

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias – PEDECIBA Biología

CAMBIOS METABÓLICOS ASOCIADOS A LA SENESCENCIA DEL MELANOMA

Jennyfer Martínez Cazarre

Orientadora: **Dra. Celia Quijano**

Co-Orientadora: **Dra. Caroline Agorio**

Departamento de Bioquímica – Centro de Investigaciones Biomédicas
Facultad de Medicina, Universidad de la República

Montevideo – Uruguay 2020

A mis padres por todo lo que han luchado por mí y mis hermanos

A Rafa por compartir la vida conmigo

Tabla de contenidos

Resumen general	3
Abreviaturas	4
Introducción	5
Hipótesis de trabajo	28
Objetivos generales y específicos	29
Materiales y métodos	30
Resultados	40
I. Inducción de senescencia celular por exposición a TMZ	40
i. Respuesta al daño al ADN y proliferación celular.....	40
ii. Cambios morfológicos y actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia.....	41
iii. Fenotipo secretor asociado a la senescencia.....	43
iv. Modelo murino de melanoma subcutáneo sometido a quimioterapia.....	43
II. Metabolismo energético de las células senescentes	44
i. Catabolismo de la glucosa.....	45
ii. Función mitocondrial.....	46
iii. Niveles de oxidantes.....	50
iv. Inducción de senescencia y función mitocondrial en células de melanoma metastásicas.....	50
v. Exposición a vemurafenib y función mitocondrial en células BRAF V600E.....	52
III. Bases moleculares de los cambios en la función mitocondrial de las células de melanoma senescentes	54
A. Masa y biogénesis mitocondrial	54
i. Masa mitocondrial.....	54
ii. Biogénesis mitocondrial.....	55
B. Proteoma mitocondrial	56

C. Dinámica mitocondrial	60
i. Morfología mitocondrial.....	60
ii. Proteínas de dinámica mitocondrial.....	62
D. Análisis de dos poblaciones celulares resultantes de la exposición a TMZ	63
IV. Rol de la mitocondria en la senescencia celular	66
A. Mitofusinas en la senescencia del melanoma inducida por TMZ	66
i. Mitofusina 2 en la senescencia inducida por TMZ.....	66
ii. Mitofusina 1 en la senescencia inducida por TMZ.....	70
B. p53 y función mitocondrial	74
C. Factores reguladores del fenotipo secretor asociado a la senescencia y función mitocondrial	77
Discusión	81
Conclusiones	90
Perspectivas	91
Agradecimientos	92
Referencias	93
Anexo	118

Resumen

La senescencia es un punto final de la quimioterapia y terapias dirigidas en melanoma y el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) puede afectar el crecimiento y microambiente tumoral. Trabajos previos han mostrado que la inhibición de enzimas del metabolismo energético mitocondrial puede afectar el SASP. Además, se ha visto que las células de melanoma resistentes a la terapia presentan un aumento en la función mitocondrial. Este proyecto de tesis se centró en el estudio de los cambios en el metabolismo energético que sufren las células de melanoma al entrar en senescencia celular. Con este propósito se desarrolló un modelo de senescencia inducida por la terapia exponiendo a células de melanoma de ratón a temozolomida, un agente metilante del ADN empleado para el tratamiento del melanoma metastásico. El tratamiento con esta droga activó la respuesta al daño al ADN, condujo a la inhibición de la proliferación de las células de melanoma, induciendo la senescencia en alrededor del 60-70% del cultivo.

Luego de la inducción de la senescencia se observó, en las células de melanoma, un cambio en el metabolismo energético de un metabolismo glucolítico fermentativo a uno oxidativo. Las células presentaron un aumento en la función mitocondrial, evidenciado por el aumento de parámetros respiratorios como el consumo de oxígeno basal, ATP dependiente y máximo; además de un aumento en la eficiencia de acoplamiento, capacidad de reserva e índice de control respiratorio. Estos cambios se acompañaron de un aumento en la masa mitocondrial y profundos cambios en el proteoma y morfología de las mitocondrias. Además, observamos una disminución en las proteínas de fisión mitocondrial factor de fisión mitocondrial (MFF) y proteína de fisión mitocondrial 1 (FIS1); junto con un aumento en las proteínas de fusión Mitofusina 1 y 2 (MFN1 y MFN2), que apuntan a alteraciones en la dinámica mitocondrial. El silenciamiento de la expresión de las mitofusinas evitó el aumento en el tamaño de las mitocondrias y el consumo de oxígeno e impactó negativamente en la secreción de la interleuquina 6 (IL-6) sin afectar la expresión de esta citoquina.

Por otro lado, se evaluó si ciertos factores reportados como reguladores de la senescencia y el SASP cumplían un rol en el aumento en la respiración mitocondrial. Tanto el silenciamiento de la expresión de p53 como la inhibición de su actividad transcripcional impactaron negativamente en la respiración de las células de melanoma control y tratadas. Sin embargo, el silenciamiento de la expresión de p53 no evitó el aumento en la función mitocondrial tras la inducción de senescencia. Por otra parte, la inhibición de NOTCH1, un co-factor de la transcripción, reportado en la literatura como regulador del SASP afectó significativamente la actividad mitocondrial.

En suma, nuestros resultados muestran la existencia de vínculos entre los cambios en el metabolismo energético y la adquisición del SASP en la senescencia inducida por la terapia en el melanoma.

Abreviaturas¹

2-DG: 2-deoxiglucosa; **ACN:** Acetonitrilo; **AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP; **ATM:** Ataxia telangiectasia mutada; **ATR:** Ataxia telangiectasia y la proteína relacionada con Rad3; **BRAF:** Proteo-oncogén serina/treonina quinasa B-RAF; **BrdU:** 5-bromo-2-deoxiuridina; **C/EBP-β:** Proteína beta de unión al potenciador CCAAT; **CaMK:** Quinasa dependiente de calmodulina; **CDK:** Quinasa dependiente de ciclina; **CHK1/CHK2:** Quinasas *checkpoint* 1/2; **CPT1:** Carnitina palmitoiltransferasa 1; **CTLA-4:** Antígeno 4 del linfocito T citotóxico; **DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol; **DAPT:** N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster; **DCF:** 5-(y-6)-clorometil-2',7'-dicloro fluoresceína; **DDR:** Respuesta al daño al ADN; **DMEM:** Medio Eagle's modificado de Dulbecco's; **DMSO:** Dimetilsulfóxido; **DRP1:** Proteína relacionada con la dinamina; **DTIC:** Dacarbazina; **ERMCS:** Sitios de contactos mitocondria-RE; **ERMES:** Regulador esencial de MCU; **ETC:** Cadena de transporte de electrones; **AF:** Ácido fórmico; **FAD:** dinucleótido de flavina y adenina; **FCCP:** Carbonil cianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona; **FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos; **FDR:** Tasa de falso descubrimiento; **FIS1:** Proteína de fisión 1; **FSC-A:** Área de la dispersión frontal; **GATA4:** Proteína de unión a GATA 4; **GCN5:** Acetil-transferasa de histonas GCN5; **H₂DCF:** 5-(y-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína; **HCD:** Energía de disociación colisional; **IFN-γ:** Interferón gamma; **IP3R:** Receptor sensible a inositol-1,4,5-trifosfato; **IL-2:** Interleuquina 2; **IKK:** IκB kinase; **IκB:** complejo inhibidor de NF-κB; **JAK:** Quinasa Janus; **LDH:** Lactato deshidrogenasa; **MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos; **MCU:** Uniportador mitocondrial de calcio; **MDM2²:** *Murine double minute 2*; **MEK:** Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos; **MFF:** Factor de fisión mitocondrial; **MFN1:** Mitofusina 1; **MFN2:** Mitofusina 2; **MGMT:** Metil-O6-guanina-metil-transferasa; **MICOS:** Sistema organizador de crestas mitocondriales; **MICU1/2:** Captador de calcio mitocondrial 1/2; **MID49:** Proteína de dinámica mitocondrial de 49 kDa; **MID51:** Proteína de dinámica mitocondrial de 51 kDa; **MITF:** Factor de transcripción asociado a la microftalmia; **MME:** Membrana mitocondrial externa; **MMI:** Membrana mitocondrial interna; **MMR:** Reparación por apeamiento erróneo del ADN; **MTIC:** 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida; **mTOR:** Proteína diana de la rapamicina; **NAD:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina; **NCE:** Energía de colisión normalizada; **NF-κB:** Factor nuclear-κB; **NICD:** Dominio intracelular de Notch; **NRF1/2:** Factor nuclear respiratorio 1/2; **O6-MeG:** O6-metilguanina; **OPA1:** Proteína de la atrofia óptica 1; **p38MAPK:** Proteína quinasa p38 activada por mitógenos; **PD-1:** Proteína de muerte programada 1; **PDH:** Piruvato deshidrogenasa; **PD-L1:** Ligando de PD-1; **PFT-α:** Pifthirin-α; **PGC-1α:** Coactivador 1α del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma; **PGC-1β:** Coactivador 1β del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma; **PI:** Ioduro de propidio; **PINK1:** Proteína quinasa inducida por PTEN 1; **PTPIP51:** Fosfatasa de tirosinas 51; **Rb:** Proteína del retinoblastoma; **RCR:** Índice de control respiratorio; **RE:** Reticulo endoplásmico; **ROS:** Especies reactivas del oxígeno; **SAHF:** Focos de heterocromatina asociados a la senescencia; **SASP:** Fenotipo secretor asociado a la senescencia; **SA-β-gal:** β-galactosidasa asociada a la senescencia; **SDHA:** Subunidad a de la succinato deshidrogenasa; **SFB:** Suero fetal bovino; **SIRT1:** Sirtuina 1; **SSC-A:** Área de la dispersión lateral; **TCA:** Ciclo de los ácidos tricarboxílicos; **TFAM:** Factor de transcripción mitocondrial A; **TGF-β:** Factor transformante beta; **TMZ:** Temozolomida; **TNF-α:** Factor de necrosis tumoral α; **TRAF3IP2:** Factor nuclear activador de NF-κB-2; **VAMPB:** Proteína asociada a la proteína de membrana asociada a vesículas B; **VDAC:** Canal aniónico dependiente de voltaje; **XIC:** Cromatogramas de iones extraídos.

¹ En la mayoría de los casos se mantuvieron las abreviaturas en inglés ya que son de uso generalizado en la literatura científica.

² Se mantuvo el nombre de la proteína en inglés porque no se encontró una traducción apropiada.

Introducción

Melanoma y su tratamiento

La transformación maligna de los melanocitos puede resultar en el desarrollo de melanoma, un tipo de cáncer muy agresivo y fatal [1], que ha tenido un gran aumento en su tasa de incidencia en las últimas décadas en el mundo [2]. Entre los países de América latina, Uruguay es de los países que presenta mayor incidencia y mortalidad por melanoma (**Figura 1**). El último reporte de la Comisión honoraria de la lucha contra el cáncer mostró que la incidencia en hombres es 5.87 y en mujeres 4.48 casos por 100.000 habitantes [3].

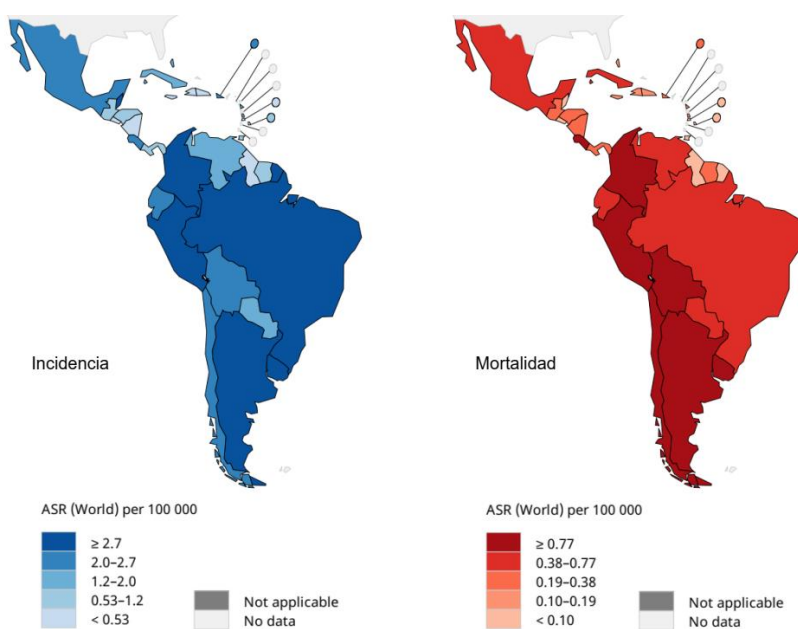


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer de melanoma en América Latina. El mapa en azul muestra la tasa de incidencia estandarizada por la edad de melanoma en hombres y mujeres en 2018. El mapa en rojo muestra la tasa de mortalidad estandarizada por la edad de melanoma en hombres y mujeres en 2018. La figura fue obtenida del *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) 2018 de la Organización Mundial de la Salud [4].

