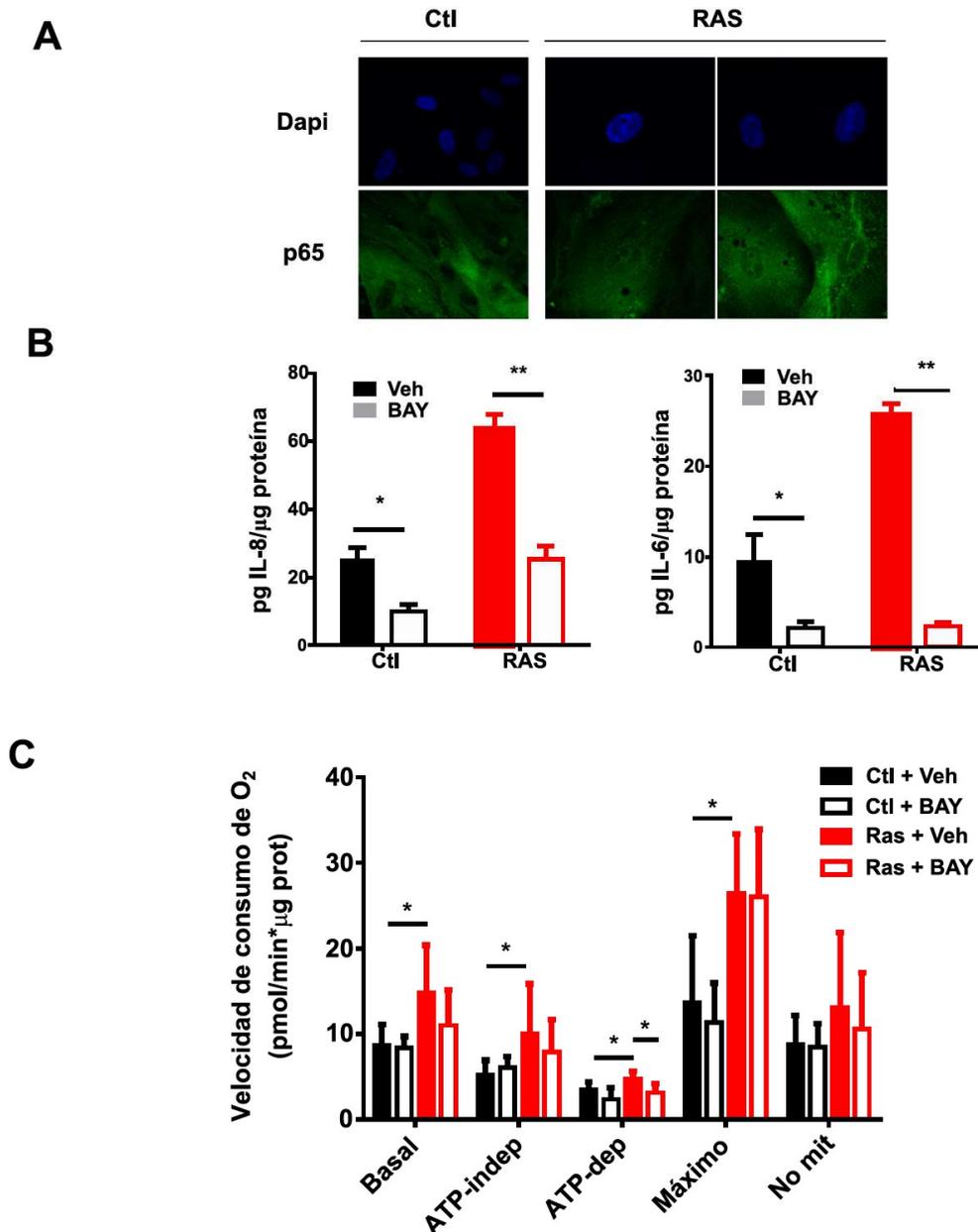


Figura 23: La inhibición de NF-κB reduce el consumo de oxígeno dependiente de la síntesis de ATP en la senescencia inducida por H-RAS^{G12V}. Se incubaron fibroblastos IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puromicina. Se incubaron las células en presencia de BAY 11-7082 (BAY, 10 μM, 24 h) o de DMSO (veh). **A-** Se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo anti-p65 y se agregó DAPI para marcar los núcleos, las células se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (630X) (n = 4-5). **B-** Se determinó mediante ELISA la secreción de IL-6 e IL-8 (n = 4-5). **C-** Se determinó la velocidad de consumo de oxígeno. Los resultados se analizaron utilizando ANOVA de dos vías con el test de comparaciones múltiples de Tukey *p < 0.05. Se indican a continuación los efectos principales del tratamiento, los lentivirus y su interacción, respectivamente, para IL-6 (p < 0.0001, p < 0.0001, p < 0.0001); IL-8 (p = 0.0001, p < 0.0001, p < 0.0001) y para la velocidad de consumo de O₂ dependiente de ATP (p < 0.001, p < 0.05, p = 0.4398).

4- Acetilación de lisinas proteicas en la senescencia inducida por el oncogén RAS

Los resultados presentados anteriormente, así como otros reportes (203), indicaban que la senescencia inducida por el oncogén RAS conduce a un aumento importante en la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial. Se ha visto que el aumento en esta vía puede llevar a un incremento en los niveles de acetil-CoA y a la acetilación de lisinas proteicas (258). Esta modificación postraduccional impacta fuertemente en la actividad de factores reguladores del metabolismo y diversas enzimas y complejos de la cadena respiratoria (111,113,162,165,173). Esto motivó el estudio de los niveles de acetil-lisina (AcK) proteica, los mecanismos de transporte de acetil-CoA de la mitocondria hacia el citosol, así como las proteínas responsables de la desacetilación de las proteínas celulares. Estos estudios se realizaron con el objetivo de indagar si el aumento en el metabolismo oxidativo de las células senescentes por expresión del oncogén RAS se debía a cambios en la acetilación de proteínas.

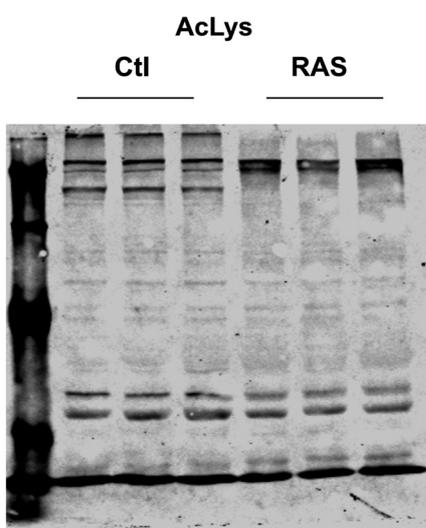


Figura 24: Las células senescentes presentan cambios en sus niveles de acetilación. Se incubaron células IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puromicina. Se llevaron a cabo Western blots utilizando un anticuerpo anti acetil lisina (AcLys).

Inicialmente se evaluó la acetilación de lisinas proteicas (AcK) en fibroblastos IMR-90 control y senescentes por expresión del oncogén RAS. Como se observa en la Figura 24 los perfiles de acetilación de homogeneizados de las células control y las células senescentes fueron diferentes. También se evaluaron, los perfiles de acetilación de las células senescentes en las distintas fracciones subcelulares: núcleo, mitocondria y citosol. Los datos preliminares indicaron la presencia de mayores niveles de acetilación de lisinas proteicas en las fracciones citosólica y nuclear de las células senescentes y alteraciones en el patrón de acetilación en la fracción mitocondrial con respecto a las células control (Fig. 25).

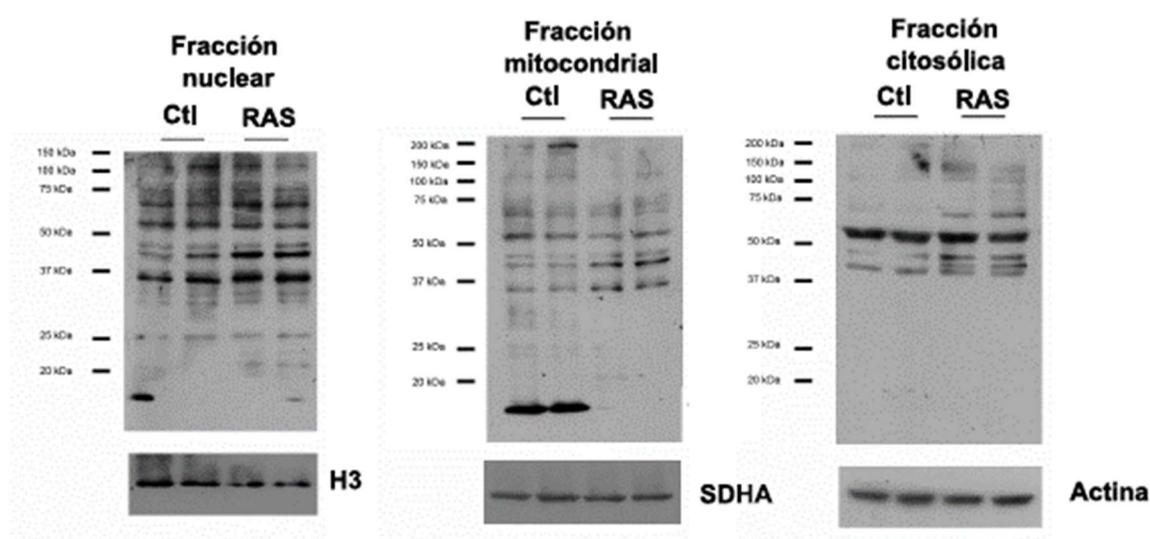


Figura 25. Las fracciones subcelulares de los fibroblastos senescentes presentan cambios en sus niveles de acetilación. Se incubaron células IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puromicina. Se realizó un fraccionamiento subcelular y se llevaron a cabo Western blots utilizando un anticuerpo anti acetil lisina (AcLys). Como control de carga se utilizaron anticuerpos anti proteínas características de cada fracción subcelular: histona 3 (H3), succinato deshidrogenasa (SDHA) y actina.

4.1- Vías de transporte de acetil-CoA de la mitocondria al citosol

La acetilación de lisinas proteicas se lleva a cabo a partir de acetil-CoA, y una de las principales fuentes de este metabolito es la β -oxidación de ácidos grasos que ocurre a nivel mitocondrial. Vía que, como ya mencionamos, se encuentra elevada en las células senescentes por expresión del oncogén. Una vez formado el acetil-CoA mitocondrial puede tener distintos

destinos, por ejemplo, puede condensarse con el oxalacetato para formar citrato, que a continuación es convertido en isocitrato en la reacción catalizada por la enzima aconitasa en el ciclo de Krebs y eventualmente degradado a CO₂ y H₂O. Por otra parte el citrato, formado a partir de acetil-CoA, puede ser exportado de la mitocondria al citosol a través del transportador de citrato. En el citosol, el citrato es convertido a acetil-CoA y oxalacetato en la reacción catalizada por la enzima ATP citrato liasa (ACL). Con el objetivo de comprender mejor estas rutas, se evaluaron a estas enzimas en fibroblastos control y senescentes por expresión del oncogén RAS.

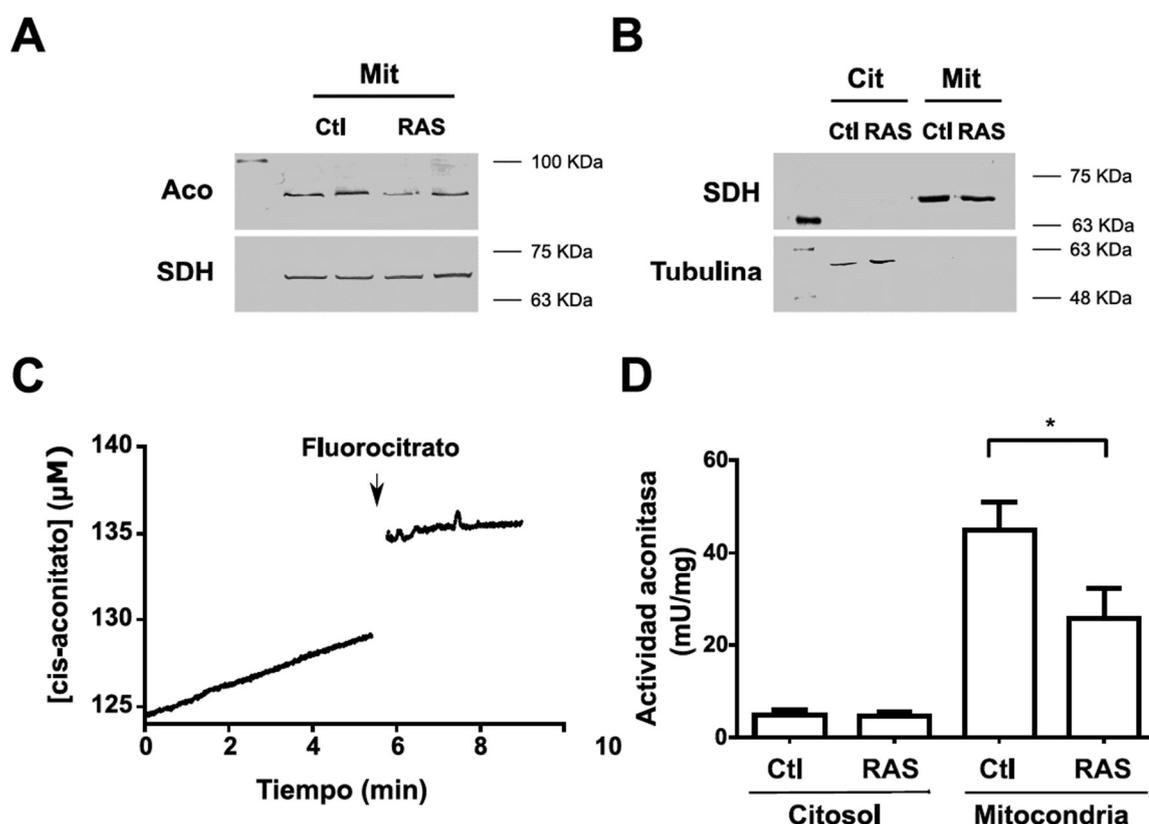


Figura 26. Las células senescentes tienen disminuidos los niveles y la actividad de la aconitasa mitocondrial. Se incubaron fibroblastos IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} (RAS) o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puromicina. **A-** Se llevaron a cabo Western blots con anticuerpos anti aconitasa mitocondrial y anti SDH en la fracción subcelular enriquecida en proteínas mitocondriales. **B-** Se controló el fraccionamiento subcelular llevando a cabo Western blots con anticuerpos anti succinato deshidrogenasa (SDH) y tubulina, marcadores de mitocondria (Mit) y citosol (Cit), respectivamente. **C-** Se evaluó la actividad aconitasa por medio de técnicas espectrofotométricas en ausencia y presencia de fluorocitrato (35 μM), un inhibidor de la actividad aconitasa. Se muestra un registro primario representativo de la medida. **D-** Se determinó la actividad aconitasa en las fracciones subcelulares enriquecidas en

proteínas citosólicas (Cit) y mitocondriales (Mit). Se muestra el promedio \pm SD (n = 3). Se analizaron los resultados por medio de la prueba t de Student, Ctl versus RAS * p < 0.05.

Se comenzó estudiando los niveles y actividad de la enzima aconitasa (Fig. 26). Como la aconitasa se ubica en el citosol y en la mitocondria, se realizó un fraccionamiento subcelular y se evaluó el enriquecimiento y pureza de las fracciones por Western blot con anticuerpos contra proteínas específicas de la mitocondria y el citosol; observándose mayores niveles de la enzima succinato deshidrogenasa en la fracción mitocondrial y mayores niveles de tubulina en la fracción citosólica (Fig. 26B). Luego se evaluaron los niveles de aconitasa en ambas fracciones (Fig. 26A), y se observó que los niveles de la aconitasa mitocondrial se encontraban disminuidos en las células senescentes con respecto a las células control. Por último, se llevaron a cabo los ensayos de actividad aconitasa en las fracciones citosólica y mitocondrial (Fig. 26C y D), observándose menor actividad de la aconitasa mitocondrial en las células senescentes con respecto las células control, mientras que no se observaron diferencias en la actividad de la aconitasa citosólica entre condiciones (Fig. 26D).

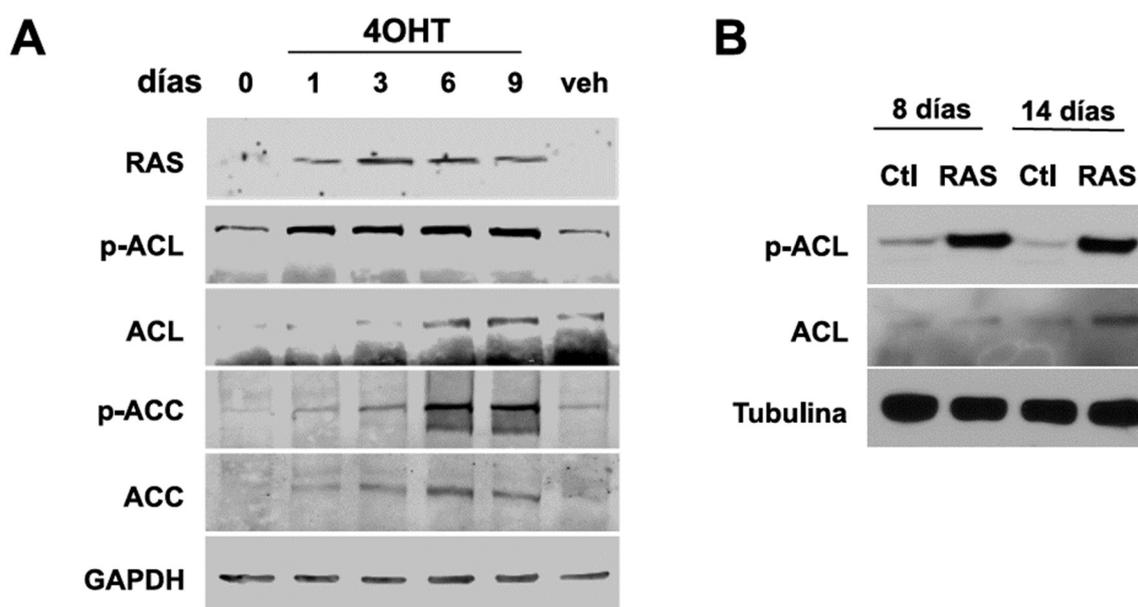


Figura 27. Cambios en los niveles de enzimas del metabolismo lipídico en fibroblastos senescentes. **A-** Los fibroblastos BJERRAS fueron expuestos a 4OHT (200 nM) o metanol (Met) y se realizaron Western blot a los días indicados. **B-** Se incubaron fibroblastos IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} (RAS) o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puromicina. Las células se lisaron ocho o quince días después de la transducción. En ambos casos se muestran Western blots representativos (n=2) con anticuerpos anti ACL, p-ACL (Ser455), ACC, p-ACC (Ser79) y anti GAPDH o tubulina como control de carga.

La disminución en los niveles y actividad de la aconitasa mitocondrial podría conducir a una acumulación de citrato en las mitocondrias de las células senescentes, que podría ser exportado al citosol. Por tanto, se evaluaron los niveles y fosforilación de la enzima citosólica ATP citrato liasa (ACL). Los fibroblastos IMR-90 senescentes por expresión del oncogén RAS presentaron un aumento en los niveles y fosforilación de ACL en la Ser455, evaluado a los días 8 y 14 de la transducción con el lentivirus portador del oncogén RAS (Fig. 27B), así como un aumento en los niveles de la enzima al día 14. De la misma forma, en las células BJERRAS se pudo observar un aumento en la fosforilación de ACL al día de la exposición a 4OHT, que se vuelve más intenso a medida que pasan los días y las células se tornan senescentes (Fig. 27A). También se observó un aumento en los niveles de ACL a partir del día 6 del agregado de 4OHT (Fig. 27A).

El hecho de que la enzima ACL, encargada de reponer el pool citosólico de acetil-CoA a partir del citrato, presente mayores niveles en las células senescentes y se encuentre activada por la fosforilación en la Ser455, apoyaría el aumento de acetil-CoA en el citosol. Cabe destacar que en las células senescentes la ACC1 se encuentra inhibida por fosforilación en la Ser79 (Fig. 28A), por lo que la acetil-CoA citosólica no se consumiría en la síntesis de ácidos grasos. Estos resultados sugieren que la acetil-CoA citosólica podría ser utilizada en procesos de acetilación a nivel citosólico y/o nuclear en las células senescentes.

4.2- Sirtuinas

Dado que los niveles de acetilación de las proteínas dependen también de las enzimas responsables de los procesos de desacetilación, se procedió a analizar los niveles de tres de las siete sirtuinas presentes en los mamíferos: SIRT1, SIRT3 y SIRT6. Se ha reportado que estas sirtuinas cumplen roles relevantes en la regulación del metabolismo energético celular, ya que catalizan la desacetilación y desacetilación de factores de transcripción y enzimas relevantes de varias vías metabólicas (127,186,259). Como se muestra en la Figura 28A, no hubo cambios en los niveles proteicos de SIRT1, mientras que los niveles de SIRT6 se encontraban aumentados y los de SIRT3 estaban disminuidos en células senescentes con respecto a las

células control. Al evaluar la expresión de estas tres desacetilasas se observó que en las células senescentes los niveles de ARNm de SIRT6 se encuentran aumentados, mientras que los de SIRT1 y SIRT3 están disminuidos con respecto a las células control (Fig. 28B). Decidimos profundizar los estudios sobre SIRT6 ya que se ha visto que regula positivamente la fosforilación y actividad de AMPK, así como la expresión de genes de proteínas de la β -oxidación y fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno mitocondrial (182,186).

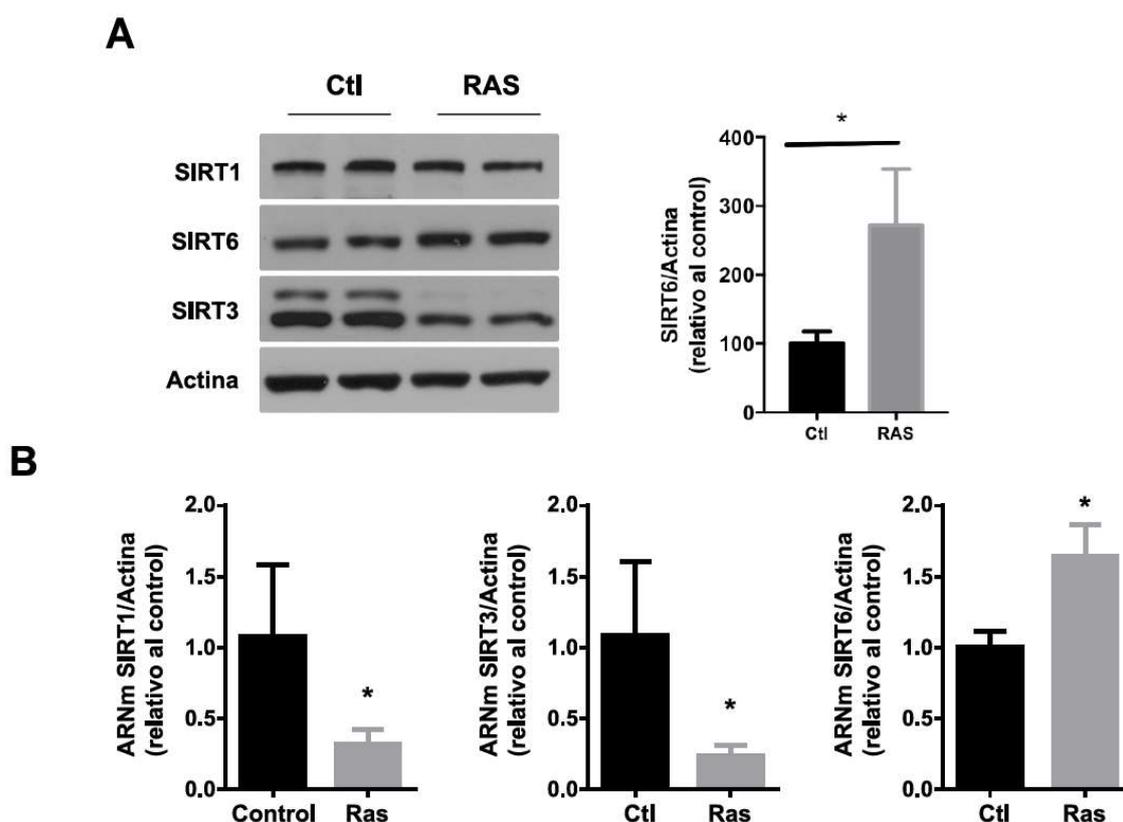


Figura 28. Las células senescentes por expresión del oncogén RAS presentan un aumento en los niveles de la sirtuina 6. Se incubaron fibroblastos IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puomicina. **A-** Se evaluaron los niveles de SIRT1, SIRT3 y SIRT6 mediante Western blot, se utilizó a la actina como control de carga. A la derecha se muestra la cuantificación de 4 Western Blots para SIRT6 (n = 7-9). **B-** Se midieron los niveles de ARNm mediante qRT-PCR (n = 3 - 4). En las gráficas se muestran los promedios \pm SD. Las diferencias significativas se determinaron por medio del test de Student *p < 0.05.

Se evaluó la localización subcelular de SIRT6 y se observó que en las células senescentes SIRT6 presentaba una localización nuclear (Fig. 29). También se evaluaron los niveles de SIRT6 en las células BJERRAS luego de inducir la expresión de H-RAS^{G12V} incubando con 4OHT. Los niveles

de SIRT6 aumentaron al día 1 del agregado de 4OHT al medio (Fig. 30A) y se mantuvieron elevados en las células senescentes durante todo el ensayo. Al realizar ensayos como los descritos en la Figura 20, retirando el 4OHT para disminuir los niveles de H-RAS^{G12V}, en las células senescentes disminuyeron los niveles de SIRT6 (Fig. 30B), indicando que dependen de la expresión del oncogén y presentan un perfil similar al de p21.

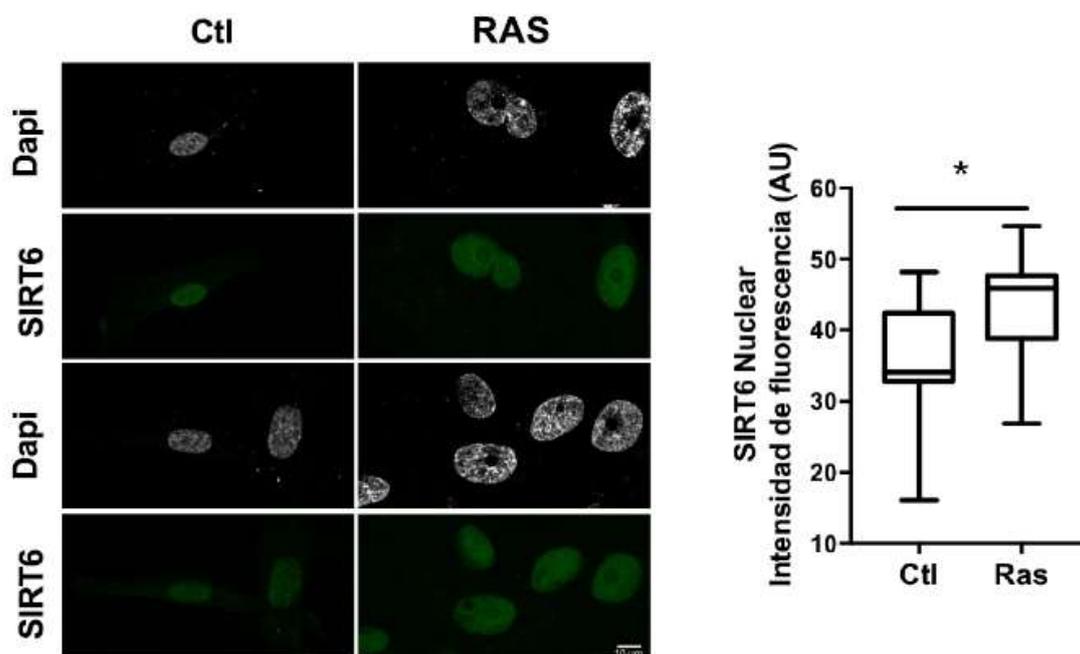


Figura 29. Localización subcelular de la sirtuina 6. Se incubaron fibroblastos IMR-90 con lentivirus portadores de H-RAS^{G12V} o un plásmido control (Ctl) y se seleccionaron con puomicina. Se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpo anti-SIRT6 (verde), se marcaron los núcleos con DAPI y se analizaron mediante microscopia confocal de fluorescencia (630X). El gráfico muestra la fluorescencia de SIRT6 en los núcleos celulares (n=8-25, *p < 0.05), observados en tres pocillos independientes.