Dependiendo del grado de avance de la enfermedad se elige el tratamiento adecuado, siendo la cirugía el tratamiento principal para cualquier etapa de la enfermedad; de hecho, los pacientes con melanoma en estadios tempranos, pueden ser curados mediante cirugía y presentan una supervivencia a los 5 años del 90-100%. Sin embargo, para casos de melanomas metastásicos la cirugía deja de ser un método curativo y efectivo, debiendo recurrir a otros tipos de terapias [5,6], como la quimioterapia, radioterapia, terapias dirigidas e inmunoterapias (**Figura 2**).

La quimioterapia fue el primer tratamiento desarrollado para el melanoma en estadio avanzado. La dacarbazina (DTIC), aprobada hace más de 30 años por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), fue el

quimioterápico estándar para el tratamiento del melanoma metastásico por muchos años [7] y sigue siendo una referencia al evaluar la eficacia de nuevos tratamientos [8]. La temozolomida (TMZ), un análogo a la DTIC, presenta una mejor biodisponibilidad y tiene la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica, por lo que se utiliza en casos de melanoma con metástasis cerebrales [9].

La TMZ se hidroliza espontáneamente a pH fisiológico convirtiéndose en el metabolito activo 5-(3-metiltriazen-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC). En cambio, la DTIC requiere activación metabólica por el citocromo P450 para convertirse en el metabolito activo MTIC [10]. Este último se convierte en el ion metil-diazonio [11,12] que es capaz de metilar el ADN en diferentes posiciones, siendo la metilación en el oxígeno en la posición 6 de las guaninas la lesión responsable de la citotoxicidad de DTIC y TMZ [13]. La O⁶-metilguanina (O⁶-MeG) es reparada por la enzima suicida O⁶-metilguanina metiltransferasa (MGMT). Esta enzima cataliza la transferencia del grupo metilo de la O⁶-MeG a uno de sus residuos de cisteína; esto provoca un cambio conformacional en la MGMT que promueve su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma [14]. Entre los mecanismos de resistencia a compuestos metilantes del ADN se encuentra el aumento en los niveles de MGMT [14]. Por otra parte, la O⁶-MeG activa el sistema de reparación por apareamiento erróneo del ADN (MMR), que tras intentos fallidos de reparación provoca la ruptura de la doble hebra de la hélice del ADN [13,15]. Esto conduce a la activación de la respuesta al daño al ADN (DDR), que a su vez activa diferentes vías que conducen a un cese transitorio en la proliferación para la reparación del ADN, la muerte por apoptosis o la senescencia celular [16] (**Figura 3**).

La dacarbazina presenta una tasa de respuesta de aproximadamente 10-20% y una supervivencia libre de progresión de aproximadamente 3 a 6 meses [17]. Tan solo el 2 % de los pacientes tratados con esta droga están vivos 6 años después del tratamiento [18]. La supervivencia de pacientes tratados con temozolomida es muy similar a los tratados con dacarbazina [19]. Afortunadamente en los últimos años se han desarrollado terapias dirigidas a blancos moleculares e inmunoterapias con resultados prometedores (**Figura 2**).

Entre un 40 a un 70% de los melanomas malignos presentan mutaciones en la serina/treonina proteína quinasa B-RAF (B-RAF), que resultan en la activación constitutiva de la cascada de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la generación de señales continuas de proliferación [20,21]. En el 90% de los casos, la mutación en B-RAF corresponde a la sustitución de un residuo de valina por un glutamato en la posición 600 (B-RAF V600E). Por esta razón, en los últimos años se han desarrollado terapias dirigidas a inhibir en forma específica la actividad de este mutante. Los inhibidores de B-RAF V600E vemurafenib (PLX4032) y dabrafenib, ambos aprobados por la FDA para el tratamiento de melanoma en etapas avanzadas, han demostrado tener acciones citotóxicas contra las células de melanoma con la mutación B-RAF V600E sin afectar a las células con B-RAF salvaje [22]. A pesar de que las células adquieren resistencia a estas drogas luego de un breve período [23], este tipo de compuestos son una alternativa para el tratamiento de melanoma

maligno metastásico. La quinasa de MAPK (MEK) es parte de la vía de señalización de B-RAF, por lo tanto, los inhibidores de MEK también pueden tener efectos en melanomas que tengan mutaciones en B-RAF. Por ejemplo, el trametinib ha sido utilizado para el tratamiento de melanomas con mutaciones en B-RAF con resultados positivos [24].

Las inmunoterapias también son utilizadas para el tratamiento del melanoma, tienen como objetivo la estimulación del sistema inmune del individuo para que reconozca y elimine células tumorales (**Figura 2**). Entre estas encontramos los tratamientos con las citoquinas interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina 2 (IL-2), que han sido utilizadas por muchos años con respuestas parciales [25,26]. También anticuerpos monoclonales contra el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y contra la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1). Estos anticuerpos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico no resecable.

El ipilimumab es un anticuerpo monoclonal contra CTLA-4 [27]. CTLA-4 es una molécula de superficie que se expresa casi exclusivamente en las células T CD4⁺ y CD8⁺, interacciona con las moléculas CD80 y CD86 presentes en las células presentadoras de antígenos e inhibe la activación de las células T al reducir la producción de IL-2, la expresión del receptor de IL-2 y al detener el ciclo celular en fase G1 [28,29]. Por otra parte, el pembrolizumab y el nivolumab son anticuerpos monoclonales contra PD-1 que bloquean la unión a los ligandos PDL-1 y PDL-2 presentes en las células tumorales y en otras células del sistema inmune. La unión de PD-1 a sus ligandos inhibe la proliferación de las células T, la producción de IFN- γ , IL-2, del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y reduce la supervivencia de las células T [30–32]. Estos anticuerpos se han desarrollado con el fin aumentar la actividad del sistema inmune frente al melanoma y otros tipos de tumores, ya que al bloquear la unión de PD-1 al ligando (PDL-1/2) evitan la inhibición de las células T [8] (**Figura 2**).

Un problema muy importante de los tratamientos contra el cáncer, incluido el melanoma metastásico, es la adquisición de resistencia [33]. En las terapias dirigidas, el tumor desarrolla mecanismos de resistencia que aparecen entre los 6-7 meses de iniciado el tratamiento [34,35]. Dentro de los mecanismos de resistencia a los inhibidores de las vías de las MAPK se encuentran la aparición de nuevas mutaciones en las proteínas de esta vía y la sobreexpresión de otras quinasas que pueden activar la vía de las MAPK [36–38]. Una estrategia para superar estos mecanismos de resistencia es bloquear la vía de las MAPK a diferentes niveles combinando inhibidores de B-RAF y MEK a la vez [39]. El tratamiento combinando dabrafenib y trametinib ha logrado respuestas superiores, comparadas con la monoterapia con inhibidores de B-RAF, con una tasa de respuesta superior (76 vs 54%) y mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad (9.4 vs 5.8 meses) [40]. Estos estudios demuestran que la combinación de terapias puede emplearse de forma segura, logrando un mejor resultado clínico y menor toxicidad [39–41]. También la combinación de terapias dirigidas con inmunoterapias

se ha empleado para el tratamiento del melanoma metastásico; por ejemplo, el bloqueo de PD-1 junto con una combinación de inhibidores de B-RAF y MEK ha resultado en una supervivencia del 30-40% de los pacientes a los 5 años.

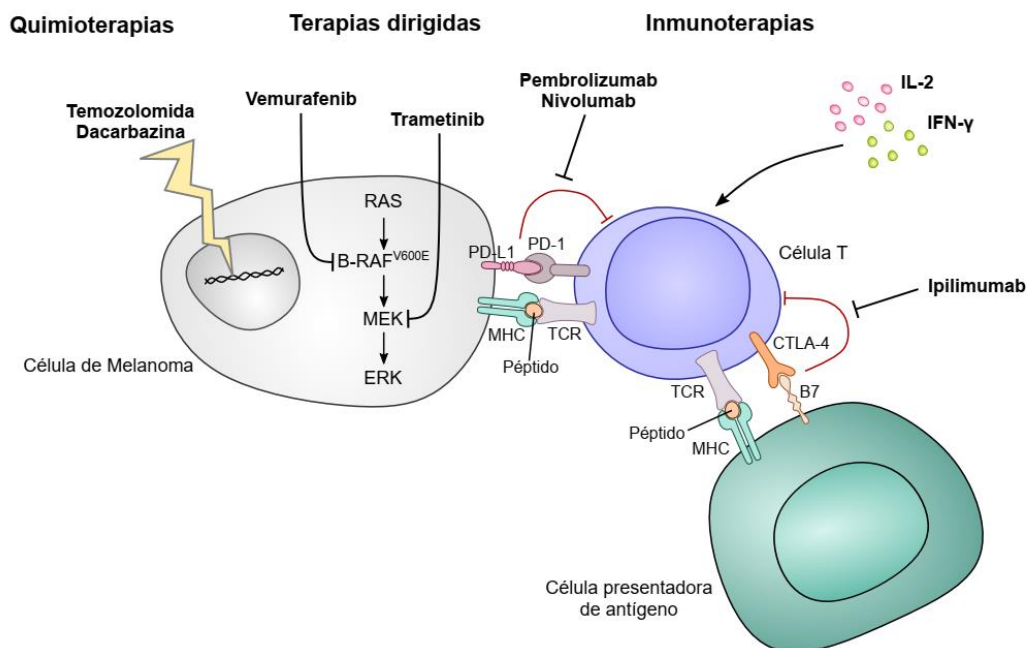


Figura 2. Terapias para el tratamiento del melanoma metastásico. Diferentes tipos de tratamientos para el melanoma metastásico: (i) Quimioterapia: la temozolomida y la dacarbazina dañan el ADN, activan la DDR e inhiben la proliferación de las células de melanoma, conducen a la apoptosis o senescencia celular. (ii) Terapias dirigidas: el vemurafenib y el trametinib son pequeñas moléculas que inhiben componentes de la vía de las MAPK (B-RAF V600E, MEK), lo que conduce a la inhibición de la proliferación y la apoptosis de las células de melanoma [42]. (iii) Inmunoterapias: (a) anticuerpos monoclonales: pembrolizumab y nivolumab son anticuerpos monoclonales que se unen al receptor PD-1 y bloquean su interacción con PD-L1, evitando la inactivación de las células T, el ipilimumab es un anticuerpo monoclonal que se une al receptor CTLA-4, bloqueando la interacción con su ligando necesaria para la activación de la célula T luego de la primera señal de reconocimiento del receptor de la célula T (TCR) al péptido presentado por la célula presentadora de antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); (b) Citoquinas (IL-2 e IFN-γ) que estimulan a las células del sistema inmune. Figura generada considerando la figura presente en [43].

Hoy en día en nuestro país, la quimioterapia con DTIC ya no se aplica como tratamiento de primera línea para melanomas avanzados [44]. Los pacientes con mutaciones B-RAF V600E o B-RAF V600K son tratados con una combinación de inhibidores de B-RAF y MEK (vemurafenib-cobimetinib, dabrafenib-trametinib y encorafenib-binimetinib). Mientras que para los pacientes que no presentan mutaciones en la vía de las MAPK las opciones de tratamiento son nivolumab-ipilimumab, nivolumab o pembrolizumab, este último se encuentra disponible recientemente en el Fondo Nacional de Recursos [44].

En suma, los avances en el tratamiento con terapias dirigidas o con inmunoterapias, han mejorado considerablemente la supervivencia global de los pacientes con melanoma metastásico avanzado; sin embargo,

para algunos pacientes estas terapias aún no son eficaces, por lo que el diseño de nuevas terapias continúa siendo un gran desafío [45].

Senescencia celular

La senescencia celular fue identificada por Hayflick en el año 1965, cuando trabajando con cultivos primarios de fibroblastos humanos observó que estas células perdían la capacidad de proliferar después de un número de divisiones sucesivas [46]. Luego se demostró que la inhibición de la proliferación se debía al acortamiento de los telómeros, que ocurre al cabo de cada ronda de replicación del ADN. Este estado celular fue denominado senescencia replicativa [47]. Más adelante se observó que las células podían entrar en senescencia en respuesta a ciertos estímulos de estrés; por ejemplo, por exposición a agentes que dañan el ADN [48] o fuertes señales mitogénicas [49], como la activación de oncogenes [50,51] o la pérdida de supresores de tumores [52]. Estos eventos fueron considerados como senescencia prematura [53].

Existen varios marcadores fenotípicos que definen a las células senescentes independientemente del estímulo inductor. En primera instancia, la senescencia celular se caracteriza por un cese irreversible en la proliferación celular mediado por las vías p53/p21/proteína del retinoblastoma (Rb) o p16/Rb [54], hasta el día de hoy no se conocen estímulos fisiológicos capaces de revertir este evento. Sin embargo, se ha visto que las células senescentes pueden re-establecer la proliferación luego de la inactivación de ciertos supresores de tumores [55].