En suma, se observaron cambios en los niveles de acetilación de varias proteínas en las células senescentes por expresión del oncogén RAS y se indagó en los mecanismos que podían estar detrás de los cambios observados. La acetilación de proteínas parece estar involucrada en las importantes modificaciones que se observan en la oxidación de ácidos grasos y la respiración mitocondrial de las células senescentes. Alternativamente, el aumento en el catabolismo de los ácidos grasos, junto a cambios en otras enzimas, podría alterar la acetilación de factores de transcripción e histonas modificando la expresión génica celular. Son necesarios más

estudios para comprender mejor estos procesos y su rol en la senescencia. Son necesarios más estudios para comprender mejor estos procesos y su rol en la senescencia.

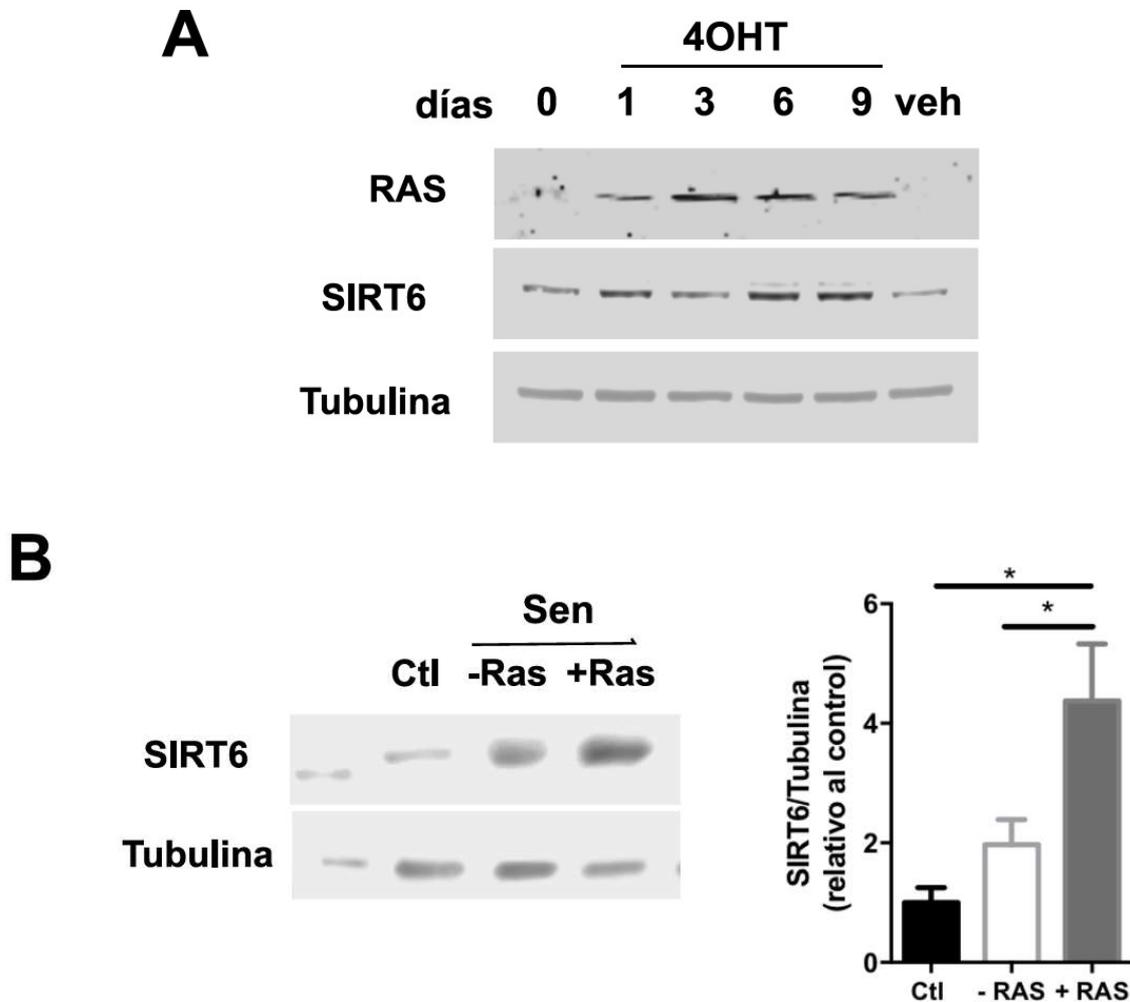


Figura 30. Los niveles de la sirtuina 6 aumentan en los fibroblastos senescentes BJERRAS. **A-** Los fibroblastos BJERRAS se expusieron a 4OHT (200 nM) durante 9 días consecutivos, las células se lisaron a los días indicados desde el inicio de la exposición y se llevaron a cabo Western blots con anticuerpos que reconocen a RAS, SIRT6 y tubulina. **B-** Los fibroblastos BJERRAS se mantuvieron en cultivo durante veinte días mientras se realizaron tres estrategias experimentales. Se expusieron los veinte días a metanol (Ctl), a 4OHT (200 nM) (Sen +RAS) o durante once días consecutivos a 4OHT y luego se mantuvieron hasta los veinte días sin 4OHT (Sen -RAS). Se lisaron las células y se llevaron a cabo Western blots con anticuerpos que reconocen a SIRT6, y a tubulina como control de carga. Las cuantificaciones indican el promedio \pm desvío estándar y las diferencias significativas se determinaron con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey, * $p < 0.05$, (n = 3).

DISCUSION

Las células senescentes se caracterizan por un conjunto de marcadores moleculares y morfológicos que las definen, pero también existen diferencias importantes entre los distintos modelos de senescencia celular por lo que se encuentran fenotipos senescentes heterogéneos y dinámicos, probablemente como consecuencia del tipo celular, de la intensidad o periodicidad del estímulo inductor y del contexto en el que se encuentre la célula al senescer (238).

En este trabajo se hizo foco en el estudio del metabolismo lipídico de las células senescentes en tres modelos distintos de senescencia que se obtuvieron aplicando tres estímulos diferentes sobre el mismo tipo de cultivo celular, los fibroblastos de pulmón fetal humano IMR-90. Los estímulos utilizados para inducir la senescencia celular fueron: exposición al oxidante H_2O_2 , exposición al quimioterápico doxorubicina, o sobreexpresión del oncogén RAS (H-RAS^{G12V}). Todos los estímulos utilizados indujeron la senescencia en este tipo celular; en los tres modelos se observó la activación de la DDR, el cese de la proliferación celular que se siguió hasta los 14 días post-estímulo, y el aumento en la actividad SA- β -Gal. En los modelos de senescencia por daño al ADN, el fenotipo secretor SASP fue muy débil o se encontró ausente, y curiosamente también presentaron una activación transitoria de la respuesta al daño al ADN (DDR), a diferencia de lo encontrado y ya reportado para la senescencia inducida por oncogenes (5,195,203,247). Se ha demostrado que luego de un daño al ADN, es necesaria la activación permanente de la DDR para establecer el fenotipo secretor (57,58). En estos reportes (57, 58) se demostró que las células que logran resolver el daño al ADN retoman el ciclo celular, sin la secreción de factores inflamatorios. En concordancia con estos resultados se ha reportado que la secreción de factores proteicos ejerce un efecto autócrino reforzando a la DDR y el estado senescente (39). Por otra parte, se ha visto que a medida que las células envejecen y se va estableciendo la senescencia replicativa, se dan dos procesos: por un lado las células acumulan focos de daño al ADN y por otro lado aumenta la secreción de factores sugiriendo una dependencia entre ambos eventos (57). En esta tesis se logró establecer dos modelos de senescencia celular por daño al ADN, por exposición a H_2O_2 o a doxorubicina, en los que se activa transitoriamente la DDR luego del estímulo desencadenante de la senescencia, y aunque el cese de la proliferación se sostuvo en el tiempo, no se estableció el

fenotipo secretor, apoyando la idea de que es necesaria la activación permanente de la DDR para inducirlo. Debemos mencionar que otros autores han observado un fenotipo secretor en líneas celulares inmortalizadas, donde la senescencia fue desencadenada por exposición a H₂O₂ (260) y por doxorubicina (261).

Los resultados obtenidos en la senescencia inducida por RAS en las células IMR-90 (pulmón fetal humano) se replicaron en las células BJERRAS (piel humana). Los fibroblastos BJERRAS presentaron una activación persistente de la DDR y secreción de factores proteicos en presencia del oncogén RAS, sin embargo, la disminución de los niveles de RAS oncogénico indujo el descenso de los niveles de las proteínas de la DDR sin afectar el cese de la proliferación.

Metabolismo de ácidos grasos

Los lípidos son moléculas que presentan múltiples funciones en los tejidos que incluyen funciones estructurales como componentes de las membranas, son reservorios de energía y también son moléculas señalizadoras. Se puede inferir que ciertos cambios asociados a la senescencia podrían alterar al metabolismo lipídico, como por ejemplo la secreción de factores en exosomas, el aumento de los lisosomas, y el cese de la proliferación por sí mismo también podría impactar en el metabolismo lipídico. Los reportes encontrados sobre la síntesis lipídica en las células senescentes son contradictorios. Un reporte indica que en senescencia replicativa y por daño al ADN hay un incremento en los niveles de las enzimas vinculadas a la lipogénesis como la ácido graso sintasa FAS, ATP citrato liasa ACL y la acetil CoA-carboxilasa ACC, y dichos cambios están asociados a un aumento de SREBP1 activo (81). En cambio, otros autores indican que hay una disminución en los niveles de las enzimas ácido graso sintasa y esteroil CoA desaturasa-1 en un modelo de senescencia replicativa (262). Las observaciones realizadas por nuestro grupo, en el marco de estas tesis y de otros trabajos, están de acuerdo con estos últimos, ya que muestran una disminución en la síntesis de lípidos en la senescencia por daño al ADN, replicativa, y por expresión del oncogén RAS (203,263). Sin embargo, los mecanismos que sostienen la inhibición de la síntesis lipídica son diferentes en los distintos modelos de senescencia celular. La inhibición de la síntesis lipídica en la

senescencia inducida por el oncogén RAS está promovida principalmente por la activación de la AMPK, y fosforilación de la ACC1, además es permanente (203). Mientras que en los modelos de senescencia por daño al ADN, la inhibición es transitoria y se acompaña de disminución de los niveles de la enzima ACC1 asociados a un descenso en los niveles del ARNm de ACC1.

Es importante notar que existen otras diferencias entre los modelos de senescencia inducida por el oncogén RAS y por daño al ADN. En la senescencia inducida por oncogén RAS se observa una activación persistente de la DDR y un fuerte fenotipo secretor, mientras que en los modelos de senescencia por daño al ADN se encuentra una activación transitoria de la DDR con pobre o nula secreción de factores. También resulta interesante analizar la coincidencia temporal entre la activación de la DDR y la inhibición de la síntesis lipídica. En el modelo de senescencia inducida por RAS^{G12V} se observa que ambos fenómenos tienen cinéticas similares, extendiéndose aproximadamente entre los 3 y los 12 días (Figura 19), mientras que en los modelos de senescencia inducida por daño al ADN se observa la activación transitoria de la DDR y la inhibición de la síntesis lipídica a las 24 horas del estímulo, que no se sostiene en el tiempo. Por lo tanto, surge la interrogante de si hay un vínculo entre la DDR y los cambios metabólicos observados, vinculados además a la activación de AMPK. En este sentido, varios trabajos indican una activación de AMPK luego de la activación de la DDR, por radiación ionizante (264,265) o por exposición a etopósido (33), ambos estímulos inductores de senescencia. También hay reportes que indican que la fosforilación de AMPK puede darse de forma dependiente de ATM e independiente de LKB (34,266) y otros que indican que AMPK podría a su vez promover la expresión de ATM (267). Estos trabajos apuntan al eje ATM- AMPK como una vía de comunicación núcleo – mitocondria, que coordina la DDR con el metabolismo energético en determinadas condiciones. En la senescencia celular, la activación de ATM llevaría tanto a un cese de la proliferación, mediado por p53/p21, como a una disminución de la síntesis lipídica.

Continuando con la caracterización del metabolismo de ácidos grasos, se estudió su catabolismo en los distintos modelos de senescencia celular. Las células senescentes por RAS^{G12V} presentan un aumento en la β -oxidación mientras que las células senescentes por daño al ADN una disminución de la vía. En la senescencia inducida por el oncogén RAS, la β -oxidación es necesaria para la secreción de factores inflamatorios (203). Se encuentran otros

trabajos en la literatura en los que la inhibición de la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa mitocondrial altera el fenotipo secretor de las células senescentes, disminuyendo la secreción de factores dependientes de IL-1 (211). Mientras que disminuye la secreción de IL-6 con el silenciamiento de la expresión de las mitofusinas (194), y la inhibición de la actividad de la nicotinamida fosforribosil transferasa disminuye la secreción de factores proinflamatorios (204). En los casos mencionados, las alteraciones en la función o morfología mitocondrial modifican el fenotipo secretor sin afectar la proliferación celular ni otros marcadores de senescencia celular (194,203,204,211).

Teniendo en cuenta que las alteraciones metabólicas pueden afectar cualitativa y cuantitativamente al fenotipo secretor, se amplió un poco más el estudio del catabolismo a través del estudio de la función mitocondrial. En los modelos de senescencia celular inducidos por daño al ADN no se encontraron grandes cambios con relación al control. Sin embargo, el estudio de la función mitocondrial en los modelos de senescencia inducida por el oncogén RAS, reveló que las células presentaban un aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial evidenciado por un aumento en las velocidades de consumo de oxígeno mitocondrial basal destinada a la síntesis de ATP, así como una elevada capacidad de reserva e índice de control respiratorio. En las células BJERRAS los parámetros respiratorios de las células senescentes por expresión de RAS^{G12V} también son mayores que los de las células control, de acuerdo con lo visto por otros autores (199). La elevada respiración máxima denota un aumento en el número de mitocondrias o de complejos mitocondriales, o un aumento en su actividad. Nuestros resultados están de acuerdo con los visto por otros autores que plantean que estas células presentan mayor relación ADN mitocondrial/ADN nuclear, y mayor masa mitocondrial debido a un aumento en la biogénesis del organelo (191).

Por otra parte, en las células senescentes donde se retiró al inductor (4OHT) y disminuyeron los niveles de RAS^{G12V}, se observó una caída en todos los parámetros respiratorios a nivel del control. Con excepción de la velocidad máxima, que cayó pero continuó siendo significativamente mayor que la encontrada en las células no senescentes, las condiciones del ensayo podrían explicar por qué no cambió este parámetro al disminuir los niveles del oncogén RAS. El diseño experimental utilizado implicaba cultivar a las células durante once días con el estímulo inductor de RAS^{G12V} (4OHT), luego se retiraba y se mantenía el cultivo

durante nueve días en su ausencia. Los niveles de RAS^{G12V} decayeron lentamente una vez retirado el 4OHT del medio y lo mismo sucedió con los procesos corriente abajo que dependían del oncogén. Sin embargo, la disminución del número de mitocondrias o de complejos mitocondriales quizás sea un proceso más lento que la inducción de cambios en el metabolismo, por lo que es posible que no se vean reflejados los cambios en el número de mitocondrias o de complejos mitocondriales con sólo nueve días de ausencia de 4OHT. Es posible que los cultivos requieran más tiempo en ausencia de RAS para revertir el aumento en la masa mitocondrial. De hecho, en un modelo similar de senescencia inducida por RAS^{G12V} en fibroblastos IMR-90, Takebayashi y colegas no observan cambios en el consumo de oxígeno mitocondrial al retirar el inductor (4OHT) durante solo 4 días (199).

También los niveles de p-ACC1 correlacionan con los niveles RAS. Teniendo en cuenta la activación persistente de la DDR y los cambios metabólicos observados en las células RAS senescentes y que no están presentes en los modelos de senescencia celular por daño al ADN, surge la pregunta si están vinculados a la presencia del fenotipo secretor. La actividad de RAS podría mantener activa a la DDR y la DDR ser responsable de los cambios metabólicos (ATM-AMPK-PGC1 α/β) o simplemente los cambios se deben a la sobreexpresión del oncogén.

Tomando en cuenta los resultados previos y las diferencias encontradas en los modelos de senescencia celular en las células IMR-90, se podría plantear que el aumento en la función mitocondrial y en la β -oxidación que mantiene energéticamente al fenotipo secretor de las células senescentes, es dependiente de los niveles del oncogén RAS, y mediado por la DDR. Las observaciones recién descritas sostienen la idea que el aumento en metabolismo oxidativo observado en las células senescentes inducidas por el oncogén RAS es ocasionado probablemente por la activación persistente de ATM y AMPK. El regulador de la biogénesis mitocondrial PGC-1 α es fosforilado y activado por AMPK y podría ser el efector corriente abajo de AMPK que induzca las alteraciones mitocondriales que presentan las células senescentes por expresión de RAS^{G12V} (120,123,127). Alternativamente, la biogénesis mitocondrial podría depender de PGC-1 β , cuya expresión también se encuentra regulada por AMPK, ya que se ha reportado que este factor regula la biogénesis mitocondrial en la senescencia inducida por irradiación (190,268) (Esquema 7).

Fenotipo secretor y función mitocondrial en la senescencia inducida por RAS

Analizando las diferencias encontradas entre los modelos de senescencia se hipotetizó que el alto consumo de oxígeno destinado a la síntesis de ATP que presentan las células senescentes inducidas por expresión de RAS oncogénico podría ser consecuencia de una alta demanda energética provocada por la síntesis y secreción de componentes del SASP.

El fenotipo secretor de las células senescentes es regulado de forma dinámica por los factores de transcripción NF- κ B y C/EBP β (49). A su vez se ha reportado que NF- κ B promueve la respiración y obtención de ATP a nivel mitocondrial en fibroblastos murinos en condiciones de escasez de glucosa (269). Por tanto, se evaluó el impacto de inhibir a NF- κ B utilizando un inhibidor de la quinasa IKK en las células IMR-90 senescentes por RAS^{G12V}. Se observó que la inhibición de NF- κ B impactaba negativamente en el fenotipo secretor y también en la respiración dependiente de la síntesis de ATP mitocondrial. Esto sugiere que parte de la alta tasa de síntesis de ATP que presentan las células senescentes por el oncogén RAS, podría estar destinada a la síntesis y secreción de factores proinflamatorios. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en otros parámetros respiratorios como la respiración basal o máxima.

Se debe mencionar que al inhibir a NF- κ B no se observó una inhibición total del SASP y que tan solo se incubó a las células con el inhibidor por 24 h (ya que el mismo resultó citotóxico a tiempos más largos). Sería interesante poder lograr una mayor inhibición de NF- κ B y por más tiempo, utilizando otros inhibidores de NF- κ B como los reportados en (270,271) o silenciando la expresión de alguno de sus componentes (51), y evaluar la función mitocondrial nuevamente. Por otra parte, además de NF- κ B, otras proteínas, como mTOR, p53 y la DDR, también participan en la regulación del SASP (272). Correia-Melo y colegas proponen que la cascada de fosforilación ATM- Akt - mTORC-1 regula la biogénesis mitocondrial dependiente de PGC-1 β en la senescencia inducida por irradiación en fibroblastos (190); sería interesante evaluar si este eje es responsable del aumento en la respiración mitocondrial en nuestro modelo.

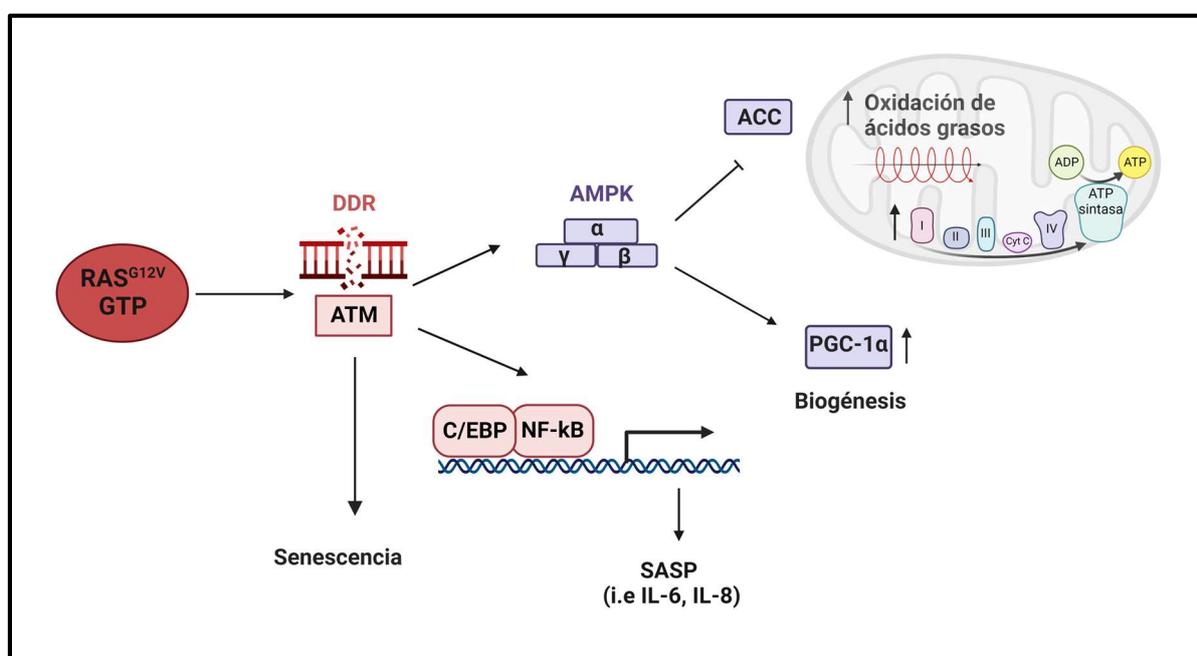
Como se mencionó previamente, el fenotipo secretor es regulado por múltiples vías. De los experimentos realizados con las células BJERRAS senescentes se desprende que los niveles de

p65 (componente de NF- κ B) y la secreción de factores proinflamatorios correlacionan con los niveles de RAS^{G12V}. Los niveles de p-ACC1, indicativos de la actividad de AMPK y la oxidación de ácidos grasos, y el aumento de la función mitocondrial también correlacionan con los niveles del oncogén. Lo mismo ocurre con la fosforilación de p53 (Ser15) y los niveles de p21, vinculados a la activación de la DDR. Estos datos sugieren que la activación constitutiva de RAS^{G12V} podría mantener activa a la DDR, y esta cascada de señalización podría ser responsable a su vez de la activación de AMPK que conduce a la fosforilación de ACC1 (ATM-AMPK-ACC1) y la biogénesis mitocondrial (ATM-AMPK-PGC1 α), y por tanto a los cambios metabólicos observados (Esquema 7).

Por otra parte, los cambios en el metabolismo energético podrían deberse a la activación de otras cascadas de señalización ligadas a la expresión del oncogén RAS, como la vía de las MAPK o de PI3K/Akt. Esta segunda idea tiene poca fuerza debido a que la mayoría de los cambios metabólicos descritos para la activación del oncogén RAS (fuera del contexto de la senescencia) implican un aumento del anabolismo, inhibición del catabolismo y aumento de la fermentación láctica (conocido como efecto Warbug) para satisfacer los requerimientos de la proliferación (245). Más específicamente vinculado al metabolismo lipídico se ha visto que la activación de la vía de las MAPK por el oncogén BRAF^{V600E} (se recuerda que la quinasa BRAF se encuentra corriente abajo en la cascada de señalización de RAS) inactiva a AMPK a través de la activación de ERK1/2 que fosforila a LKB impidiendo que ésta se una y active a AMPK (273,274). Además se ha visto que el oncogén K-RAS^{G12V} promueve la expresión de genes involucrados en la lipogénesis como la ACL, ACC1 y FAS y la síntesis de lípidos en células transformadas. Esto quizás explique el aumento observado en los niveles de ACC1 y ACL al expresar RAS^{G12V} en fibroblastos, aunque en estas células senescentes y no proliferantes, la síntesis de lípidos se encuentra inhibida a diferencia de lo que ocurre en el cáncer (203).

Teniendo en cuenta la activación persistente de la DDR y los cambios metabólicos observados en las células RAS senescentes, que no están presentes en los modelos de senescencia celular por daño al ADN donde la DDR se activa en forma transitoria, se podría plantear que el aumento en la función mitocondrial y en la β -oxidación son mediados por la DDR y dependientes de los niveles del oncogén RAS. Estos cambios metabólicos son a su vez necesarios para mantener al fenotipo secretor de las células senescentes. Por otra parte, el

aumento en la autofagia, observado en las células senescentes (275,276), también podría estar involucrado en los cambios metabólicos observados (Esquema 7). En células de cáncer de pulmón que presentan al oncogén K-RAS^{G12D} se ha observado que el proceso de autofagia induce cambios en la respiración mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos (275). También se ha observado una dependencia de la autofagia con la oxidación de ácidos grasos en otros tipos de cáncer (276–278). Además de su rol clásico de degradación de componentes celulares, la autofagia es necesaria para la secreción de IL-6 e IL-8 (279).



Esquema 7. Regulación concertada del fenotipo secretor y vías metabólicas por la DDR en la senescencia inducida por RAS^{G12V}. Hipotetizamos que la activación de RAS^{G12V} conduce a la activación persistente de ATM, que a su vez induce el fenotipo secretor (SASP) mediado por NF-κB, y la activación de AMPK. La quinasa AMPK fosforila e inhibe a la ACC conduciendo a un aumento en la β-oxidación de ácidos grasos y la función mitocondrial a través del aumento de la biogénesis mitocondrial mediada por PGC-1α (117–122).

Acetilación de lisinas proteicas en la senescencia inducida por el oncogén RAS

Los resultados obtenidos a partir del estudio del metabolismo lipídico indican que las células senescentes por expresión del oncogén RAS presentan mayor actividad en la vía de la β-oxidación mitocondrial de ácidos grasos, una vía productora de acetil-CoA. Por otra parte se observó que los niveles y actividad de la aconitasa mitocondrial se encontraban disminuidos,

por lo tanto los niveles de acetil-CoA podrían estar aumentados en la matriz mitocondrial. También se observó que la ATP citrato liasa, encargada de reponer el pool citosólico de acetil-CoA a partir del citrato, presentaba mayores niveles en las células senescentes y se encontraba activada por la fosforilación en la Ser455. Esto podría conducir a un aumento de acetil-CoA en el citosol. En las células senescentes, la ACC1 se encuentra inhibida por fosforilación en la Ser79, por lo que la acetil-CoA citosólica no se consumiría en la síntesis de lípidos. De estas consideraciones se desprende la pregunta: ¿podría la acetil-CoA citosólica ser utilizada en procesos de acetilación?