La vía de la respuesta al daño al ADN se encuentra activa en la mayoría de las células senescentes [56] (**Figura 3**). El acortamiento de los telómeros, así como la exposición a compuestos que producen cortes en el ADN en regiones no teloméricas o relajación de la cromatina (como los inhibidores de desacetilasas de histonas), activan la vía de la respuesta al daño al ADN [56]. Los cortes en una hebra simple o doble del ADN son detectados por complejos de proteínas especializados que se acumulan en los sitios de daño. Entre estas se encuentran las quinasas ataxia telangiectasia mutada (ATM) o ataxia telangiectasia y la proteína relacionada con Rad3 (ATR) [57,58], que reconocen el daño en el ADN, se autofosforilan (ATM-P serina 1981 y ATR-P treonina 1989), se activan y fosforilan a otras proteínas blanco. Entre las proteínas blanco se encuentra la histona H2AX (fosforilada en serina 139 a γ -H2AX), que promueve el reclutamiento y acumulación de más moléculas de ATM y otras proteínas al sitio de daño del ADN [59–62] generando focos nucleares visibles por inmunofluorescencia [56]. Otras proteínas blanco de ATM y ATR son las quinasas CHK1 y CHK2 [63,64] que fosforilan a otras proteínas como la fosfatasa CDC25 necesaria para la progresión del ciclo celular [65]. ATM, ATR y CHK2 también fosforilan al supresor tumoral p53 (serina 15) y a la proteína MDM2, una ubiquitin E3 ligasa que regula los niveles y estabilidad de p53 [66,67]. MDM2 forma un complejo con p53 [68], cataliza su poli-ubiquitinación

y conduce a su degradación por el proteasoma [69,70]. La fosforilación de MDM2 por ATM y ATR, inhibe a la enzima y evita la degradación de p53, que entonces se acumula [67,71–73].

La proteína p53 es el principal regulador de la expresión del gen CDKN1A que codifica a p21, se une a los elementos de respuesta a p53 (p53RE) presentes en el promotor [74] y promueve su expresión. P21 es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que evita las transiciones G1/S y G2/M inhibiendo el ciclo celular [75] (**Figura 3**). El inhibidor de las CDK 2A (p16-INK4a o p16) es otra proteína cuyos niveles aumentan en células senescentes [55]. Esta proteína es codificada por el locus INK4/ARF y presenta una regulación compleja que involucra varias vías de señalización [76]. Los mecanismos que inducen y regulan su expresión en la senescencia celular no se encuentran esclarecidos en su totalidad [77]. En melanomas se han descrito mutaciones en el locus CDKN2A que codifica a p16 [5]. La inhibición de las CDKs por p21 y p16 mantiene a Rb en un estado hipofosforilado y activo, permitiendo su unión al factor de transcripción E2F e impidiendo la progresión del ciclo celular [78,79]. Rb también contribuye al establecimiento de la senescencia promoviendo la formación de focos de heterocromatina (SAHF), que silencian la expresión de genes relacionados con la proliferación celular [53,54,80]. En suma, en la mayoría de las células senescentes la inhibición de la proliferación es establecida y mantenida por las vías p53/p21/Rb y/o p16/Rb tras la activación de la respuesta al daño al ADN (**Figura 3**).

Muchas células senescentes presentan importantes cambios morfológicos, en cultivo en general son células más grandes, aplanadas y ocasionalmente son multinucleadas (**Figura 4**); mientras que *in vivo* su morfología depende de la arquitectura del tejido [81]. Además, las células senescentes presentan un aumento en el número y tamaño de los lisosomas, que está relacionado con un aumento en la autofagia celular [82]. Este aumento se evidencia midiendo la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa (SA- β -gal) [83]; que constituye uno de los marcadores de senescencia celular más utilizados (**Figura 4**).

Algunas células presentan un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) que se caracteriza por un aumento en la síntesis y secreción de factores de crecimiento, citoquinas, proteasas y otros factores que pueden ejercer efectos autócrinos y parácrinos, reforzando la senescencia e influyendo en el entorno celular [84–87] (**Figura 4**). Los componentes del SASP son capaces de inducir senescencia en células vecinas y por ende colaborar en la supresión tumoral [88]; mientras que también se ha reportado que ejercen acciones pro-inflamatorias, pro-fibróticas, pro-oncogénicas e inmunosupresoras, entre otras, dependiendo del contexto tisular [89,90] (**Tabla 1**).

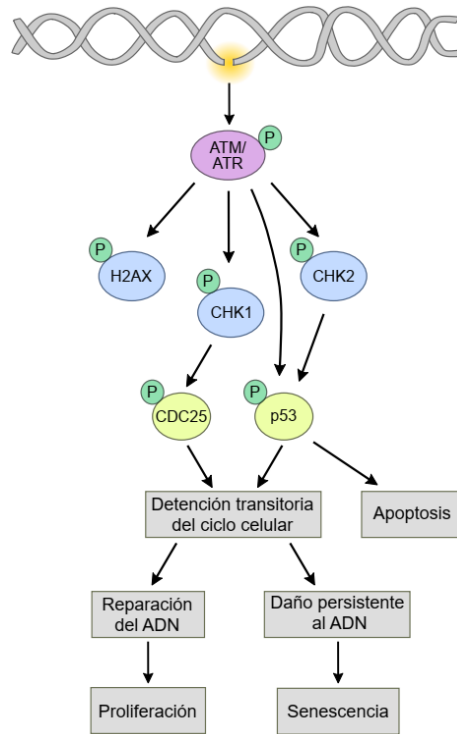


Figura 3. Respuesta al daño al ADN. Las quinasas ATM y ATR son reclutadas al sitio de daño al ADN donde se fosforilan y se activan. Una vez activadas fosforilan a sus proteínas blancas, como la histona H2AX, CHK1, CHK2 y p53. La H2AX fosforilada (γ -H2AX) se acumula en los sitios de lesión formando focos nucleares. La fosfatasa CDC25 es necesaria para la transición G1/S. La fosforilación de CDC25 conduce a su degradación, inhibiendo así el ciclo celular [91]. P53 fosforilada promueve la expresión de p21 un inhibidor de las CDKs que también inhibe la progresión del ciclo celular. Tras la activación de la respuesta al daño al ADN las células pueden morir por apoptosis, entrar en senescencia celular o reparar la lesión y continuar proliferando. Figura generada considerando la figura presente en [92].

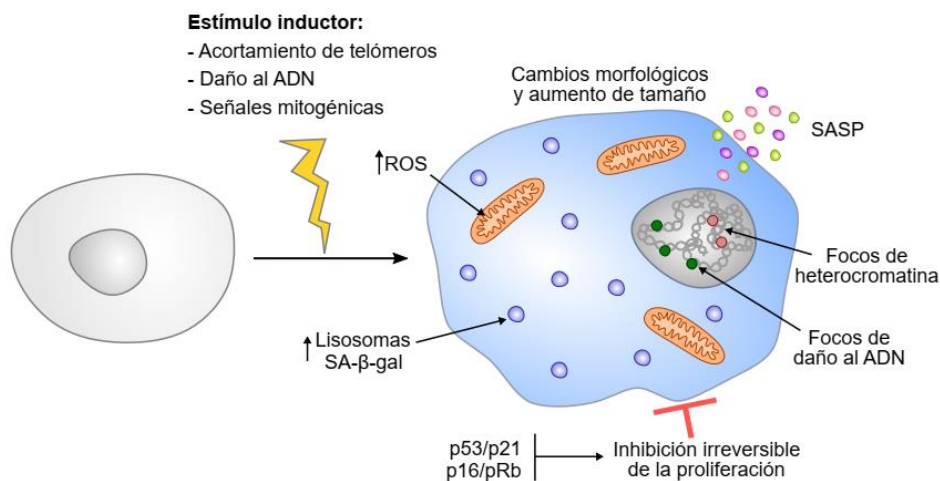


Figura 4. Estímulos inductores y marcadores de senescencia celular. La inducción de la senescencia celular en respuesta a varios estímulos de estrés se acompaña de importantes cambios fenotípicos. Las células senescentes se caracterizan por una inhibición irreversible de la proliferación mediado por los inhibidores de CDKs p21 o p16 que disminuyen los niveles de Rb fosforilada (pRb). Además, en el núcleo de estas células se forman focos de daño al ADN y focos de heterocromatina. El aumento en la actividad β -galactosidasa (SA- β -gal) refleja el aumento en el número de lisosomas. Estas células también presentan importantes cambios morfológicos, aumento de tamaño, niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) elevadas y un fenotipo secretor (SASP).

Tabla 1. Principales componentes del secretoma de las células senescentes y sus funciones principales.

Proteínas	Funciones biológicas	Referencias
IL-6, IL-8	Factores pro-inflamatorios. Modulación de la migración de las células endoteliales, angiogénesis, tumorigénesis y metástasis	[93] [94] [95]
IL-1α, IL-1β	Citoquinas multifuncionales que regulan la inflamación y la respuesta inmune.	[85] [87] [95] [96] [97]
TNFα	Citoquina pro-inflamatoria. Atrayente y activadora de células del sistema inmune. Puede inducir senescencia.	[98]
IL-4, IL13	Citoquinas que promueven la polarización de macrófagos a macrófagos promotores de tumores M2.	[93] [99]
IL-7	Promueve la proliferación de linfocitos.	[100]
IL-15	Citoquina activadora de células NK.	[101]
IL-18	Citoquina pro-inflamatoria que induce senescencia en fibroblastos.	[102]
TGF-β	Citoquina con propiedades anti-inflamatorias y anti-proliferativas.	[93] [103]
GMCSF	Factor estimulador de colonias: estimula las células supresoras mieloides que tienen funciones inmunosupresoras.	[100]
CXCL-1 (GRO-α)	Induce senescencia.	[104]
CCL-2	Quimioquina atrayente y activadora de células NK y linfocitos.	[93] [105] [106]
CCL5, IFN-β, CXCL11	Factores quimioatrayentes de células del sistema inmune. Promueven proliferación de células dendríticas y potencian la actividad anti-tumoral de linfocitos.	[107]
CCL27, CXCL11, IL-α	Factores promotores de la activación y diferenciación de linfocitos.	[108]
IGFBP7	Induce la apoptosis en células BRAF V600E.	[109]
MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10	Metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular	[90] [96]
VEGF	Factor angiogénico	[110]

Regulación del fenotipo secretor asociado a la senescencia

El fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) se establece después de algunos días de la exposición al estímulo inductor y los componentes del secretoma pueden variar dependiendo del tipo celular, el estímulo y el tiempo [85,89,111]. El impacto del SASP en diferentes contextos fisiológicos y patológicos, ha motivado el estudio de los factores y vías de señalización involucrados en su regulación [112].

Se ha demostrado que varias vías de señalización contribuyen a la regulación del SASP, pero la mayoría convergen en la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la proteína de unión al potenciador CCAAT-beta (C/EBP- β) [112]. Estos factores de transcripción regulan en forma cooperativa la transcripción de muchos componentes del secretoma [84,87,113–115]. Por otra parte, recientemente Hoare et al. han reportado en células senescentes dos secretomas diferentes regulados temporalmente por la proteína NOTCH1: un

secretoma temprano caracterizado por la secreción del factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β) con propiedades inmunosupresoras, fibrogénicas y de reparación tisular; y un secretoma tardío regulado por NF- κ B y C/EBP- β , con propiedades pro-inflamatorias, fibrolíticas y con capacidad de atraer a células del sistema inmune para la eliminación de las células senescentes [116]. Un claro ejemplo de la naturaleza dinámica del SASP puede observarse en las lesiones de piel, donde los factores secretados por las células senescentes promueven inicialmente la cicatrización del tejido y posteriormente la eliminación de las células senescentes por células del sistema inmune [117].

A continuación, se describirán las proteínas involucradas y los mecanismos de activación de los dos principales reguladores del SASP en las células senescentes: NF- κ B y NOTCH1.

Mecanismos de activación de NF- κ B

La familia de factores de transcripción NF- κ B consiste de cinco proteínas RelA/p65, c-Rel, RelB, p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2) que se asocian formando homo o heterodímeros en el citoplasma [118–120]. En ausencia de estímulos los dímeros NF- κ B se encuentran retenidos en forma inactiva en el citoplasma por la interacción con el complejo inhibidor de NF- κ B (I κ B) (compuesto por: I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B δ , I κ B ϵ , I κ B ζ y Bcl3) o con las proteínas precursoras de NF- κ B p100 y p105 [121]. La activación de NF- κ B depende de la fosforilación de I κ B por la quinasa de I κ B (IKK) y la subsecuente degradación de I κ B fosforilada por el proteasoma [122]. De esta forma se produce la liberación de los dímeros de NF- κ B, que entonces se translocan al núcleo donde regulan la expresión de sus genes blanco (**Tabla 2**) [123].

Tabla 2. Funciones biológicas de los principales genes blancos regulados por NF- κ B descritos en la literatura [124–127].