Al evaluar la acetilación de lisinas proteicas, se observaron mayores niveles en las fracciones citosólica y nuclear y alteraciones en el patrón de acetilación en la fracción mitocondrial de las células senescentes con respecto a las células control. Además, en las células senescentes por expresión del oncogén RAS también se encontraron elevados los niveles de la desacetilasa SIRT6, tanto de ARNm como de la proteína, así como de la histona 3 acetilada (H3K9), sustrato de SIRT6. Esta enzima cataliza la desacetilación de múltiples blancos, regulando el metabolismo energético, la secreción de citoquinas y la reparación del ADN (181,183,280). La SIRT6 es una enzima que además de tener actividad desacetilasa, posee actividad deacilasa, y participa en la desmiristoilación del TNF- α promoviendo su secreción y efectos proinflamatorios (183). Por otra parte actúa como regulador negativo de NF- κ B, ya que interacciona con p65 y desacetila a la H3K9 en sus genes blanco evitando su expresión (181). Por otra parte participa en la ribosilación de PARP1 en condiciones de estrés oxidativo, conduciendo a la reparación del daño al ADN y contribuye a la estabilidad genómica promoviendo la reparación de los telómeros (280–282). También modula positivamente la respiración mitocondrial (182) y el catabolismo de ácidos grasos (185,283). Particularmente en el músculo esquelético se observó que SIRT6 aumenta el catabolismo a través de la activación de AMPK y su ausencia promueve la lipogénesis (186). Con los estudios realizados hasta el momento no hemos podido dilucidar aun el rol que juega la SIRT6 en la célula senescente por expresión del oncogén RAS pero esperamos avanzar en este sentido en un futuro próximo.

CONCLUSIONES

En el presente proyecto se establecieron diferentes modelos de senescencia en los fibroblastos humanos. Los estímulos utilizados para inducir la senescencia fueron: exposición a H₂O₂, exposición a doxorubicina y expresión del oncogén RAS. Las células senescentes por daño al ADN presentaron dos diferencias importantes con respecto a las células senescentes por expresión del oncogén RAS. Mientras que en los primeros modelos, la activación de la DDR fue transitoria, con un máximo de activación a las 24 horas, en el modelo de senescencia por expresión del oncogén RAS la activación fue permanente manteniéndose por más de 14 días. Por otro lado las células portadoras del oncogén RAS presentaron un fuerte fenotipo secretor, mientras que este fue muy débil o ausente en los otros modelos de senescencia. En este modelo se determinó que la activación de la vía ATM-p53-p21 y el fenotipo secretor dependían de los niveles de RAS.

El metabolismo lipídico de las células senescentes presentó diferencias entre los modelos de senescencia. Aunque se inhibe la síntesis lipídica en los tres modelos de senescencia, los mecanismos que sostienen la inhibición son diferentes en los distintos modelos. La inhibición de la síntesis lipídica en la senescencia inducida por el oncogén RAS está promovida principalmente por la activación de la AMPK y fosforilación de la ACC1, y es permanente. Mientras que en los modelos de senescencia por daño al ADN la inhibición es transitoria y se acompaña del descenso de la expresión y los niveles de la enzima ACC1. En relación al catabolismo de ácidos grasos se observó que los fibroblastos senescentes por daño al ADN utilizan menos a la β -oxidación que los fibroblastos control mientras que los fibroblastos senescentes por expresión del oncogén RAS presentan mayor actividad de la vía que sus respectivos controles evidenciando una regulación recíproca entre la síntesis lipídica y la β -oxidación, que puede estar mediada por AMPK. Se observó que los niveles de RAS también regulan los niveles de enzimas clave en la síntesis lipídica como son AMPK y ACC1. Con respecto al estudio de la función mitocondrial no se encontraron grandes cambios en los modelos de senescencia por daño al ADN, sin embargo, las células senescentes portadores de RAS^{G12V} presentaron un aumento en el metabolismo oxidativo mitocondrial que es dependiente de los niveles de RAS. La inhibición de NF- κ B disminuye la secreción de factores proteicos e impacta negativamente en el consumo de oxígeno basal en el modelo de

senescencia por expresión del oncogén RAS. Los cambios observados en los niveles de p65, la secreción de IL-8 y el consumo de oxígeno basal se revierten cuando los niveles de RAS^{G12V} disminuyen en las células senescentes.

El análisis del metabolismo mitocondrial indica que está favorecida la exportación de acil-CoA desde la mitocondria hacia el citosol en las células senescentes por expresión de RAS. Por otra parte, estas células cambian su perfil de acetilación en la fracción mitocondrial y presentan mayor acetilación en las fracciones citosólicas y nuclear. También se observaron altos niveles de SIRT6 y de su ARNm pero se necesitan más estudios para comprender el rol que cumple esta sirtuina en las células senescentes y así como la acetilación de proteínas.

Parte de los resultados obtenidos y reflexiones realizadas en el transcurso del posgrado fueron publicados en revistas arbitradas:

- Marmisolle I, Martínez J, Liu J, Mastrogiovanni M, Fergusson MM, Rovira II, Castro L, Trostchansky A, Moreno M, Cao L, Finkel T, Quijano C. Reciprocal regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 and senescence in human fibroblasts involves oxidant mediated p38 MAPK activation. (2017) Arch Biochem Biophys 613:12-22. doi: 10.1016/j.abb.2016.10.016.

- Martínez J, Marmisolle I, Tarallo D, Quijano C. Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics in Secretion Processes. Front Endocrinol (Lausanne) (2020) 11:319. doi: 10.3389/fendo.2020.00319.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* [Internet]. 1965/03/01. 1965;37:614–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14315085>
2. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* [Internet]. 2003/11/11. 2003;426(6963):194–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608368>
3. Chen QM, Tu VC, Liu J. Measurements of hydrogen peroxide induced premature senescence: senescence-associated beta-galactosidase and DNA synthesis index in human diploid fibroblasts with down-regulated p53 or Rb. *Biogerontology* [Internet]. 2001/11/16. 2000;1(4):335–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11708215>
4. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati JB, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2000;28(3):361–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10699747
5. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593–602.
6. Sliwiska MA, Mosieniak G, Wolanin K, Babik A, Piwocka K, Magalska A, et al. Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2008/06/10. 2009;130(1–2):24–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18538372>
7. Toso A, Catapano C V, Correspondence AA. Enhancing Chemotherapy Efficacy in Pten-Deficient Prostate Tumors by Activating the Senescence-Associated Antitumor Immunity. *Cell Rep* [Internet]. 2014 [cited 2021 May 30];9:75–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.044>
8. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995/09/26. 1995;92(20):9363–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7568133>
9. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011;192(4):547–56.
10. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* [Internet]. 2008/12/05. 2008;6(12):2853–68. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053174>

11. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* [Internet]. 2006/08/02. 2006;281(40):29568–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880208>
12. Davaapil H, Brockes JP, Yun MH. Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Dev*. 2017 Jan 1;144(1):106–14.
13. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013;155(5):1104–18.
14. Ciccía A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* [Internet]. 2010/10/23. 2010;40(2):179–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965415>
15. Blackford AN, Jackson SP. Molecular Cell Review ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>
16. Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* [Internet]. 2007/12/18. 2007;28(5):739–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18082599>
17. Buscemi G, Perego P, Carenini N, Nakanishi M, Chessa L, Chen J, et al. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene* [Internet]. 2004/09/14. 2004;23(46):7691–700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361830>
18. Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2003/02/25. 2003;5(3):255–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12598907>
19. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 Regulation. *Cell*. 2009 May 15;137(4):609–22.
20. Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage [Internet]. 1999. Available from: www.pnas.org
21. Maya R, Balass M, Kim S-T, Shkedy D, Leal J-FM, Shifman O, et al. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* [Internet]. 2001 May 1 [cited 2021 Aug 5];15(9):1067–77. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/15/9/1067.full>
22. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001 2015 [Internet]. 2001 Apr 5 [cited 2021 Aug 5];20(15):1803–15. Available from: <https://www.nature.com/articles/1204252>
23. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, et al. Inhibition of cyclin-dependent

- kinases by p21. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1995 [cited 2021 Aug 5];6(4):387. Available from: [/pmc/articles/PMC301199/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC301199/?report=abstract)
24. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2007/08/02. 2007;8(9):729–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667954>
 25. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2008/06/25. 2008;8(7):512–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18574463>
 26. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* [Internet]. 2007;130(2):223–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17662938
 27. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* [Internet]. 1993;366(6456):704–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/366704a0>
 28. Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2006;7(9):667–77. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrm1987>
 29. Martin N, Raguz S, Dharmalingam G, Gil J. Cell Cycle Co-regulation of senescence-associated genes by oncogenic homeobox proteins and polycomb repressive complexes. *Cell Cycle* [Internet]. 2013;12:2194–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20><http://dx.doi.org/10.4161/cc.25331>
 30. Maintenance of Nucleolar Homeostasis by CBX4 Alleviates Senescence and Osteoarthritis | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cited 2021 Aug 10]. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2211124719302748?token=C9BE55FD81F9D08491375131B9885841351E6E24B8E6FBD86013D61032F45D0608E50216464BE1C98B5E604A6D552A58&originRegion=us-east-1&originCreation=20210810225438>
 31. Sapkota GP, Deak M, Kieloch A, Morrice N, Goodarzi AA, Smythe C, et al. Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem J* [Internet]. 2002/09/18. 2002;368(Pt 2):507–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12234250>
 32. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010/02/18.

- 2010;107(9):4153–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20160076>
33. Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, Qi H. Etoposide Induces ATM-Dependent Mitochondrial Biogenesis through AMPK Activation. *PLoS One* [Internet]. 2008 Apr 23 [cited 2022 Jun 17];3(4). Available from: [/pmc/articles/PMC2329593/](http://pmc/articles/PMC2329593/)
 34. Sun Y, Connors KE, Yang DQ. AICAR induces phosphorylation of AMPK in an ATM-dependent, LKB1-independent manner. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2007 Dec 5 [cited 2022 Jun 17];306(1–2):239–45. Available from: <https://link-springer-com.proxy.timbo.org.uy/article/10.1007/s11010-007-9575-6>
 35. Alexander A, Kim J, Walker CL. ATM engages the TSC2/mTORC1 signaling node to regulate autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2010/06/29. 2010;6(5):672–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581436>
 36. Alexander A, Walker CL. Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. *Cell Cycle* [Internet]. 2010/10/05. 2010;9(18):3685–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890104>
 37. Coppe JP, Boisen M, Sun CH, Wong BJ, Kang MK, Park NH, et al. A role for fibroblasts in mediating the effects of tobacco-induced epithelial cell growth and invasion. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2008/07/23. 2008;6(7):1085–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644973>
 38. Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* [Internet]. 2007/04/06. 2007;67(7):3117–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409418>
 39. Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro M V, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* [Internet]. 2008/06/17. 2008;133(6):1006–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555777>
 40. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* [Internet]. 2008 Jun 13 [cited 2014 Jan 21];133(6):1019–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555778>
 41. Lecot P, Alimirah F, Desprez P-Y, Campisi J, Wiley C. Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer*. 2016;
 42. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):978–90.
 43. Di Mitri D, Alimonti A. Non-cell-autonomous regulation of cellular senescence in cancer. *Trends Cell Biol*. 2016;26(3):215–26.

44. Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS. The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Jan 15 [cited 2021 Aug 24];66(2):794–802. Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/66/2/794>
45. Yang G, Rosen DG, Zhang Z, Bast RC, Jr., Mills GB, et al. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Oct 31 [cited 2021 Aug 24];103(44):16472. Available from: </pmc/articles/PMC1637606/>
46. Mario Gonzalez-Meljem J, Apps JR, Fraser HC, Pedro Martinez-Barbera J. Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumourigenesis. *Br J Cancer* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0066-1>
47. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016;530(7589):184–9.
48. Hernandez-Segura A, de Jong T V., Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol*. 2017 Sep 11;27(17):2652–2660.e4.
49. Hoare M, Ito Y, Kang TW, Weekes MP, Matheson NJ, Patten DA, et al. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 May 6];18(9):979. Available from: </pmc/articles/PMC5008465/>
50. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 2014 Dec 22;31(6):722–33.
51. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* [Internet]. 2011/10/08. 2011;25(20):2125–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21979375>
52. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kB Family of Transcription Factors and Its Regulation. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/>
53. Chen LF, Williams SA, Mu Y, Nakano H, Duerr JM, Buckbinder L, et al. NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2005/09/02. 2005;25(18):7966–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135789>
54. Iwai K, Fujita H, Sasaki Y. Linear ubiquitin chains: NF-[kappa] B signalling, cell death and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):503–8.

55. Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, Luscher B, Hottiger MO. SIRT2 regulates NF-kappaB dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci* [Internet]. 2010/11/18. 2010;123(Pt 24):4251–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21081649>
56. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* [Internet]. 2011/03/15. 2011;30(8):1536–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21399611>
57. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009/07/15. 2009;11(8):973–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19597488>
58. Zhao J, Zhang L, Lu A, Han Y, Colangelo D, Bukata C, et al. ATM is a key driver of NF-κB-dependent DNA-damage-induced senescence, stem cell dysfunction and aging. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2020 Mar 31 [cited 2021 Aug 24];12(6):4688. Available from: </pmc/articles/PMC7138542/>
59. Veuger SJ, Durkacz BW. Persistence of unrepaired DNA double strand breaks caused by inhibition of ATM does not lead to radio-sensitisation in the absence of NF-κB activation. *DNA Repair (Amst)*. 2011 Feb 7;10(2):235–44.
60. Mccool KW, Miyamoto S. DNA damage-dependent NF-κB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *John Wiley Sons A/S Immunol Rev* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 26];246. Available from: www.immunologicalreviews.com
61. Fang L, Choudhary S, Zhao Y, Edeh CB, Yang C, Boldogh I, et al. ATM regulates NF-κB-dependent immediate-early genes via RelA Ser 276 phosphorylation coupled to CDK9 promoter recruitment. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jul 29 [cited 2021 Aug 26];42(13):8416. Available from: </pmc/articles/PMC4117761/>
62. Kang C, Xu Q, Martin TD, Li MZ, Demaria M, Aron L, et al. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
63. Andersen P, Uosaki H, Shenje LT, Kwon C. Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. Vol. 22, *Trends in Cell Biology*. 2012. p. 257–65.
64. Laberge R-M, Sun Y, Orjalo A V., Patil CK, Freund A, Zhou L, et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2015 Aug 6 [cited 2021 Aug 10];17(8):1049. Available from: </pmc/articles/PMC4691706/>
65. Herranz N, Gallage S, Mellone M, Wuestefeld T, Klotz S, Hanley CJ, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol* [Internet].