Funciones biológicas	Proteínas
Citoquinas pro-inflamatorias	TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12
Factores de crecimiento	GMCSF
Quimioquinas	IL-18, CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL5
Metaloproteinasas	MMP9
Proteínas del ciclo celular y pro-proliferativas	Ciclina D1, MYC, BCL-2L1, PAI2
Proteínas anti-apoptóticas	Fas, BCL-X, BCL-2, c-FLIP, BFL-1, Survivina, Caspasa, IPAs
Enzimas pro-inflamatorias	COX2 (PTGS2), iNOS (NOS2)
Factores angiogénicos	VEGF
Moléculas de adhesión	ICAM1, VCAM1, ECAM-1, E-selectina
Inhibidores de la señalización de NFκB	I κ B α y A20 (o TNFAIP3)

La inhibición farmacológica o el silenciamiento de la expresión de alguno de los componentes de NF- κ B (ej. RelA) o de IKK reduce la secreción de varios factores por las células senescentes [87,123,128,129]. Ohanna et al. demostraron que NF- κ B se activa en células de melanoma tras la inducción de senescencia por TMZ [128]. En fibroblastos humanos senescentes por daño al ADN, el factor de transcripción proteína de unión a GATA 4 (GATA4) induce la expresión del factor nuclear activador de NF- κ B 2 (TRAF3IP2) y de la interleuquina 1A, que activan a NF- κ B y conducen al establecimiento del SASP [113,130]. La quinasa activada por mitógenos p38 (p38 MAPK) también regula positivamente a NF- κ B en respuesta al daño al ADN y estimula el establecimiento del SASP [131]. Algunos reportes sugieren que la activación de NF- κ B y la secreción de citoquinas depende también de la vía de IL-1 [88,95,113]. En la senescencia inducida por oncogenes se demostró que NF- κ B junto con el factor de transcripción C/EBP β inducen de forma coordinada la expresión del receptor CXCR2 y de quimioquinas ligandos de ese receptor, entre ellas la IL-8 [87].

Mecanismos de activación de NOTCH

Las proteínas NOTCH (NOTCH 1-4) son una familia de receptores transmembrana que participan en varios procesos celulares [132,133]. En células senescentes se han encontrado elevados los niveles de receptores NOTCH o de componentes de la vía de señalización de esta proteína [134–138]. La activación de la vía involucra la interacción de NOTCH con un ligando transmembrana de una célula vecina. Esto resulta en el corte proteolítico del receptor NOTCH, primero por una metaloproteína ADAM y luego por una γ -secretasa [139]. El último corte ocurre entre los residuos Gly1743 y Val1744 y libera la porción carboxilo terminal del dominio intracelular de NOTCH (NICD) de 110 kDa [140]. NICD se transloca al núcleo, donde interacciona con CSL (RBP-J en ratón), un represor de la transcripción [133,141], recluta a otros factores co-activadores e induce la expresión de los genes blanco [132,142,143]. Se han identificado una gran cantidad de genes que podrían ser regulados directamente por NOTCH [144,145], específicamente en la senescencia celular promueve la expresión de TGF- β e inhibe la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (como IL-6 e IL-8) [112,116].

En la literatura hay reportadas otras vías alternativas de activación de NOTCH, generalmente referidas en la literatura como vías no canónicas [146], las cuales no se encuentran tan bien caracterizadas como la vía clásica. En muchos casos la activación de estas vías no canónicas de NOTCH se encuentra asociada a condiciones patológicas como el cáncer y a un mal funcionamiento del sistema inmune [147].

Por último, si bien se han descrito varias vías y procesos capaces de regular el fenotipo secretor de las células senescentes, aún no está claro si todos son comunes en los diferentes modelos de senescencia y si en todas las células senescentes existe una regulación temporal del SASP [148].

Inducción de senescencia en melanoma

En el contexto tumoral, la senescencia es una barrera importante para el desarrollo del melanoma y otros tumores; de hecho, el proceso de transformación neoplásica involucra la evasión de la senescencia [149–151]. Por esto, la mayoría de los estudios sobre senescencia celular se han realizado en células con proliferación limitada, pensando que la transformación tumoral promovía el escape a la senescencia [152]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que las células tumorales, incluidas las células de melanoma, conservan la capacidad de senescer prematuramente luego de la exposición a agentes que dañan el ADN como varios quimioterápicos y radiaciones [153]. Estos resultados indicaron que la senescencia constituye un “punto final” de la terapia contra el cáncer alternativo a la apoptosis, que debe ser tomado en cuenta en el desarrollo de nuevos fármacos y en la respuesta a los tratamientos ya existentes [153]. Además la senescencia inducida por la terapia también está marcada por un aumento en la síntesis y secreción de factores pro-inflamatorios, pro y anti-oncogénicos [128,154,155].

Actualmente existe cierta controversia en torno a la función pro- o anti-tumoral del secretoma de las células senescentes. Algunos autores reportan que los factores secretados inhibirían el desarrollo tumoral ya que podrían inducir senescencia en células vecinas y colaborar con la reparación de tejidos [84,86,156]. Además se ha observado que los factores secretados reclutan y activan linfocitos Th-1, macrófagos M1 y células “natural killer”, que eliminan a las células senescentes y controlan la progresión tumoral [157]. Por otro lado, otros estudios indican que estos factores secretados por las células senescentes podrían facilitar la progresión tumoral al estimular la diferenciación, movilidad y proliferación de células vecinas [100,155,158].

En las células de melanoma se ha observado que la exposición al quimioterápico TMZ induce senescencia [128,159] y resulta en la secreción de citoquinas, entre ellas la quimioquina CCL2, que potencia la supervivencia e invasividad de las células de melanoma no senescentes [128]. También se ha observado que el vemurafenib y el trametinib inducen senescencia, además de apoptosis [160–162] en líneas celulares de melanoma con la mutación B-RAF V600E. El vemurafenib también promueve la secreción de una batería de factores que estimulan el crecimiento y diseminación de las células de melanoma resistentes; sin embargo se desconoce si este fenómeno está vinculado con la inducción de la senescencia [163]. Por último, la radiación también induce la senescencia en células de melanoma y el trametinib potencia los efectos de la radiación suprimiendo el crecimiento de tumores de melanoma en un modelo animal [162].

Además de la senescencia inducida por la terapia, se han reportado otros estímulos capaces de inducir la senescencia en células de melanoma. Entre ellos se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y silenciamiento del factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF), en ambos casos se observó la secreción de la quimioquina CCL2, que aumenta la supervivencia e invasividad de las células de melanoma no senescentes [128].

Por otra parte, Ohanna et al. han demostrado que la inhibición de la Sirtuina 1 (SIRT1) también induce la senescencia en células de melanoma y sensibiliza a las células frente al tratamiento con vemurafenib [164].

Mitocondria

Estructura y bioenergética mitocondrial

Las mitocondrias son organelos esenciales con un alto grado de compartimentalización y con una compleja arquitectura que es vital para sus funciones celulares. Presentan dos membranas con funciones diferentes: la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana interna (MMI). En la MME se encuentra el canal aniónico dependiente de voltage (VDAC), una porina mitocondrial que permite el pasaje de metabolitos e iones [165]; también se encuentran proteínas involucradas en la apoptosis, proteínas de dinámica mitocondrial y proteínas de unión a otros organelos [166]. La MMI es una estructura plegada y compartimentada que presenta dos subestructuras diferentes: las invaginaciones o crestas y la membrana limítrofe interna que no presenta invaginaciones y se dispone en forma paralela a la MME [166].

En la base de las crestas se encuentra un complejo oligomérico de proteínas conocido como el sistema organizador de las crestas (MICOS), que permite la interacción de la MME y la MMI [167]. Por otro lado, en las crestas se encuentran los complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC), también conocida como cadena respiratoria: NADH-ubiquinona oxidorreductasa (NADH deshidrogenasa o complejo I), succinato-ubiquinona oxidorreductasa (succinato deshidrogenasa o complejo II), ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa (complejo III) y la citocromo c oxidasa (complejo IV); también se encuentra la FoF1 ATP sintasa (complejo V) y los transportadores de electrones ubiquinona y citocromo c [168] (**Figura 5**).

El catabolismo de diferentes metabolitos, como glúcidos, aminoácidos y ácidos grasos produce acetil-coenzima A (acetil-CoA), que es oxidado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). Durante el catabolismo del acetil-CoA y de otros metabolitos se generan electrones que reducen a los transportadores de electrones dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+) y dinucleótido de flavina y adenina (FAD). Las formas reducidas de estos transportadores, el NADH y FADH_2 , transfieren los electrones a los complejos de la cadena de transporte de electrones. Los electrones luego fluyen a través de los complejos hasta el complejo IV donde el oxígeno molecular (O_2), acepta cuatro electrones formando dos moléculas de H_2O . El transporte de electrones, es exergónico, libera energía que es utilizada por los complejos I, III y IV para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico [169]. Luego, los protones regresan a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa y la energía que se libera, por la disipación del gradiente de protones, se acopla a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi [170,171] (**Figura 5**). Esta vía de síntesis de ATP se conoce como fosforilación oxidativa y constituye una de las principales vías de producción de ATP en muchos tipos celulares.

Estudios de microscopía electrónica indican que la ATP sintasa se localiza en la punta de las crestas formando dímeros, mientras que los complejos que transportan electrones se distribuyen a lo largo de los bordes de las crestas [172]. Esto colabora a la creación del gradiente de protones que se acumula en las crestas y favorece la síntesis de ATP [172]. Además los complejos de la cadena de transporte de electrones se ensamblan formando supercomplejos, que optimizan el transporte de electrones y el bombeo de protones a través de la MMI [173,174]. A su vez, la estructura y morfología de las crestas es dinámica, se relaciona con el estado metabólico celular e influye en la formación de los supercomplejos y en la actividad de la cadena respiratoria [175].

Las reacciones de óxido-reducción que ocurren durante el catabolismo de nutrientes y durante el transporte de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria, producen en forma secundaria especies reactivas del oxígeno (ROS) [176]. El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se forma en los complejos I y III de la ETC y durante las reacciones catalizadas por algunas flavoproteínas [176]. La dismutación del $O_2^{\cdot-}$, catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), forma el oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y H_2O [177]. A partir de estas especies se pueden formar otras moléculas con mayor potencial de oxidación como el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) formado en la reacción entre el $O_2^{\cdot-}$ y el óxido nítrico ($^{\cdot}NO$), complejos oxo-metálicos, dióxido de nitrógeno ($^{\cdot}NO_2$) y radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$) [178].

En la célula y en particular en la mitocondria existen sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que se encargan de la eliminación de las ROS [179,180]. Sin embargo, un aumento en la formación de oxidantes o una disminución en los antioxidantes puede llevar a un desbalance en el estado redox; resultando en daño oxidativo de componentes mitocondriales (lípidos, proteínas y ADN) [176,181,182], inhibición de la actividad de enzimas, el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa [176,182]. Las ROS se encuentran elevadas en las células senescentes (**Figura 4**), y se plantea que contribuyen al mantenimiento de la respuesta al daño al ADN y del SASP, mediante la activación de NF- κ B [89,183–185].

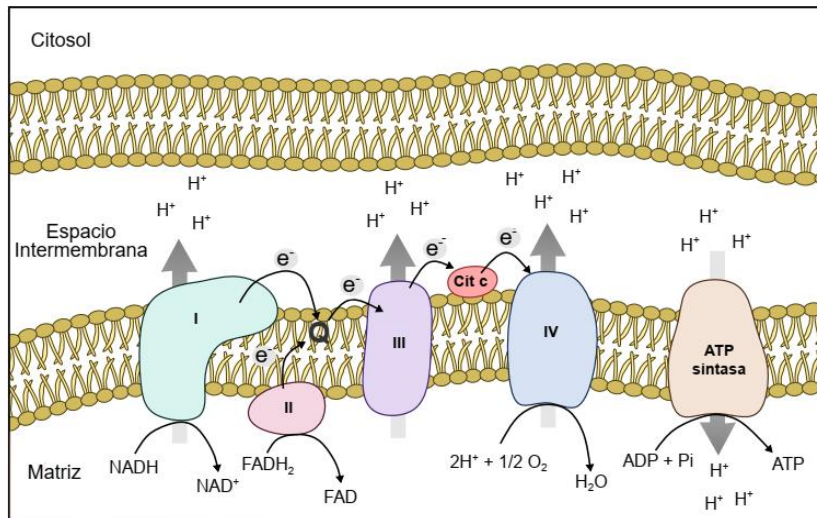


Figura 5. Cadena de transporte de electrones y síntesis de ATP. Los complejos I, II, III y IV de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa, junto la ubiquinona (Q) y el citocromo c se encuentran en la membrana mitocondrial interna. El NADH y el FADH₂ (unido al complejo II) transfieren los electrones al complejo I y a la ubiquinona, respectivamente. Los electrones son transferidos desde la ubiquinona al complejo III, citocromo c y complejo IV donde reducen el O₂ a H₂O. La transferencia de protones (H⁺) hacia el espacio intermembrana genera un gradiente electroquímico que es utilizado por la ATP sintasa para a síntesis de ATP a partir de ADP y Pi.

Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial se puede definir como el crecimiento y la división de las mitocondrias pre-existentes. Este proceso conduce a variaciones en el número, el tamaño y masa de las mitocondrias [186].