- 2015/08/19. 2015;17(9):1205–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280535>
66. David L. Nelson Michael M. Cox. Lehninger. Principios de bioquímica. In: 5th ed. Freeman, W. H.; 2009. p. 485–527.
 67. Agostoni C, Bruzzese MG. Fatty acids: their biochemical and functional classification. *La Pediatr Medica e Chir Med Surg Pediatr*. 1991;14(5):473–9.
 68. Rittenberg D, Bloch K. The utilization of acetic acid for the synthesis of fatty acids. *J Biol Chem*. 1945;160:417–24.
 69. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase 2 molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem*. 1997;272(16):10669–77.
 70. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. Portland Press Limited; 2006.
 71. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(4):1444–9.
 72. Wong AKF, Howie J, Petrie JR, Lang CC. AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2009 Apr [cited 2014 Feb 2];116(8):607–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2762688&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 73. McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* [Internet]. 1983 Jul 15 [cited 2021 Nov 16];214(1):21–8. Available from: [/biochemj/article/214/1/21/15333/Observations-on-the-affinity-for-carnitine-and](http://biochemj/article/214/1/21/15333/Observations-on-the-affinity-for-carnitine-and)
 74. Brink J, Ludtke SJ, Yang C-Y, Gu Z-W, Wakil SJ, Chiu W, et al. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy [Internet]. Vol. 99, PNAS. 2002. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.012589499
 75. Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry WH Freeman. New York. 2008;75–189.
 76. Mayr JA, Feichtinger RG, Tort F, Ribes A, Sperl W. Lipoic acid biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis* 2014 374 [Internet]. 2014 Apr 29 [cited 2021 Nov 16];37(4):553–63. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10545-014-9705-8>

77. Ha J, Daniel S, Broyles SS, Kim KH. Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J Biol Chem*. 1994 Sep 2;269(35):22162–8.
78. Ray H, Suau F, Vincent A, Dalla Venezia N. Cell cycle regulation of the BRCA1/acetyl-CoA-carboxylase complex. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009;378(3):615–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X08022985>
79. Hunkeler M, Hagmann A, Stutfeld E, Chami M, Guri Y, Stahlberg H, et al. Structural basis for regulation of human acetyl-CoA carboxylase. *Nature* [Internet]. 2018;558(7710):470–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0201-4>
80. Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunil T, Chen Z, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med* [Internet]. 2013 Dec [cited 2021 Jul 15];19(12):1649. Available from: </pmc/articles/PMC4965268/>
81. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125–31.
82. Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S, Achouri Y, Carré D, Girard J, et al. Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c Expression and Action in Rat Muscles Insulin-Like Effects on the Control of Glycolytic and Lipogenic Enzymes and UCP3 Gene Expression.
83. Shin HS, Lee Y, Shin MH, Cho SI, Zouboulis CC, Kim MK, et al. Histone Deacetylase 1 Reduces Lipogenesis by Suppressing SREBP1 Transcription in Human Sebocyte Cell Line SZ95. *Int J Mol Sci Artic J Mol Sci*. 2021;22:4477.
84. Ponugoti B, Kim D-H, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Oct 29 [cited 2021 Aug 31];285(44):33959–70. Available from: </pmc/articles/PMC2962496/>
85. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al. AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-induced Insulin Resistant Mice. *Cell Metab* [Internet]. 2011 Apr 6 [cited 2022 May 6];13(4):376. Available from: </pmc/articles/PMC3086578/>
86. Giandomenico V, Simonsson M, Grönroos E, Ericsson J. Coactivator-Dependent Acetylation Stabilizes Members of the SREBP Family of Transcription Factors. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2003;23(7):2587–99. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
87. Sundqvist A, Ericsson J. Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors [Internet]. 2003. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2335135100

88. Dong Q, Giorgianni F, Beranova-Giorgianni S, Deng X, O'meally RN, Bridges D, et al. Cite this article as. *Biosci Rep* [Internet]. 2016;284. Available from: <http://www.phosphosite.org>
89. Watkins PA. Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *J Biol Chem* [Internet]. 2007/11/21. 2008;283(4):1773–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024425>
90. Gargiulo CE, Stuhlsatz-Krouper SM, Schaffer JE. Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J Lipid Res* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2021 Sep 2];40(5):881–92. Available from: <http://www.jlr.org/article/S002227520321234/fulltext>
91. Mashek DG, Bornfeldt KE, Coleman RA, Berger J, Bernlohr DA, Black P, et al. Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J Lipid Res* [Internet]. 2004/08/05. 2004;45(10):1958–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292367>
92. SHINDO Y, HASHIMOTO T. Acyl-Coenzyme A Synthetase and Fatty Acid Oxidation in Rat Liver Peroxisomes. *J Biochem* [Internet]. 1978 Nov 1 [cited 2021 Sep 7];84(5):1177–81. Available from: <https://academic.oup.com/jb/article/84/5/1177/2186134>
93. Spurway TD, Sherratt HA, Pogson CI, Agius L. The flux control coefficient of carnitine palmitoyltransferase I on palmitate beta-oxidation in rat hepatocyte cultures. *Biochem J* [Internet]. 1997/04/01. 1997;323 (Pt 1):119–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9173869>
94. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system—from concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997;244(1):1–14.
95. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflügers Arch*. 2004;447(5):689–709.
96. Wanders RJ, Ruiten JP, L IJL, Waterham HR, Houten SM. The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2010/05/22. 2010;33(5):479–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490924>
97. Ghisla S, Thorpe C. Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur J Biochem* [Internet]. 2004 Feb [cited 2014 Feb 2];271(3):494–508. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1033.2003.03946.x>
98. Crane FL, Beinert H. On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of coenzyme A. II. The electron-transferring flavoprotein. *J Biol Chem* [Internet]. 1956;218(2):717–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13295225

99. Hiltunen JK, Qin Y. beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2000/04/13. 2000;1484(2–3):117–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760462>
100. Boomgaarden I, Christina AE, Ae V, Klapper M, Döring AF. Comparative Analyses of Disease Risk Genes Belonging to the Acyl-CoA Synthetase Medium-Chain (ACSM) Family in Human Liver and Cell Lines.
101. Van Der Sluis R. Analyses of the genetic diversity and protein expression variation of the acyl: CoA medium-chain ligases, ACSM2A and ACSM2B. *Mol Genet Genomics* [Internet]. [cited 2021 Sep 4];0. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1460-3>
102. Jackson S, Schaefer J, Middleton B, Turnbull DM. Characterization of a Novel Enzyme of Human Fatty Acid β -Oxidation: A Matrix-Associated, Mitochondrial 2-Enoyl-CoA Hydratase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Sep 5;214(1):247–53.
103. Sharpe AJ, McKenzie M. Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders Associated with Short-Chain Enoyl-CoA Hydratase (ECHS1) Deficiency. *Cells* [Internet]. 2018 May 23 [cited 2021 Sep 7];7(6):46. Available from: [/pmc/articles/PMC6025059/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6025059/)
104. Haapalainen AM, Meriläinen G, Pirilä PL, Kondo N, Fukao T, Wierenga RK. Crystallographic and Kinetic Studies of Human Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase: The Importance of Potassium and Chloride Ions for Its Structure and Function †, ‡. 2007;
105. Wanders RJ, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2006;75:295–332. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16756494
106. Kim J-JP, Miura R. Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. *Eur J Biochem* [Internet]. 2004 Feb [cited 2014 Feb 2];271(3):483–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1033.2003.03948.x>
107. Cook GA, Gamble MS. Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent K_i values for malonyl-CoA. *J Biol Chem*. 1987;262(5):2050–5.
108. Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2011/11/09. 2012;52(1):59–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064361>
109. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017 192 [Internet]. 2017 Oct 4 [cited 2021 Nov 17];19(2):121–35. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.95>

110. Eaton S, Bursby T, Middleton B, Pourfarzam M, Mills K, Johnson AW, et al. The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2000/05/18. 2000;28(2):177–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816122>
111. MD H, T S, E G, E J, B S, DB L, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* [Internet]. 2010 [cited 2021 Sep 14];464(7285):121–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20203611/>
112. Bahari A, Aarabi M, Hedayati M, Jarollahi A, Firouzi F, Aghazadeh R, et al. Target antigens for perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in Iranian patients with ulcerative colitis. *Middle East J Dig Dis* [Internet]. 2014/10/29. 2014;6(4):203–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349683>
113. Bharathi SS, Zhang Y, Mohsen AW, Uppala R, Balasubramani M, Schreiber E, et al. Sirtuin 3 (SIRT3) protein regulates long-chain acyl-CoA dehydrogenase by deacetylating conserved lysines near the active site. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Nov 22 [cited 2021 Nov 24];288(47):33837–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24121500/>
114. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics [Internet]. Vol. 95, *Circulation Research*. 2004. p. 568–78. Available from: <http://www.circresaha.org>
115. Desvergne A, Michalik L, Wahli W. Transcriptional Regulation of Metabolism. 2006;465–514.
116. Mandard S, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor a a target genes. *C Cell Mol Life Sci*. 2004;61:393–416.
117. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000;20(5):1868–76. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
118. Hirotsu Y, Hataya N, Katsuoka F, Yamamoto M. NF-E2-Related Factor 1 (Nrf1) Serves as a Novel Regulator of Hepatic Lipid Metabolism through Regulation of the Lipin1 and PGC-1 Genes. 2012; Available from: www.broadinstitute.org/gsea
119. Scarpulla1 RC. Nuclear Control of Respiratory Chain Expression in Mammalian Cells. Vol. 29, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1997.
120. Liang H, Ward WF. Staying Current PGC-1: a key regulator of energy metabolism.
121. Bastie CC, Nahlé Z, McLoughlin T, Esser K, Zhang W, Unterman T, et al. FoxO1 stimulates fatty acid uptake and oxidation in muscle cells through CD36-dependent and -independent mechanisms. *J Biol*

- Chem. 2005 Apr;280(14):14222–9.
122. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005 Jun;1(6):361–70.
 123. Jä S, Handschin C, St.-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 [Internet]. 2007. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0705070104
 124. Jensen TE, Wojtaszewski JFP, Richter EA. AMP-activated protein kinase in contraction regulation of skeletal muscle metabolism: necessary and/or sufficient? *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 May;196(1):155–74.
 125. Bottai D, Bang S, Lindholm D, Zhao Y, Zhou Y, Wang S, et al. SIRT1/PGC-1 α Signaling Promotes Mitochondrial Functional Recovery and Reduces Apoptosis after Intracerebral Hemorrhage in Rats. 2018; Available from: www.frontiersin.org
 126. Panes JD, Godoy PA, Silva-Grecchi T, Celis MT, Ramirez-Molina O, Gavilan J, et al. Changes in PGC-1 α /SIRT1 Signaling Impact on Mitochondrial Homeostasis in Amyloid-Beta Peptide Toxicity Model. Available from: www.frontiersin.org
 127. Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009 Apr;20(2):98–105.
 128. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012 Mar;148(6):1145–59.
 129. Harner M, Körner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, et al. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J*. 2011 Oct;30(21):4356–70.
 130. Martínez J, Marmisol I, Tarallo D, Quijano C. Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics in Secretion Processes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 May 22;11:319.
 131. Puchalska P, Crawford PA. Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell Metab* [Internet]. 2017 Feb 7 [cited 2021 Sep 14];25(2):262. Available from: [/pmc/articles/PMC5313038/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3513038/)
 132. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 2018 Jul;20(7):745–54.
 133. Bulutoglu B, Garcia KE, Wu F, Minter SD, Banta S. Direct Evidence for Metabolon Formation and Substrate Channeling in Recombinant TCA Cycle Enzymes. *ACS Chem Biol* [Internet]. 2016 Oct 21 [cited 2021 Sep 10];11(10):2847–53. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acschembio.6b00523>

134. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
135. Quinlan CL, Perevoshchikova I V., Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Nov 25];1(1):304. Available from: </pmc/articles/PMC3757699/>
136. Nesci S, Trombetti F, Pagliarani A, Ventrella V, Algieri C, Tioli G, et al. Molecular and Supramolecular Structure of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System: Implications for Pathology. *Life* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Nov 25];11(3). Available from: </pmc/articles/PMC7999509/>
137. Futai M, Nakanishi-Matsui M, Okamoto H, Sekiya M, Nakamoto RK. Rotational catalysis in proton pumping ATPases: From E. coli F-ATPase to mammalian V-ATPase. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2012 Oct 1;1817(10):1711–21.
138. Rieger B, Junge W, Busch KB. Lateral pH gradient between OXPHOS complex IV and F₀F₁ ATP-synthase in folded mitochondrial membranes. *Nat Commun* 2014 51 [Internet]. 2014 Jan 29 [cited 2021 Nov 25];5(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms4103>
139. Wiedemann N, Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352> [Internet]. 2017 Jun 27 [cited 2021 Nov 30];86:685–714. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-060815-014352>
140. DG H, FA R, SA H. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 Sep 7];13(4):251–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22436748/>
141. Hardie DG. AMPK: A Target for Drugs and Natural Products With Effects on Both Diabetes and Cancer. *Diabetes* [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Jul 15];62(7):2164. Available from: </pmc/articles/PMC3712072/>
142. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol Cell* [Internet]. 2017 Jun 15 [cited 2021 Sep 7];66(6):789. Available from: </pmc/articles/PMC5553560/>
143. SA H, J B, JL R, KJ M, L U, TP M, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* [Internet]. 2003 [cited 2021 Sep 8];2(4):28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14511394/>
144. SA H, DA P, KJ M, L R, J B, AM E, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an

- alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* [Internet]. 2005 Jul [cited 2021 Sep 8];2(1):9–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054095/>
145. Jäger S, Handschin C, St.-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007 Jul 17 [cited 2021 Jul 15];104(29):12017–22. Available from: <https://www.pnas.org/content/104/29/12017>
 146. Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, Lewis TL, Losón OC, Hellberg K, et al. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Jan 15 [cited 2021 Jul 15];351(6270):275–81. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/351/6270/275>
 147. T K, K O, H Y, T K, K U. Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Feb 8 [cited 2021 Jul 15];277(6):3829–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11724780/>
 148. Hong YH, Varanasi US, Yang W, Leff T. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 α transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem*. 2003 Jul;278(30):27495–501.
 149. AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1 | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cited 2021 Jul 15]. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1097276513000993?token=2E650A9B8A9EEDBD4D0DA08B3725044F128F7F0937E75EEDD68BFE04D3493AE0CA58B0907111DDC2565FCE949FFCF043&originRegion=us-east-1&originCreation=20210715224728>
 150. Li Y, Chen Y. AMPK and autophagy. *Autophagy Biol Dis*. 2019;85–108.
 151. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Mol Cell*. 2005 Apr 29;18(3):283–93.
 152. Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* [Internet]. 2016 [cited 2022 Nov 23];48. Available from: www.nature.com/emm
 153. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2016 Oct 1;1864(10):1372–401.
 154. Wagner GR, Payne RM. Widespread and enzyme-independent Nepsilon-acetylation and Nepsilon-succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* [Internet]. 2013/08/16. 2013;288(40):29036–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23946487>
 155. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, et al. Lysine acetylation targets

- protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* (80-). 2009;325(5942):834–40.
156. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell*. 2001;107(2):137–48.
 157. Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, et al. Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras–MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene*. 2006;25(2):176–85.
 158. Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Takimoto K, Maruyama M, Maruyama W, et al. SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116480.
 159. Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng H-L, Alt FW, et al. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* [Internet]. 2006 May 15 [cited 2021 Sep 9];20(10):1256. Available from: </pmc/articles/PMC1472900/>
 160. Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Yamada H, Kishimoto I, Yamaguchi S, et al. SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene* 2007 267 [Internet]. 2006 Aug 14 [cited 2021 Sep 9];26(7):945–57. Available from: <https://www.nature.com/articles/1209857>
 161. Gomes P, Fleming Outeiro T, Cavadas C. Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Nov 1;36(11):756–68.
 162. Lin R, Tao R, Gao X, Li T, Zhou X, Guan KL, et al. Acetylation Stabilizes ATP-Citrate Lyase to Promote Lipid Biosynthesis and Tumor Growth. *Mol Cell* [Internet]. 2013 Aug 22 [cited 2021 Nov 25];51(4):506. Available from: </pmc/articles/PMC4180208/>
 163. Xu SN, Wang TS, Li X, Wang YP. SIRT2 activates G6PD to enhance NADPH production and promote leukaemia cell proliferation. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Sep 2 [cited 2021 Nov 25];6. Available from: </pmc/articles/PMC5009355/>
 164. Giralt A, Villarroya F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J*. 2012;444(1):1–10.
 165. Ahn B-H, Kim H-S, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(38):14447–52.
 166. Cimen H, Han M-J, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry*. 2009;49(2):304–11.
 167. Finley LWS, Haas W, Desquiret-Dumas V, Wallace DC, Procaccio V, Gygi SP, et al. Succinate

- Dehydrogenase Is a Direct Target of Sirtuin 3 Deacetylase Activity. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 21];6(8):e23295. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0023295>
168. Yu W, Dittenhafer-Reed KE, Denu JM. SIRT3 Protein Deacetylates Isocitrate Dehydrogenase 2 (IDH2) and Regulates Mitochondrial Redox Status. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Apr 4 [cited 2022 Jul 21];287(17):14078. Available from: [/pmc/articles/PMC3340192/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22411112/)
 169. Lombard DB, Alt FW, Cheng H-L, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, et al. Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2007 Dec 15 [cited 2022 Jul 21];27(24):8807–14. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
 170. Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2 [Internet]. 2006. Available from: <https://www.pnas.org>
 171. Hallows WC, Lee S, Denu JM. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases [Internet]. 2006. Available from: <https://www.pnas.org>
 172. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*. 2010;12(6):662–7.
 173. Thapa D, Wu K, Stoner MW, Xie B, Zhang M, Manning JR, et al. The protein acetylase GCN5L1 modulates hepatic fatty acid oxidation activity via acetylation of the mitochondrial β -oxidation enzyme HADHA. *J Biol Chem*. 2018 Nov;293(46):17676–84.
 174. Zhang Y, Zhou F, Bai M, Liu Y, Zhang L, Zhu Q, et al. The pivotal role of protein acetylation in linking glucose and fatty acid metabolism to β -cell function. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 1;10(2).
 175. MC H, R M, KM H, K F, DC C, AJ M, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* [Internet]. 2006 Sep 8 [cited 2021 Sep 9];126(5):941–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16959573/>
 176. Csibi A, Fendt S-M, Li C, Poulogiannis G, Choo AY, Chapski DJ, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* [Internet]. 2013 May 9 [cited 2021 Sep 9];153(4):840. Available from: [/pmc/articles/PMC3684628/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2364628/)
 177. Y T, C H, Y H, L H, H W, Z Z, et al. SIRT4 Suppresses Inflammatory Responses in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Cardiovasc Toxicol* [Internet]. 2015 Oct 21 [cited 2021 Sep 9];15(3):217–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25331589/>
 178. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, et al. Sirtuin 4 is a

- lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. *Cell* [Internet]. 2014 Dec 18 [cited 2021 Sep 9];159(7):1615. Available from: [/pmc/articles/PMC4344121/](#)
179. Rardin MJ, He W, Nishida Y, Newman JC, Carrico C, Danielson SR, et al. SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab* [Internet]. 2013 Dec 3 [cited 2021 Sep 9];18(6):920. Available from: [/pmc/articles/PMC4105152/](#)
180. Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, et al. Sirt5 Is an NAD-Dependent Protein Lysine Demalonylase and Desuccinylase. *Science* [Internet]. 2011 Nov 11 [cited 2021 Sep 9];334(6057):806. Available from: [/pmc/articles/PMC3217313/](#)
181. Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF- κ B-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*. 2009;136(1):62–74.
182. Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. The Histone Deacetylase SIRT6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 α . *Cell* [Internet]. 2010 Jan 22 [cited 2021 Sep 9];140(2):280. Available from: [/pmc/articles/PMC2821045/](#)
183. Jiang H, Khan S, Wang Y, Charron G, He B, Sebastian C, et al. SIRT6 regulates TNF-[agr] secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature*. 2013;496(7443):110–3.
184. Feldman JL, Baeza J, Denu JM. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by Mammalian Sirtuins. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Oct 25 [cited 2021 Nov 30];288(43):31350–6. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820487356/fulltext>
185. Kim H-S, Xiao C, Wang R-H, Lahusen T, Xu X, Vassilopoulos A, et al. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell Metab*. 2010 Sep;12(3):224–36.
186. Cui X, Yao L, Yang X, Gao Y, Fang F, Zhang J, et al. SIRT6 regulates metabolic homeostasis in skeletal muscle through activation of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2017 Oct 9 [cited 2021 Nov 24];313(4):E493–505. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpendo.00122.2017>
187. Vazquez BN, Thackray JK, Serrano L. Sirtuins and DNA damage repair: SIRT7 comes to play. *Nucleus* [Internet]. 2017 Jan 19 [cited 2021 Sep 9];8(2):107. Available from: [/pmc/articles/PMC5403131/](#)
188. Chen S, Blank MF, Iyer A, Huang B, Wang L, Grummt I, et al. SIRT7-dependent deacetylation of the U3-55k protein controls pre-rRNA processing. *Nat Commun* 2016 71 [Internet]. 2016 Feb 12 [cited 2021 Sep 9];7(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms10734>
189. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, et al. Mitochondrial dysfunction accounts

for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* [Internet]. 2007 May [cited 2014 Jan 31];5(5):e110. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1858712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

190. Correia-Melo C, Marques FD, Anderson R, Hewitt G, Hewitt R, Cole J, et al. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J* [Internet]. 2016/02/06. 2016;35(7):724–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26848154>
191. Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschênes-Simard X, Ferbeyre G. Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2022 Jun 23];29(16):4495–507. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
192. Lee a C, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Mar 19;274(12):7936–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075689>
193. Hutter E, Renner K, Pfister G, Stockl P, Jansen-Durr P, Gnaiger E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J* [Internet]. 2004/03/17. 2004;380(Pt 3):919–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15018610>
194. Martinez J, Tarallo D, Martinez-Palma L, Victoria S, Bresque M, Rodriguez-Bottero S, et al. Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *Biochem J* [Internet]. 2019/08/23. 2019;476(17):2463–86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6735661/>
195. Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraquech M, Prenois F, Courtin F, Caillou B, et al. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* [Internet]. 2011/08/16. 2012;31(9):1117–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21841825>
196. Borodkina A, Shatrova A, Abushik P, Nikolsky N, Burova E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2014/06/18. 2014;6(6):481–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934860>
197. Sakai Y, Yamamori T, Yoshikawa Y, Bo T, Suzuki M, Yamamoto K, et al. NADPH oxidase 4 mediates ROS production in radiation-induced senescent cells and promotes migration of inflammatory cells. *Free Radic Res* [Internet]. 2017/12/13. 2018;52(1):92–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29228832>
198. Zwerschke W, Mazurek S, Stöckl P, Hütter E, Eigenbrodt E, Jansen-Dürr P. Metabolic analysis of

- senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J* [Internet]. 2003 Dec 1;376(Pt 2):403–11. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1223775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
199. Takebayashi S, Tanaka H, Hino S, Nakatsu Y, Igata T, Sakamoto A, et al. Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. *Aging Cell* [Internet]. 2015/05/27. 2015;14(4):689–97. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26009982>
 200. Dorr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Dabritz JH, et al. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* [Internet]. 2013/08/16. 2013;501(7467):421–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945590>
 201. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, et al. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* [Internet]. 2013/05/21. 2013;498(7452):109–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685455>
 202. Li M, Durbin KR, Sweet SM, Tipton JD, Zheng Y, Kelleher NL. Oncogene-induced cellular senescence elicits an anti-Warburg effect. *Proteomics* [Internet]. 2013/06/26. 2013;13(17):2585–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23798001>
 203. Quijano C, Cao L, Fergusson MM, Romero H, Liu J, Gutkind S, et al. Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. *Cell Cycle* [Internet]. 2012 Apr 1;11(7):1383–92. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3350879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 204. Nacarelli T, Zhang R. NAD(+) metabolism controls inflammation during senescence. *Mol Cell Oncol* [Internet]. 2019/06/19. 2019;6(4):1605819. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31211232>
 205. Liao EC, Hsu YT, Chuah QY, Lee YJ, Hu JY, Huang T-C, et al. Radiation induces senescence and a bystander effect through metabolic alterations. *Cell Death Dis.* 2014;5(5):e1255.
 206. Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, Verdin E. NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Sep 15];22(2):119. Available from: [/pmc/articles/PMC7963035/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31140365/)
 207. AR M, JW L. Interacting NAD⁺ and Cell Senescence Pathways Complicate Antiaging Therapies. *Rejuvenation Res* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2021 Sep 15];22(3):261–6. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31140365/>

208. Aird KM, Zhang G, Li H, Tu Z, Bitler BG, Garipov A, et al. Suppression of Nucleotide Metabolism Underlies the Establishment and Maintenance of Oncogene-Induced Senescence. *Cell Rep*. 2013 Apr 25;3(4):1252–65.
209. Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X. Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* [Internet]. 2013/01/22. 2013;493(7434):689–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23334421>
210. Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol*. 2011;13(3):310–6.
211. Wiley CD, Velarde MC, Lecot P, Liu S, Sarnoski EA, Freund A, et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab*. 2016;23(2):303–14.
212. Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(1):3–12.
213. Lee SM, Dho SH, Ju SK, Maeng JS, Kim JY, Kwon KS. Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts. *Biogerontology* [Internet]. 2012/09/14. 2012;13(5):525–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971926>
214. Kang C, Chung E, Diffie G, Ji LL. Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: role of PGC-1 α . *Exp Gerontol*. 2013;48(11):1343–50.
215. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2022 Jul 21];217(1):65–77. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>
216. Amorim JA, Coppotelli G, Rolo AP, Palmeira CM, Ross JM, Sinclair DA. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2022 Jul 21];18(4):243. Available from: </pmc/articles/PMC9059418/>
217. Chen J-H, Stoeber K, Kingsbury S, Ozanne SE, Williams GH, Hales CN. Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Nov 19 [cited 2014 Feb 2];279(47):49439–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377661>
218. Greenwald RA. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. Boca Raton, Fla.: CRC; 1985.
219. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *Rna* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2021 Sep 22];9(4):493–501. Available from: </pmc/articles/PMC1370415/>