Los coactivadores-1α y 1β del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PGC-1α y PGC-1β), son reguladores importantes de la biogénesis mitocondrial [186]. PGC-1α es un factor de regulación co-transcripcional que activa a los factores nucleares respiratorios 1 y 2 (NRF1 y NRF2), que regulan la transcripción de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales y antioxidantes [187–189]. Entre los genes regulados se encuentra el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) que promueve la transcripción y replicación del ADN mitocondrial [190,191] y la enzima antioxidante mitocondrial superóxido dismutasa de manganeso (SOD2) [187–189].

PGC-1β, tiene una estructura y función molecular similar a la de PGC-1α y también actúa activando a NRF1. Aunque PGC-1α y PGC-1β son activados en forma independiente, ambos regulan la biogénesis mitocondrial permitiendo que el contenido mitocondrial se ajuste a los requerimientos energéticos de la célula [186].

PGC-1α se encuentra regulado tanto a nivel transcripcional como post-traducciona [192,193]. Su expresión puede ser regulada por múltiples factores, frente a diferentes estímulos, como por ejemplo la proteína quinasa A (PKA) que activa a CREB, el cual regula la expresión de PGC-1α directamente [194–196]. La fosforilación de PGC-1α es otro de los mecanismos de activación de la biogénesis y la quinasa dependiente de AMP (AMPK)

es el regulador principal de PGC-1 α en una gran variedad de tejidos [197,198]; y además la quinasa p38MAPK puede fosforilar y activar PGC-1 α [199]. Por otro lado, el mecanismo principal de inhibición de PGC-1 α es por acetilación catalizada por la histona acetiltransferasa GCN5 [200].

Autofagia y mitofagia

La autofagia es un proceso de degradación de grandes estructuras celulares, como organelos y agregados de proteínas, que permite eliminar componentes dañados y proveer de “combustible” a las células durante períodos de escases de nutrientes [201,202]. Durante este proceso, se forman vesículas con doble membrana, llamadas autofagosomas, que secuestran contenido citoplasmático. Los autofagosomas se fusionan luego con los lisosomas, que contienen hidrolasas que digieren el contenido [201]. Las proteínas ATG son esenciales para la formación del autofagosoma y la fusión con los lisosomas [203].

Algunos estudios han demostrado que en las células senescentes hay un aumento en la autofagia [82,204] y que el aumento de este proceso sería necesario para secreción de IL-6 e IL-8 [205]. En este sentido, se plantea que la autofagia tendría un rol dual en la senescencia ya que contribuiría a la degradación de componentes celulares durante la remodelación que sufren estas células y proveería recursos para la re-estructuración celular y la secreción de factores [206]. En las células senescentes el complejo regulador de la autofagia, complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1), permanece constitutivamente activo [207,208] y su inhibición con rapamicina afecta el SASP, por mecanismos que aún no se han establecido [115]. En células senescentes también se ha visto que la activación de mTORC1 se asocia a un aumento en la biogénesis mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la producción de oxidantes [209]. Por lo tanto, se plantea que existe un acoplamiento entre las vías catabólicas y anabólicas que facilita la síntesis de proteínas de los componentes del SASP [210].

La mitofagia es una forma especializada de la autofagia por la cual las mitocondrias dañadas y disfuncionales pueden ser selectivamente degradadas. La proteína quinasa inducida por PTEN 1 (PINK1) se acumula en la membrana externa de mitocondrias dañadas, donde conduce al reclutamiento de Parkin, una ubiquitina E3 ligasa que cataliza la formación de poliubiquitina. Las poliubiquitinas son reconocidas por proteínas receptoras optineurina, NDP52 y la proteína de unión Tax1 [211,212]. Los autofagosomas engullen a estas mitocondrias y al fusionarse con lisosomas las enzimas hidrolíticas degradan las mitocondrias [213]. En los mamíferos, la mitofagia se desencadena frente a una gran variedad estímulos, que incluyen: diferenciación celular, hipoxia, daño mitocondrial, entre otros. Algunos autores plantean que en las células senescentes la mitofagia se encuentra reducida [214,215], debido a que p53 interacciona con Parkin y bloquea su translocación a la mitocondria, inhibiendo así la mitofagia [216,217]. También se ha propuesto que el aumento de la fusión mitocondrial en las células senescentes da como resultado la falla en el secuestro de mitocondrias para la degradación por mitofagia [215].

Dinámica mitocondrial

Las mitocondrias son organelos dinámicos y su forma puede cambiar en respuesta a diferentes estímulos. En mamíferos, la dinámica mitocondrial depende de eventos de fusión y fisión que son llevados a cabo principalmente por proteínas GTPasas relacionadas a la dinamina [218,219] (**Figura 6**). La fusión de las mitocondrias es mediada la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1) y las mitofusinas 1 y 2 (MFN1 y MFN2) (**Figura 6**). OPA1 existe en dos isoformas: anclada a la MMI se encuentra la isoforma larga (L-OPA1) cuya función principal es la fusión de las MMI; mientras que la isoforma soluble más corta (S-OPA1) se encuentra en el espacio intermembrana y es necesaria para el ensamblado y la estabilidad de los supercomplejos, el mantenimiento de la respiración mitocondrial y la estructura de las crestas [175,220].

Las mitofusinas se encuentran en la MME y contribuyen la fusión de esta membrana mediante la formación de complejos homo y heteroligoméricos [221] entre las mitofusinas de dos mitocondrias diferentes (**Figura 6**). Se ha descrito que la interacción homotípica MFN1-MFN1 es la más eficiente [222]. Mientras que la MFN1 se encuentra exclusivamente en la mitocondria, MFN2 puede encontrarse tanto en la mitocondria como en la membrana del retículo endoplásmico (RE) [223].

La fisión de las mitocondrias también es mediada por GTPasas. La proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1) es una proteína citosólica, que es reclutada a la MME por medio de proteínas receptoras. Entre estas encontramos al factor de fisión mitocondrial (MFF) [224], las proteínas de dinámica mitocondrial de 49 kDa y 51 kDa (MID49 y MID51) y la proteína de fisión 1 (FIS1) [225] (**Figura 6**). FIS1 inicialmente fue descrita en levaduras como una proteína mitocondrial receptora de DRP1 [226]; sin embargo, recientemente se ha reportado que en células humanas FIS1 interacciona con MFN1, MFN2 y OPA1 e inhibe la actividad GTPasa de estas proteínas, por lo que actuaría como un inhibidor de la maquinaria de fusión mitocondrial [227]. En la MME las moléculas de DRP1 se unen formando un anillo alrededor de la mitocondria que contrae el organelo llevando a la fisión de la mitocondria [228]. Los contactos entre el RE y las mitocondrias, determinan la posición de los eventos de fisión. Los túbulos del RE envuelven a la mitocondria [229] y algunos componentes del citoesqueleto, como actina, miosina II y septina 2, colaboran con DRP1 en el proceso de fisión de las mitocondrias (**Figura 6**) [230–233].

Los eventos de fusión y fisión mitocondrial son procesos que se encuentran regulados a distintos niveles. Tanto por cambios en la expresión y degradación de las proteínas, como por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, ubiquitinación y acetilación de las proteínas. Los cambios en los niveles y actividad de las proteínas de dinámica mitocondrial pueden afectar tanto la forma de las mitocondrias como la síntesis de ATP en este organelo [234].

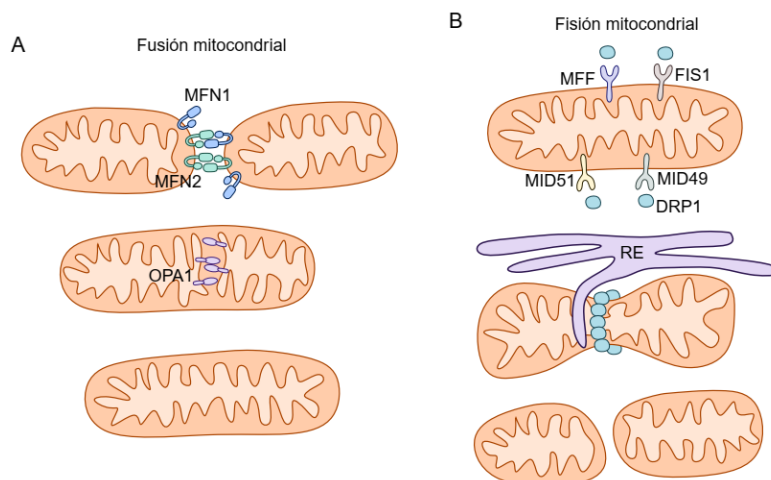


Figura 6. Dinámica mitocondrial. **A:** La fusión de las mitocondrias es un proceso que ocurre en dos pasos: (i) las mitofusinas MFN1 y MFN2 median la fusión de la membrana mitocondrial externa a través de la formación de homo y heterodímeros entre dos mitocondrias adyacentes; (ii) la fusión de la membrana mitocondrial interna es mediada por OPA1. **B:** Para que ocurra la fisión de una mitocondria, la proteína DRP1 se transloca a la membrana externa de la mitocondria y se une a las proteínas receptoras FIS1, MFF, MID49 y MID51. DRP1 forma oligómeros alrededor de la mitocondria estableciendo un anillo que con la asistencia del retículo endoplásmico (RE) constriñe a la mitocondria provocando la división en dos mitocondrias. Figura generada considerando las figuras presentes en [235,236].

Sitios de contacto entre la mitocondria y el retículo endoplásmico

Las mitocondrias pueden interactuar físicamente con varios compartimientos celulares como el aparato de Golgi, núcleo, RE y membrana plasmática [237–241]. En particular, los sitios de contacto entre las mitocondrias y el RE (ERMCS), han sido estudiados extensamente y se ha observado que son importantes para la síntesis e intercambio de lípidos entre los organelos, el transporte de calcio, la fisión mitocondrial y la activación del inflammasoma NLRP3 [238,242,243].

En los ERMCS se encuentran varias proteínas, entre ellas las mitofusinas. Aunque existe cierta controversia [244,245], se propone que la MFN2 presente en el RE interactúa con la MFN1 y MFN2 presentes en la MME [223,246], generando un vínculo entre la mitocondria y el RE. Las proteínas mitocondriales MITOL y mitostatina y la proteína del RE presenilina 2, modulan la interacción dependiente de MFN2 entre los dos organelos [247–249].

En la unión entre el RE y la mitocondria también son importantes las interacciones entre la proteína asociada a la proteína de membrana asociada a vesículas B (VAMPB) presente en el RE y la proteína que interactúa con la fosfatasa de tirosinas 51 (PTPIP51) presente en la MME [250–252]. Así como el complejo formado por VDAC presente en la MME, la chaperona GRP-75 y el receptor sensible a inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) del RE. Este complejo también cumple un rol importante en la transferencia del Ca^{2+} del RE a la mitocondria [253,254]. El Ca^{2+} sale del RE por el IP3R y entra en la mitocondria a través de VDAC en la MME y del complejo uniportador de calcio mitocondrial (MCU) presente en la MMI [253,255]. La entrada de Ca^{2+} es regulada por el regulador

esencial de MCU (ERMES) y las proteínas captadoras de calcio mitocondrial 1 y 2 (MICU1 y 2) [256]. El transporte de Ca^{2+} del RE a la mitocondria es importante para la actividad de varias enzimas mitocondriales que son activadas por este ion [257].

Bioenergética y dinámica mitocondrial

Múltiples estudios relacionan los cambios morfológicos de las mitocondrias con cambios en la bioenergética celular [258–260]. Las situaciones de estrés celular pueden llevar a importantes alteraciones tanto en la forma como en la función de las mitocondrias [261]. Un ejemplo de esto es el estrés generado por la escasez de nutrientes, que induce la elongación de las mitocondrias y un aumento en la síntesis de ATP. En estas condiciones de “inanición” se observa un aumento en el número de crestas y en la dimerización y actividad de la ATP sintasa [262,263]. La proteína de dinámica mitocondrial OPA1 participa en el proceso de remodelación estructural de las crestas y regula el ensamblado de la ATP sintasa [264]. También, se ha observado que la escasez de nutrientes conduce a la desfosforilación de la serina 616 y a la fosforilación de la serina 637 de DRP1, inhibiendo su actividad y por tanto la fisión mitocondrial. Estos eventos conducen a un aumento en el tamaño de las mitocondrias, que evita la eliminación del organelo por mitofagia [265]. Por medio de estos mecanismos se mantiene y optimiza la producción de ATP mitocondrial en situaciones donde la disponibilidad de nutrientes es limitada.

En condiciones de estrés oxidativo también se observan alteraciones tanto en la función como en la forma de las mitocondrias. La exposición a H_2O_2 activa a OMA1, una proteasa que cataliza el clivaje de L-OPA1, la isoforma involucrada en la fusión mitocondrial, y promueve la ubiquitinación y degradación de las mitofusinas por el proteasoma llevando a la acumulación de mitocondrias fragmentadas y a una pérdida en el potencial de membrana [266–269]. Otros autores indican que el H_2O_2 induce fragmentación mitocondrial dependiente de DRP1 junto con una disminución en el consumo de oxígeno y en el potencial de membrana [270]. Por otro lado, se ha reportado que frente a la exposición a H_2O_2 o a un desacoplante mitocondrial las MFN1 y MFN2 son ubiquitinadas mediante un mecanismo dependiente de PINK1/Parkin, que conduce a su degradación por el proteasoma [266–268]. Estos resultados muestran que el estado celular redox impacta en la morfología de las mitocondrias y la bioenergética celular [271].