220. No Title. p. <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/reso>.
221. L. C. Chosewood, D. E. Wilson E. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, MD, USA; 2009.
222. Reuter JA, Khavari PA. Use of conditionally active ras fusion proteins to study epidermal growth, differentiation, and neoplasia. *Methods Enzym* [Internet]. 2006/06/08. 2006;407:691–702. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757362>
223. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111(1):A3-B.
224. Tanaka R, Tainaka M, Ota T, Mizuguchi N, Kato H, Urabe S, et al. Accurate Determination of S-Phase Fraction in Proliferative Cells by Dual Fluorescence and Peroxidase Immunohistochemistry with 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) and Ki67 Antibodies: <http://dx.doi.org/10.1369/0022155411411090> [Internet]. 2011 May 6 [cited 2021 Jul 27];59(8):791–8. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1369/0022155411411090>
225. Cao L, Xu X, Bunting SF, Liu J, Wang RH, Cao LL, et al. A selective requirement for 53BP1 in the biological response to genomic instability induced by Brca1 deficiency. *Mol Cell* [Internet]. 2009;35(4):534–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19716796
226. Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* [Internet]. 2008(3):519–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21282379
227. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
228. Zhang H, Maguire D, Swarts S, Sun W, Yang S, Wang W, et al. REPLICATION OF MURINE MITOCHONDRIAL DNA FOLLOWING IRRADIATION.
229. Howard V. Acetyl Coenzyme A Synthetase and the Lipid Synthesis from Acetate in Cultured Regulation Cells * of. 1974;(24):7912–21.
230. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* [Internet]. 1959/08/01. 1959;37(8):911–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13671378>

231. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend C a. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Mar 28;97(7):3450–4. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10716717
232. Parker RA, Kariya T, Grisar JM, Petrow V. 5-(Tetradecyloxy)-2-furancarboxylic acid and related hypolipidemic fatty acid-like alkyloxyarylcarboxylic acids. *J Med Chem* [Internet]. 1977 Jun;20(6):781–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/406395>
233. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* [Internet]. 2011/07/06. 2011;435(2):297–312. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726199>
234. Wu JJ, Quijano C, Chen E, Liu H, Cao L, Fergusson MM, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2009 Apr;1(4):425–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2806022&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
235. DA F, A N, C B. Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov Today* [Internet]. 2008 Feb 13 [cited 2021 Sep 22];13(5–6):268–74. Available from: <https://europepmc.org/article/med/18342804>
236. Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes* 2012 51 [Internet]. 2012 Sep 20 [cited 2021 Sep 22];5(1):1–5. Available from: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-5-513>
237. Tórtora V, Quijano C, Freeman B, Radi R, Castro L. Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxynitrite: Mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic Biol Med*. 2007 Apr 1;42(7):1075–88.
238. Kirschner K, Rattanavirotkul N, Quince MF, Chandra T. Functional heterogeneity in senescence. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2022 Sep 2];48(3):765–73. Available from: </biochemsoctrans/article/48/3/765/223813/Functional-heterogeneity-in-senescence>
239. Storz P. Reactive Oxygen Species–Mediated Mitochondria-to-Nucleus Signaling: A Key to Aging and Radical-Caused Diseases. *Sci STKE* [Internet]. 2006 [cited 2022 May 6];2006(332). Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/stke.3322006re3>
240. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress:

Oxidative eustress ☆. 2017 [cited 2022 May 11]; Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>

241. Driessens N, Versteyhe S, Ghaddhab C, Burniat A, De Deken X, Van Sande J, et al. Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr Relat Cancer* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2022 May 11];16(3):845–56. Available from: <https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/16/3/845.xml>
242. Gewirtz DA. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999;57:727–41.
243. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(11):761–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3106>
244. Cagnol S, Chambard J-C. M I N I R E V I E W ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. Available from: <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/>
245. Mukhopadhyay S, Vander Heiden MG, McCormick F. The Metabolic Landscape of RAS-Driven Cancers from biology to therapy. *Nat cancer* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2022 Jul 21];2(3):271. Available from: </pmc/articles/PMC8045781/>
246. Wang P, Han L, Shen H, Wang P, Lv C, Zhao G, et al. Protein kinase D1 is essential for Ras-induced senescence and tumor suppression by regulating senescence-associated inflammation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 May 27 [cited 2021 Aug 24];111(21):7683–8. Available from: <https://www.pnas.org/content/111/21/7683>
247. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2022 Jul 22];21(1):43. Available from: </pmc/articles/PMC1759898/>
248. Huber K, Mestres-Arenas A, Fajas L, Leal-Esteban LC. The multifaceted role of cell cycle regulators in the coordination of growth and metabolism.
249. Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* [Internet]. 2012/03/24. 2012;21(3):297–308. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439925>
250. Moncada S, Higgs EA, Colombo SL. Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation. *Biochem J* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2022 Feb 15];446(1):1–7. Available from: </biochemj/article/446/1/1/46058/Fulfilling-the-metabolic-requirements-for-cell>
251. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev*

- Cancer [Internet]. 2007 Oct [cited 2022 Feb 15];7(10):763–77. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2222>
252. Cam H, Balciunaite E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, Young R, et al. A Common Set of Gene Regulatory Networks Links Metabolism and Growth Inhibition. *Mol Cell*. 2004 Nov 5;16(3):399–411.
253. Jones SA, Valayannopoulos V, Schneider E, Eckert S, Banikazemi M, Bialer M, et al. Rapid progression and mortality of lysosomal acid lipase deficiency presenting in infants. *Genet Med* [Internet]. 2015/08/28. 2015; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26312827>
254. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1756509>.
255. Cheng C, Geng F, Cheng X, Guo D. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Commun (London, England)*. 2018 May 21;38(1):27.
256. Lemons JM, Feng XJ, Bennett BD, Legesse-Miller A, Johnson EL, Raitman I, et al. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biol* [Internet]. 2010/11/05. 2010;8(10):e1000514. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049082>
257. Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, et al. Novel Inhibitors of Cytokine-induced I κ B α Phosphorylation and Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Show Anti-inflammatory Effects in Vivo. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):21096–103.
258. Pougovkina O, Te Brinke H, Ofman R, Van Cruchten AG, Kulik W, Wanders RJA, et al. Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/23/13/3513/660648>
259. Newman JC, He W, Verdin E. Mitochondrial protein acylation and intermediary metabolism: regulation by sirtuins and implications for metabolic disease. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Dec 14 [cited 2014 Jan 25];287(51):42436–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3522244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
260. Purcell M, Kruger A, Tainsky MA. Gene expression profiling of replicative and induced senescence. *Cell Cycle* [Internet]. 2014 Dec 15 [cited 2022 Mar 7];13(24):3927. Available from: [/pmc/articles/PMC4615143/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615143/)
261. Bojko A, Czarnecka-Herok J, Charzynska A, Dabrowski M, Sikora E. Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents. *Cells*. 2019 Nov 23;8(12).
262. Maeda M, Scaglia N, Igal RA. Regulation of fatty acid synthesis and Delta9-desaturation in senescence

- of human fibroblasts. *Life Sci* [Internet]. 2008/12/09. 2009;84(3–4):119–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059270>
263. Marmisolle I, Martinez J, Liu J, Mastrogiovanni M, Fergusson MM, Rovira II, et al. Reciprocal regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 and senescence in human fibroblasts involves oxidant mediated p38 MAPK activation. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2016/12/17. 2017;613:12–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27983949>
264. Zannella VE, Cojocari D, Hilgendorf S, Vellanki RN, Chung S, Wouters BG, et al. AMPK regulates metabolism and survival in response to ionizing radiation. *Radiother Oncol*. 2011 Jun 1;99(3):293–9.
265. Sanli T, Storozhuk Y, Linher-Melville K, Bristow RG, Laderout K, Viollet B, et al. Ionizing radiation regulates the expression of AMP-activated protein kinase (AMPK) in epithelial cancer cells: Modulation of cellular signals regulating cell cycle and survival. *Radiother Oncol*. 2012 Mar 1;102(3):459–65.
266. Suzuki A, Kusakai GI, Kishimoto A, Shimojo Y, Ogura T, Lavin MF, et al. IGF-1 phosphorylates AMPK- α subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 19;324(3):986–92.
267. Hashimoto T, Urushihara Y, Murata Y, Fujishima Y, Hosoi Y. AMPK increases expression of ATM through transcriptional factor Sp1 and induces radioresistance under severe hypoxia in glioblastoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 Jan 29;590:82–8.
268. Fisher KW, Das B, Kim HS, Clymer BK, Gehring D, Smith DR, et al. AMPK Promotes Aberrant PGC1 β Expression To Support Human Colon Tumor Cell Survival. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2015 Nov 15 [cited 2022 Jul 28];35(22):3866–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128>
269. Mauro C, Leow SC, Anso E, Rocha S, Thotakura AK, Tornatore L, et al. NF-kappaB controls energy homeostasis and metabolic adaptation by upregulating mitochondrial respiration. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2011/10/05. 2011;13(10):1272–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968997>
270. Ibarburu S, Kovacs M, Varela V, Rodríguez-Duarte J, Ingold M, Invernizzi P, et al. A Nitroalkene Benzoic Acid Derivative Targets Reactive Microglia and Prolongs Survival in an Inherited Model of ALS via NF- κ B Inhibition. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Apr 27];18(1):309. Available from: </pmc/articles/PMC8116482/>
271. Dapueto R, Rodríguez-Duarte J, Galliussi G, Kamaid A, Bresque M, Batthyány C, et al. A novel nitroalkene vitamin E analogue inhibits the NLRP3 inflammasome and protects against inflammation and glucose intolerance triggered by obesity. *Redox Biol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2022 Apr 27];39:101833. Available from: </pmc/articles/PMC7750735/>

272. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell M-C, Fernández Ruiz A, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. 2019 [cited 2022 Apr 25]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.01.013>
273. Kawashima I, Mitsumori T, Nozaki Y, Yamamoto T, Shobu-Sueki Y, Nakajima K, et al. Negative regulation of the LKB1/AMPK pathway by ERK in human acute myeloid leukemia cells. *Exp Hematol*. 2015 Jul 1;43(7):524-533.e1.
274. Zheng B, Jeong JH, Asara JM, Yuan YY, Granter SR, Chin L, et al. Oncogenic B-RAF Negatively Regulates the Tumor Suppressor LKB1 to Promote Melanoma Cell Proliferation. *Mol Cell* [Internet]. 2009 Jan 30 [cited 2022 May 2];33(2):237. Available from: </pmc/articles/PMC2715556/>
275. Guo JY, White E. Autophagy is required for mitochondrial function, lipid metabolism, growth, and fate of KRASG12D-driven lung tumors. *Autophagy* [Internet]. 2013 [cited 2022 May 2];9(10):1636. Available from: </pmc/articles/PMC5424446/>
276. Bosc C, Broin N, Fanjul M, Saland E, Farge T, Courdy C, et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17882-2>
277. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* [Internet]. 2009/03/13. 2009;23(7):798–803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279323>
278. Adams PD. Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Mol Cell*. 2009 Oct 9;36(1):2–14.
279. Seno K, Tanikawa N, Takahashi H, Ohkuchi A, Suzuki H, Matsubara S, et al. Oxygen concentration modulates cellular senescence and autophagy in human trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol*. 2018 Jun;79(6):e12826.
280. McCord RA, Michishita E, Hong T, Berber E, Boxer LD, Kusumoto R, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent Protein Kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jun 18];1(1):109. Available from: </pmc/articles/PMC2815768/>
281. Michishita E, McCord RA, Boxer LD, Barber MF, Hong T, Gozani O, et al. Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle* [Internet]. 2009 Aug 8 [cited 2022 Jun 18];8(16):2664. Available from: </pmc/articles/PMC4474138/>
282. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006 Jan 27;124(2):315–29.

283. Naiman S, Huynh FK, Gil R, Glick Y, Shahar Y, Touitou N, et al. SIRT6 Promotes Hepatic Beta-Oxidation via Activation of PPAR α . *Cell Rep* [Internet]. 2019 Dec 12 [cited 2022 Jun 18];29(12):4127. Available from: [/pmc/articles/PMC7165364/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/)

ANEXO.

Anticuerpos para Western blot

Blanco	Dilución	Marca
ATM fosforilada (Ser1981)	1:1000	Millipore #05-740
Tubulina- α	1:1000	Millipore #05-829
RAS	1:1000	Cell Signaling Technology # 3339
ATM	1:1000	Cell Signaling Technology #2873
p53-fosforilada (Ser15)	1:1000	Cell Signaling Technology #9284
p21	1:1000	Cell Signaling Technology #2947
GAPDH	1:1000	Cell Signaling Technology #2118
ACC	1:1000	Cell Signaling Technology #3662
ACC fosforilada (Ser79)	1:1000	Cell Signaling Technology #3661
AMPK	1:1000	Cell Signaling Technology #2532
AMPK fosforilada (Thr172)	1:0000	Cell Signaling Technology #2535
ACL	1:1000	Cell Signaling Technology # 4332
ACL fosforilada (Ser455)	1:1000	Cell Signaling Technology #4331
H3	1:1000	Cell Signaling Technology #9671
H3K9	1:1000	Cell Signaling Technology #4499
Lisinas acetiladas, AcK	1:1000	Cell Signaling Technology #9441
SIRT1	1:1000	Cell Signaling Technology #8469
SIRT3	1:1000	Cell Signaling Technology #5490
SIRT6	1:1000	Cell Signaling Technology #12486
IL-6	1:1000	Cell Signaling Technology #12153
p65/RelA	1:1000	Cell Signaling Technology #8242
IKB-fosforilada (Ser32/36)	1:1000	Cell Signaling Technology #9246
Akt	1:1000	Cell Signaling Technology #4691
Akt fosforilada (Ser473)	1:1000	Cell Signaling Technology #4060
ERK1/2	1:1000	Cell Signaling Technology #4695
ERK1/2 fosforilada (Thr202/Tyr204)	1:1000	Cell Signaling Technology #4370
pRb fosforilada (Ser 807/811)	1:1000	Cell Signaling Technology #8516
pRb fosforilada (Ser 807/811)	1:15000	BD Pharmingen #558389
p53	1:1000	BD Pharmingen #55416
p53	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #sc-6243 y #sc-126
p21	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #sc-397
p16	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #468
α -tubulina	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #sc-8035
SDHA	1:1000	Abcam #ab14715
Aco	1:1000	Abcam #ab71440
α -actina	1:1000	Abcam #ab5694