Por otro lado, la inhibición de la función mitocondrial per se conduce a cambios en la forma de las mitocondrias. Por ejemplo, la inhibición del complejo I y III con rotenona o antimicina A activa a la quinasa AMPK e induce la fragmentación mitocondrial por fosforilación de MFF [272]. En estas condiciones la fragmentación mitocondrial facilita la eliminación de las mitocondrias dañadas por mitofagia [273]. Del mismo modo el silenciamiento y la sobreexpresión de proteínas de dinámica mitocondrial afecta la función mitocondrial [274,275]. El silenciamiento de la MFN2 disminuye el potencial de membrana y la respiración mitocondrial [276–278]. Los mecanismos

detrás de estas observaciones aún no se han dilucidado completamente pero algunos autores plantean que la deficiencia de MFN2 afecta el transporte entre el RE y la mitocondria de calcio, un modulador alostérico positivo de varias deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y activador de la ATP sintasa [223,279,280]. Aunque existe menos evidencia algunos reportes sugieren que el silenciamiento de MFN1 también afecta la respiración mitocondrial [281].

En suma, existe evidencia de la vinculación entre la forma y la función mitocondrial. Varios autores reportan que las mitocondrias alargadas e interconectadas presentan mayores niveles de fosforilación oxidativa que las mitocondrias pequeñas y fragmentadas [262,282–285]. Sin embargo, esto no es siempre así, ya que la relación entre la morfología mitocondrial y la función es compleja y depende del tipo celular y el contexto biológico [258–260].

La mitocondria en la senescencia celular

En los últimos años han aparecido varios reportes que muestran que la inducción de la senescencia se acompaña de cambios metabólicos (**Figura 7**). Por un lado, en la senescencia inducida por oncogenes y por agentes que dañan el ADN se ha reportado una disminución en las vías anabólicas de síntesis de ácidos grasos y de nucleótidos [286–288]. Por otra parte, en la senescencia inducida por oncogenes se ha reportado un importante aumento en la respiración mitocondrial dependiente de la β -oxidación de ácidos grasos [288], la fosforilación y actividad de la AMPK [289], así como un aumento en la expresión de la piruvato deshidrogenasa fosfatasa 2 (PDP2) que desfosforila y activa a la piruvato deshidrogenasa (PDH) conduciendo a un aumento en su actividad [290]. Sumado a estos cambios metabólicos, la inducción de senescencia por oncogenes se acompaña de un aumento en la biogénesis mitocondrial [289] y en la producción de oxidantes [291]. En células de linfoma senescentes por exposición a quimioterápicos también se ha visto un aumento en el catabolismo de glucosa y ácidos grasos y en el consumo de oxígeno mitocondrial [292]. Estos hallazgos, apuntan a un aumento significativo en el metabolismo oxidativo en la senescencia celular (**Figura 7**).

Sin embargo otros autores han planteado que las células senescentes presentan una pérdida en la función mitocondrial [293–295]. En células en senescencia replicativa se ha observado un aumento en el tamaño y en la interconexión de las mitocondrias, como resultado de la disminución en los niveles de las proteínas de fisión mitocondrial FIS1 y DRP1 [215]. En estas células el aumento en el tamaño mitocondrial se asocia con una reducción en la mitofagia y la acumulación de mitocondrias dañadas [215]. En fibroblastos senescentes por la exposición a agentes que dañan el ADN (desferrioxamina y H_2O_2) también se observa un aumento en el largo de las mitocondrias y una disminución en el índice ADNmit/ADNnuc [296]. Mientras que en mioblastos senescentes se observó una disminución en la actividad de la vía glucolítica, junto con la acumulación de proteínas dañadas por inactivación del proteasoma [297]. Estos eventos se asociaron con la aparición de

modificaciones oxidativas en varias enzimas de la vía glucolítica y del control de calidad de proteínas [297]. Por lo tanto, los cambios metabólicos que acompañan la inducción de la senescencia varían en función del estímulo desencadenante y del tejido. El metabolismo de las células de melanoma senescentes por la quimioterapia no ha sido evaluado aún y nos resulta de gran interés.

El supresor tumoral p53 podría tener un rol en los cambios metabólicos que sufren las células senescentes, ya que se encuentra involucrado en la regulación de la función y biogénesis mitocondrial [298,299]. Este factor regula la expresión génica de proteínas involucradas en el ensamblaje de los complejos respiratorios [300,301] y de proteínas involucradas en la replicación, transcripción y traducción del ADN mitocondrial [302–304]. Además, p53 se puede translocar a la mitocondria donde interacciona con proteínas involucradas en el mantenimiento y expresión del ADN mitocondrial [303,305].

Por otra parte, algunos reportes indican que la senescencia celular puede ser desencadenada por alteraciones en la dinámica o la función mitocondrial. El silenciamiento de FIS1 además de producir la elongación de las mitocondrias, puede inducir la senescencia celular [306]. Mientras que el silenciamiento de FIS1 y OPA1 de forma simultánea, provoca la fragmentación de las mitocondrias y previene la inducción de la senescencia [306]. El silenciamiento de MARCH5, una ubiquitina E3 ligasa de MFN1, conduce a un aumento en los niveles de MFN1 y a la acumulación de mitocondrias alargadas e interconectadas e induce también la senescencia celular [307]. La exposición de las células a los inhibidores de la cadena respiratoria rotenona o antimicina A o la depleción de mitocondrias por bromuro de etidio (células rho) también puede inducir la senescencia celular; sin embargo estas células presentan un fenotipo secretor diferente al de las células con la función mitocondrial intacta [308].

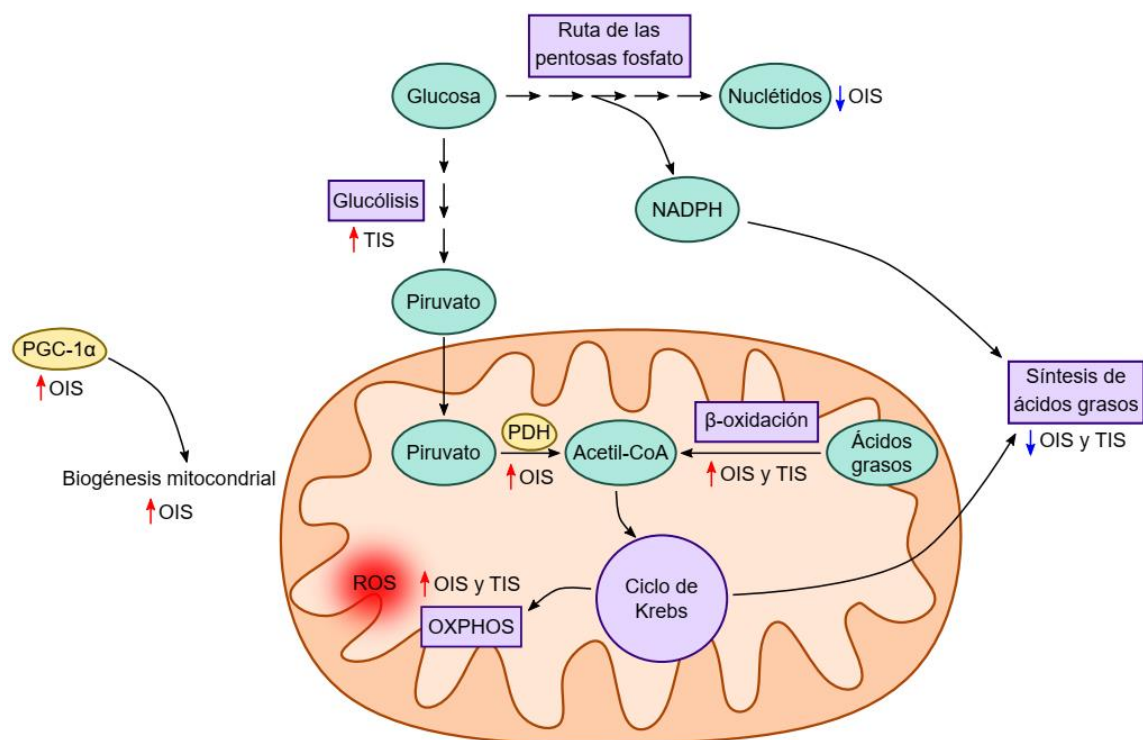


Figura 7. Alteraciones metabólicas en la senescencia inducida por oncogenes (OIS) y la senescencia inducida por la terapia (TIS). Las células senescentes presentan un aumento en el catabolismo de glucosa, la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PDH), la oxidación de ácidos grasos, el consumo de oxígeno, la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y los niveles de ROS mitocondriales [288,290–292]. También se ha descrito un aumento en la biogénesis mitocondrial mediada por PGC-1α [289]. Por otra parte también se observa una disminución en la síntesis de ácidos grasos [286,288] y deoxinucleótidos trifosfato [287]. Figura adaptada de [309].

Cambios metabólicos asociados a la terapia del melanoma

Al igual que otras células tumorales, las células de melanoma presentan un metabolismo glucolítico elevado y fermentan la glucosa a lactato para la síntesis de ATP [310]. Es decir que cumplen con el conocido “efecto Warburg” que se caracteriza por la obtención de ATP de forma rápida a través de la vía glucolítica en lugar de obtenerlo en la fosforilación oxidativa mitocondrial, aun en presencia de oxígeno [311,312]. De cualquier forma, en las células de melanoma la fosforilación oxidativa cumple un rol relevante en la progresión de la enfermedad y la resistencia al tratamiento [313,314]. Los pacientes con melanomas que expresan niveles elevados del regulador de la biogénesis mitocondrial PGC-1α, presentan una menor supervivencia global que los pacientes con bajos niveles de PGC-1α [313]. PGC-1α se encuentra bajo control de los oncogenes MITF y B-RAF; y el tratamiento con inhibidores de B-RAF V600E conduce a un aumento en la expresión de PGC-1α y en consecuencia en la biogénesis mitocondrial y la fosforilación oxidativa [314]. De hecho, la inhibición farmacológica de estas vías, sensibiliza a las células de melanoma a los inhibidores de las MAPK, conduciendo a la apoptosis y evitando la resistencia al tratamiento [315–317]. Observaciones similares se han realizado en glioma, donde la adquisición de resistencia al tratamiento con TMZ se encuentra asociada a cambios en la

cadena de transporte electrónico, que resultan en un aumento en el acoplamiento mitocondrial y mayor producción de ATP [318,319].

Además de las adaptaciones metabólicas y el aumento en la biogénesis mitocondrial, se ha visto que el tratamiento puede llevar a cambios en la dinámica mitocondrial de las células cancerosas. En células de melanoma se ha observado un aumento en los eventos de fusión mitocondrial en respuesta a la quimioterapia y radioterapia, que resulta en el alargamiento y formación de interconexiones entre las mitocondrias [320]. Las alteraciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial parecen estar involucradas tanto en la resistencia a la apoptosis frente a la terapia, como en la proliferación y migración de las células cancerosas [321]. En un alto porcentaje de biopsias de tumores de melanoma, con mutaciones en la vía de las MAPK, se observa un aumento en la fosforilación de DRP1 mediada por la quinasa ERK [322]. Esta modificación post-traducciona activa a DRP1, promueve la fisión de las mitocondrias en las células de melanoma y es necesaria para el crecimiento tumoral [322]. Además, se ha visto que los inhibidores de la vías de las MAPK reducen los niveles de DRP1 fosforilada e inhiben la fisión mitocondrial [317]. Mientras que en las células de melanoma resistentes a inhibidores de las MAPK aumenta la formación de redes mitocondriales [317].

En su conjunto los reportes mencionados muestran que las alteraciones en el metabolismo y la dinámica mitocondrial, tendrían un rol en la resistencia a la terapia del melanoma. Por esto la mitocondria podría ser un blanco farmacológico a la hora de superar la resistencia al tratamiento. Sin embargo, estos aspectos no han sido evaluados aún en las células de melanoma senescentes que aparecen durante el curso del tratamiento con quimioterapias, terapias dirigidas y radiación.

Senoterapéuticos

El secretoma senescente parece ser responsable de muchos de los efectos adversos de las células senescentes. El desarrollo de ratones transgénicos, en los que las células senescentes son eliminadas por apoptosis, por medio de transgenes suicidas bajo control el promotor de p16, reveló que estas células cumplen un rol en el desarrollo de varias enfermedades vinculadas a la vejez e impactan en la esperanza de vida [323–326]. Estos descubrimientos impulsaron la búsqueda de senoterapéuticos, fármacos capaces de eliminar las células senescentes (senolíticos) o fármacos capaces disminuir el efecto nocivo del fenotipo secretor asociado a la senescencia (senomórficos) [327]. Dado que la senescencia celular parece estar implicada en numerosas patologías, el desarrollo de compuestos senoterapéuticos aparece como una alternativa terapéutica con gran potencial [81,328,329].

Actualmente existen varios agentes senolíticos, como por ejemplo navitoclax, ABT-737, UBX0101, dasatinib, quercetina. Algunos de estos fármacos, como el navitoclax y el ABT-737, tienen como blanco proteínas anti-

apoptóticas que se encuentran aumentadas en las células senescentes como BCL-2, BCL-XL y BCL-W que inhiben la permeabilización de la MME y a las proteínas ejecutoras de la apoptosis [330–332]. El navitoclax y el ABT-737 se unen a estas proteínas e inhiben sus funciones anti-apoptóticas, desencadenando la apoptosis de las células senescentes [330,331,333,334]. UBX0101 aumenta los niveles de la proteína pro-apoptótica caspasa 3 e induce apoptosis de condrocitos senescentes [335]. El dasatinib es un flavonoide que inhibe tirosinquinazas y la quercetina actúa como inhibidor de PI3K y de las serpinas. La combinación de dasatinib y quercetina provoca una disminución en los niveles de p21 y BCL-XL (un inhibidor de la apoptosis) y elimina efectivamente a los fibroblastos senescentes [336]. Por otro lado, los inhibidores de NF- κ B, JAK y mTOR pueden actuar como senomórficos inhibiendo la secreción de factores por las células senescentes [327,337].

En el contexto tumoral, la eliminación de células senescentes ya sea en ratones transgénicos (portadores de transgenes suicidas bajo control el promotor de p16) o usando navitoclax, atenúa los efectos de la quimioterapia, evitando la disfunción cardíaca, la disminución en la producción de leucocitos por la médula ósea y la fatiga inducida por la quimioterapia; y la eliminación de las células senescentes también previene o retrasa la aparición de metástasis [323]. Además, se ha reportado que el navitoclax mata selectivamente células senescentes de melanoma y pulmón [338]. Por otra parte, se ha observado que las células de linfoma senescentes, por exposición a quimioterápicos, son muy sensibles a compuestos que inhiben el catabolismo de la glucosa o la autofagia; y la exposición a estos fármacos induce la apoptosis celular [292]. En la senescencia inducida por el oncogén RAS, la inhibición de la enzima limitante de la oxidación de ácidos grasos, la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), y la inhibición de enzimas del metabolismo del NAD⁺ disminuye la secreción de factores pro-inflamatorios por las células senescentes [288,339]. Mientras que la inhibición de mTOR y la disminución en la biogénesis mitocondrial por el silenciamiento de PGC-1 β , conducen a la inhibición del SASP, en células en senescencia replicativa y por radiación [340]. Por lo que la mitocondria y en particular el metabolismo oxidativo mitocondrial de las células senescentes podría ser un blanco interesante para el desarrollo de senoterapias.

Hipótesis de trabajo

La inducción de la senescencia es una de las consecuencias de la quimioterapia, radioterapia y terapias dirigidas del melanoma, pero a diferencia de la célula apoptótica, la célula senescente persiste, sintetiza y secreta factores proteicos potencialmente capaces de afectar el microambiente tumoral (incluyendo a las células del sistema inmune). Por otro lado, la mayoría de las inmunoterapias se centran en el uso de moléculas o anticuerpos que actúan sobre factores secretados o receptores celulares con el objetivo de aumentar las acciones de las células del sistema inmune sobre el tumor. Por esto las células senescentes podrían cumplir un rol en la respuesta a las monoterapias (quimioterapia, radioterapia y terapias dirigidas) y a terapias combinadas (quimioterapia-inmunoterapia, radioterapia-inmunoterapia o terapia dirigida-inmunoterapia) del melanoma.

Este proyecto parte de la hipótesis que el metabolismo celular debe estar acompasado a las demandas funcionales de la célula, por tanto la alta demanda energética impuesta por la síntesis y secreción de citoquinas conduciría a una reprogramación metabólica en las células de melanoma senescentes. El proyecto apunta a aumentar los conocimientos existentes sobre las células senescentes de melanoma, en particular sobre el metabolismo energético, dada la potencial relevancia de estas células en el tratamiento de esta enfermedad.

Objetivos generales y específicos

Objetivo general

Establecer modelos de senescencia de melanoma inducida por quimioterápicos y terapias dirigidas donde estudiar las alteraciones en el metabolismo energético y su vinculación con el fenotipo secretor asociado a la senescencia.

Objetivos específicos

- 1) Identificar las bases moleculares y factores reguladores responsables de las alteraciones observadas en células senescentes por exposición a TMZ.
- 2) Evaluar la vinculación entre la adquisición del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) y las alteraciones en el metabolismo energético observadas en células senescentes por exposición a TMZ.
- 3) Establecer un modelo murino de melanoma subcutáneo sometido a quimioterapia donde investigar la inducción de la senescencia y las alteraciones metabólicas en los tumores.
- 4) Establecer modelos celulares de senescencia inducida por el quimioterapéutico vemurafenib (inhibidor de BRAF V600E) y evaluar las alteraciones en el metabolismo energético.

Materiales y métodos

Cultivos celulares y reactivos

Todos los reactivos y soluciones fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, a menos que se indique lo contrario. Las células de melanoma de ratón B16-F1 (ATCC® #CRL-6323™), B16-F10 (ATCC® #CRL-6475™) y las células humanas embrionarias de riñón, HEK-293T (ATCC® #CRL-3216™) se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Gibco) suplementado con 4.5 g/l de glucosa, suero fetal bovino (SFB, Gibco) 10%, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml. Las células de melanoma de humano SK-MEL-28 (ATCC #HTB-72™) se cultivaron en el medio DMEM suplementado con SFB 10%, penicilina 50 U/ml y estreptomicina. Todos los cultivos se llevaron a cabo a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

Tratamiento con temozolomida

Se sembraron 2x10⁴ células/cm² B16-F1 o B16-F10, en placas adherentes (Thermo Scientific, Nunc) y luego de 24 horas se realizaron dos tratamientos con TMZ 200 µM de 5 horas cada uno, separados por un intervalo de 24 horas. El vehículo utilizado para preparar la solución stock de TMZ fue dimetilsulfóxido (DMSO) y la condición control consistió en la exposición de las células a este solvente. A menos que se indique lo contrario, los experimentos se realizaron a los 4 días luego del segundo tratamiento con TMZ.

Para inhibir la actividad transcripcional de p53 o la activación de NOTCH1 las células se incubaron con Pifthrin-α (PFT-α, Calbiochem) 30 µM o N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster (DAPT, Cell Signaling Technology) 10 µM, respectivamente, dos horas antes del primer tratamiento con TMZ. Se utilizó el vehículo (DMSO) como control. Los inhibidores se mantuvieron en el cultivo hasta realizar los experimentos.

Tratamiento con vemurafenib

Se sembraron 1.4x10⁴ células/cm² SK-MEL-28 y luego de 24 horas se expusieron a vemurafenib (Selleck Chemicals) 2 o 5 µM, o al vehículo (DMSO) durante 5 días, cambiando el medio cada 48 o 72 horas.

Extracción de proteínas, electroforesis y western blot

Se lisaron las células en solución de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1%) con los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa: EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, pirofosfato de sodio 25 mM, β-glicerofosfato 1 mM, Na₂VO₄ 1 mM, fluoruro de sodio (NaF) 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, inhibidor de proteasas Sigma FAST e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem). Las muestras se sonicaron, se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C y se guardaron a -80 °C. La concentración de proteínas se determinó con la técnica del ácido bicinonínico (Pierce, Thermo Scientific).

Para resolver las proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (LI-COR Bioscience) durante toda la

noche a 4 °C. 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 (**Anexo Tabla 1**); para revelar se utilizaron los anticuerpos secundarios: IRDye® 800 anti-IgG (H+L) de conejo (#926-32211, 1:20000) y IRDye® 680 anti-IgG (H+L) de ratón (#926-68070, 1:20000) de LI-COR Bioscience. Se realizaron tres lavados con TBS, Tween 0.1%, entre cada paso. Se utilizó el equipo Odyssey (LI-COR Biosciences) para detectar las bandas en las membranas y las imágenes se analizaron con el software Image Studio Lite (LI-COR Bioscience).

Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en cámaras con fondo de vidrio (Lab-tek) o en cubreobjetos y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. La permeabilización se realizó en buffer fosfato salino (PBS: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) con Tritón 0.1% durante 10 minutos a temperatura ambiente; y luego se bloqueó con PBS, Tritón 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron las incubaciones con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C (**Anexo Tabla 2**) y al día siguiente se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (1:1000): Alexa Fluor® 488 anti-IgG (H+L) de conejo (#A11034) y Alexa Fluor® 594 anti-IgG (H+L) de ratón (#A11005) (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) 1 µg/ml para teñir los núcleos. 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. En todos los casos se analizaron al menos tres cámaras/cubreobjetos diferentes por condición, contando más de 100 células en 5 campos diferentes por condición.

Para evaluar la co-localización de DRP1 con SDHA se calculó el coeficiente de correlación de Pearson [341] con el plugin *Colocalization Studio* del software libre Icy. Este coeficiente es independiente de la intensidad de la señal porque sustrae la media de la intensidad del valor de intensidad cada pixel [342].

Proliferación celular

Se evaluó la proliferación celular midiendo la incorporación de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) al ADN [343]. Para esto se incubaron las células con BrdU (BD Pharmingen) 10 µM durante 6 horas, se lavaron con PBS y se fijaron con metanol durante 5 minutos a -20 °C. Luego se realizó una incubación en HCl 2 N y Tritón 0.5% en PBS durante 20 minutos, para desnaturalizar el ADN y permeabilizar las células. La incorporación de BrdU se midió por técnicas de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-BrdU (1:50) (Becton Dickinson), como se describe arriba.

También se realizaron curvas de crecimiento del cultivo contando las células. Para esto se colectaron las células a distintos tiempos luego del tratamiento utilizando tripsina/EDTA (0.02%/0.05%), se incubaron con Trypan Blue 0.4% y se contaron con un 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 [344].

Viabilidad celular

Las células se colectaron con tripsina/EDTA (0.02%/0.05%), se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 200 µl de DMEM sin rojo fenol. Se agregó ioduro de propidio (PI) a una concentración final de 7.5 µg/ml inmediatamente antes del análisis en el citómetro de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences). Se analizó la fluorescencia en el canal FL-2 y se determinó el porcentaje de eventos en dos regiones diferentes del histograma: M1 eventos con menor fluorescencia (células vivas que no incorporan PI) y M2 eventos con mayor fluorescencia (células muertas que incorporan PI) [345].

Actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia

Se determinó la actividad SA- β -Gal empleando el sustrato artificial cromogénico X-gal (Life Technologies), de acuerdo a lo descrito por Dimri y colegas [83]. 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 y se analizaron al menos tres pocillos por condición.

Evaluación de la expresión génica mediante RT-qPCR

El ARN total se aisló con TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific), se precipitó con isopropanol, y se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). A partir de 1 µg de ARN total; y posteriormente al tratamiento con DNase I (Invitrogen), se obtuvo el ADNc mediante transcripción reversa con cebadores al azar (Random hexamers, Invitrogen) y con la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen). Se realizaron las PCRs en un analizador Corbett Rotor-Gene 6000 (Thermo Fisher Scientific) con el kit QuantiTect® SYBR Green® (Qiagen) y con cebadores específicos (**Anexo Tabla 3**). Todas las PCR incluyeron la amplificación de β -actina. Para cada gen, calculamos la expresión relativa a la expresión de actina y al control por el método del ΔCt [346].

Evaluación de la relación ADN_{mit}/ADN_{nuc}

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 [347]: 5'-ACCGCGGTCATACGATTAAC-3' (forward) y 5'-CCCAGTTTGGGTCTTAGCTG-3' (reverse) para el gen del ARN ribosomal 12S codificado por el

ADN mitocondrial; y 5'-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3' (forward) y 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3' (reverse) para el gen del ARN ribosomal 18S codificado por el ADN nuclear. Se utilizaron tubos separados para la amplificación de ADN_{mit} y ADN_{nuc}, 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 ADN_{mit}/ADN_{nuc} se calculó como $2^{(C_{tnuc}-C_{tmit})}$ y se expresaron los resultados relativos a la condición control [348].

Metabolismo energético celular

Se determinaron simultáneamente la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial y la velocidad de acidificación extracelular en el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe-24 (Agilent Technology).

Las células se sembraron en placas V7 de poliestireno (Agilent Technology) y a las 24 horas se reemplazó el medio de cultivo por el medio del ensayo (DMEM con glucosa 5 mM, piruvato de sodio 1 mM, NaCl 32 mM, Glutamina 2 mM, pH 7.4) y se incubó por 1 hora a 37 °C en incubadora sin CO₂.

Se midió el consumo de oxígeno antes y después del agregado secuencial de oligomicina (1 µM), carbonil cianuro-4- (trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP) (dos agregados de 1.5 µM) y antimicina A (0.5 µM). La concentración de FCCP se tituló para obtener el consumo de oxígeno máximo. Al finalizar las medidas se determinó el número de células, en un contador de partículas (Beckman Coulter), o la concentración de proteínas por el método del ácido bicinonínico. Estos valores se utilizaron para normalizar las velocidades de consumo de oxígeno y de acidificación extracelular. La respiración resistente al agregado de antimicina A (respiración no mitocondrial) se sustrajo a todas las medidas para determinar el consumo de oxígeno debido exclusivamente al transporte de electrones en la cadena respiratoria. La velocidad de consumo de oxígeno basal se determinó previo al agregado de inhibidores y el desacoplante. La oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial, se utilizó para determinar las velocidades de consumo de oxígeno independiente y dependiente de la síntesis de ATP en la fosforilación oxidativa. Con las medidas obtenidas luego del agregado del desacoplante FCCP se calculó la velocidad máxima de consumo de oxígeno [349].

También se determinó la velocidad de consumo de oxígeno en células permeabilizadas con digitonina (Applchem) [350]. Se midió la velocidad de consumo de oxígeno empleando piruvato/malato 5 mM/2.5 mM y succinato 10 mM como sustratos específicos de los complejos mitocondriales I y II respectivamente. Se realizaron las medidas en ausencia y en presencia de ADP para determinar la respiración mitocondrial en estado 2 y estado 3, respectivamente [350]. Se calculó el índice de control respiratorio (RCR) como la relación entre el estado 3 y el estado 2, suponiendo que la respiración en el estado 2 es similar a la respiración en el estado 4, ya que en ausencia de ATPasas contaminantes, ambos estados (2 y 4) son controlados por procesos, que conducen a la disipación del gradiente electroquímico, independientes de la ATP sintasa. Estos procesos

incluyen la fuga de protones a través de la MMI y de otras proteínas (ej. proteínas desacoplantes, transportador de piruvato) [351].

Para analizar el metabolismo de la glucosa en las células se midió la acidificación extracelular en ausencia y en presencia de ácido oxámico y 2-deoxiglucosa (2-DG), inhibidores de la enzima lactato deshidrogenasa y de la hexoquinasa respectivamente [352]. Se calculó la fracción de acidificación extracelular sensible a 2-DG (Ecuación 1) y la fracción de acidificación extracelular sensible a oxamato (Ecuación 2).

Ecuación 1.
$$\text{Fracción sensible a 2-DG} = \frac{\text{ECAR}_{\text{basal}} - \text{ECAR}_{2\text{-DG}}}{\text{ECAR}_{\text{basal}}}$$

Ecuación 2.
$$\text{Fracción sensible a Oxamato} = \frac{\text{ECAR}_{\text{basal}} - \text{ECAR}_{\text{Oxamato}}}{\text{ECAR}_{\text{basal}}}$$

Oxidantes intracelulares

Se utilizó la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para evaluar los niveles de oxidantes en las células. La DCFH-DA es oxidada por oxidantes fuertes, tales como radical hidroxilo, radical carbonato y dióxido de nitrógeno a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto fluorescente [353]. Se incubaron las células con 10 µM de DCFH-DA en un medio sin rojo fenol durante 30-45 minutos a 37 °C y luego se analizó la oxidación de la sonda midiendo la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences). A partir de los histogramas de fluorescencia de la DCF de la población celular se obtuvo la media geométrica de la intensidad de fluorescencia y se expresaron los valores relativos a la condición control.

Masa y morfología mitocondrial

Las células se incubaron con la sonda fluorescente MitoTracker Green FM (Thermo Fisher Scientific) (300 nM) en medio de cultivo sin SFB a 37 °C durante 30 minutos. Para evaluar la masa mitocondrial se colectaron las células con tripsina/EDTA (0.02%/0.05%) y se midió la fluorescencia por técnicas de citometría de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences) [354]. Se obtuvo la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de la población celular y se expresaron los valores relativos a la condición control. Para evaluar la morfología mitocondrial se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia (Leica, SP5). Se determinó el largo de las mitocondrias con el software libre ImageJ. Para medir el largo de las mitocondrias se ajustó el umbral de fluorescencia, se crearon imágenes binarias y se obtuvo el diámetro de Feret (la distancia más grande entre dos puntos dentro de la partícula) [355]. El análisis se restringió a la periferia de las células, donde se podían encontrar mitocondrias aisladas, ya que la zona perinuclear de las células presentaba una alta densidad de mitocondrias donde no era posible determinar el tamaño de cada mitocondria [225,233,307,356]. Se analizaron al menos tres pocillos provenientes de diferentes cultivos celulares para cada condición. En cada pocillo se midieron más de 4000 mitocondrias, presentes en diferentes campos y se promediaron todos los valores obtenidos. El análisis de

distribución de frecuencia se realizó con 4000 mitocondrias por condición elegidas al azar de los diferentes pocillos.

La morfología mitocondrial también se analizó utilizando técnicas de microscopía electrónica de transmisión en colaboración con la Dra. Gabriela Casanova de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias. Para esto se fijaron las células durante toda la noche a 4 °C en amortiguador cacodilato pH 7.2 con 3% de glutaraldehído. Se lavaron con buffer, incubaron en 1% de OsO₄ durante 30 minutos, lavaron nuevamente y por último se deshidrataron utilizando etanol y acetona. Se utilizó una resina Araldite ACM (Fluka) para obtener los bloques con las muestras. A partir de estos bloques se obtuvieron secciones ultrafinas en un micrótomo RMC-MTX que fueron colectadas en mallas de cobre de tamaño 200. Para realizar el contraste se incubó en una solución con 2% de acetato de uranilo durante 30 minutos a 60 °C y luego citrato de plomo siguiendo el protocolo de Reynolds [357]. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Joel JEM-1010) operando a 100 kW. Se obtuvieron imágenes con una cámara digital (HAMAMATSU C-4742-95), que se procesaron con el software Photoimpact. El largo mitocondrial se midió utilizando el software ImageJ, trazando líneas indicando la distancia mayor entre dos puntos en el organelo.

Actividad citrato sintasa

La actividad enzimática de la citrato sintasa se determinó espectrofotométricamente a 412 nm siguiendo la reducción del ácido 5,5'-di-tio-bis-[2-nitrobenzoico] 100 µM en presencia de oxalacetato (250 µM) y acetil-CoA (50 µM) [358]. Las unidades de enzima (U, µmol/min) se expresaron en función del número de células o la cantidad de proteína.

Fraccionamiento subcelular

Las células se lisaron en buffer Tris-HCl 10 mM con 0.25 mM de sacarosa, pH 7.6 utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem. Los lisados se centrifugaron dos veces a 1000 g durante 10 minutos para remover células enteras y núcleos. Las fracciones enriquecidas en mitocondrias o citosol se obtuvieron centrifugando a 14000 g durante 10 minutos. Se lavó el pellet en con el amortiguador utilizado para la homogenización y luego se resuspendió en Tris-HCl 10 mM pH 7.6 con inhibidores de proteasas Sigma FAST. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C [359]. La concentración de las dos fracciones (citósica y mitocondrial) se determinó por el método del ácido bicinonínico.

Análisis de morfología y complejidad celular

Las células se colectaron con tripsina/EDTA (0.02%/0.05%) y se analizaron en por medio de citometría de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences). Se evaluó el tamaño y complejidad celular midiendo la dispersión frontal (FSC-H) y lateral (SSC-H) de la luz.

Alternativamente las células colectadas con tripsina/EDTA (0.02%/0.05%), se incubaron con Trypan Blue 0.4% y se midió el diámetro celular en un contador de células automático Countess™ (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se calculó el volumen celular asumiendo que las células adoptan una forma esférica en suspensión ($V = 4/3\pi r^3$).

Separación celular por citometría de flujo

Las células tratadas con TMZ se colectaron con tripsina/EDTA (0.02%/0.05%) y se separaron en dos poblaciones basadas en las diferencias de tamaño y complejidad celular. La clasificación de las diferentes poblaciones se efectuó en un citómetro BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences) equipado con un diodo láser de estado sólido de 488 nm, utilizando una boquilla de 70 µm y las muestras se adquirieron a una velocidad de 10000 eventos por segundo. Para el análisis de los diferentes parámetros y definición de criterios de separación se empleó el software BD FACSDiva™ v8.0.2. Se graficó el área de la dispersión frontal (FSC-A) versus el área de dispersión lateral (SSC-A). Para la discriminación de dobletes se realizó un análisis de FSC-A versus FCS-H. Para realizar la separación se utilizó el modo Pureza o Enriquecimiento dependiendo del experimento a realizar. Los criterios de separación que se utilizaron fueron: células senescentes (TMZ grandes) con valores altos de FSC-H y SSC-H y células no senescentes (TMZ chicas) con valores bajos de FSC-H y SSC-H [22]. La pureza de las fracciones aisladas fue verificada re-analizando una alícuota de las mismas por medio de los gráficos FSC-A versus SSC-A, se obtuvo en el rango de 75 a 90% células senescentes en las fracciones enriquecidas y 98 a 100% células senescentes en las fracciones purificadas. Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Mariela Bollati, la Lic. Sabina Victoria y la MSc. Paula Céspedes de la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo.

Luego de la separación celular se lavaron las células y se cultivaron durante 48 horas y luego se midió la actividad SA-β-gal, la función y morfología mitocondrial. Para los experimentos de PCR en tiempo real se realizó la extracción de ARN inmediatamente después de separar las células en las distintas poblaciones.

Transducción con partículas lentivirales portadoras de shARN

Los plásmidos portadores de los shARN contra Mfn1 (TRCN0000081402 y TRCN0000081398), Mfn2 (TRCN0000080610), p53 (TRCN0000012360) y p65/RelA (TRCN0000055344 y TRCN0000055346) fueron adquiridos en Dharmacon. El plásmido con shARN sin blanco *scrambled* (Addgene #1864) [360] fue donado por David Sabatini. Los plásmidos pCMV-VSVG (Addgene #8454) y pCMV-dR8.2 dvpr (Addgene #8455) [361] fueron donados por Bob Weinberg. Se utilizaron las células 293T para generar las partículas lentivirales siguiendo los protocolos establecidos por el *Broad Institute RNAi Consortium* [362]. 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 shARN, en presencia de Turbofect (Thermo Fisher Scientific). A las 24 horas se cambió el medio y luego de

24 horas se colectó el medio con las partículas lentivirales, se filtró, se centrifugó y almacenó a -80 °C. La transducción de las células B16-F1 con los lentivirus se realizó durante toda la noche en medio completo con 8 µg/ml de bromuro de hexadimetina (polybrene). Al otro día se sustituyó el medio de cultivo con DMEM suplementado con 2 µg/ml de puromicina para seleccionar las células portadoras de plásmidos con shARN. Luego de obtener un cultivo resistente a puromicina se verificó el silenciamiento mediante RT-qPCR y/o Western blot o inmunofluorescencia.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se reemplazó el medio de cultivo con DMEM suplementado con 4.5 g/l de glucosa y con SFB 10% fresco y dos días después se colectó el medio, se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C y se almacenó a -80 °C. La interleuquina 6 (IL-6) se detectó con el kit de ELISA OptEIA™ (BD Bioscience) y los resultados se expresaron normalizados por la cantidad de proteínas de las células en el pocillo cuantificado por el método del ácido bicinónico.

Modelo de melanoma murino

El modelo murino se realizó en colaboración con la Dra. María Moreno en el Dpto. de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene. Se inocularon de forma subcutánea 2.5×10^5 células B16-F1 en ratones C57BL/6. Cuando los tumores fueron palpables (aproximadamente 10 días), los ratones fueron tratados tres días seguidos con dacarbazina (DTIC) 150 mg/Kg o con el vehículo (PBS). Se registró la sobrevida y el volumen tumoral en el tiempo. Para evaluar la actividad SA-β-gal se disgregaron los tumores y se adherieron las células en porta objetos mediante “*cytospin*”. Se realizó la tinción para SA-β-gal como se describió anteriormente.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC-MS/MS)

Los análisis del proteoma mitocondrial se realizaron en colaboración con la Dra. Rosario Durán y el Lic. Alejandro Leyva de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo. Se realizó el fraccionamiento subcelular para obtener fracciones enriquecidas en mitocondrias como se describe anteriormente. Se sembraron cantidades iguales de proteína de cada fracción en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 12 %) y se corrieron 1 cm en el gel separador. Las proteínas se fijaron en el gel con una solución de etanol 50% y ácido acético 12%. El gel se tiñó ligeramente con una solución de azul de Coomassie coloidal para cortar con mayor facilidad las bandas. Para su procesamiento las bandas del gel fueron divididas en porciones más pequeñas y desteñidas con una solución de bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8.0 y acetonitrilo 50%. La alquilación de cisteínas se realizó con ditiotretitol 10 mM durante 1 hora a 56 °C, seguida de una incubación con iodoacetamida 55 mM a temperatura ambiente por 45 minutos. La digestión de las proteínas se realizó en gel con tripsina (Promega) en una relación proteína:enzima 1:50 (m:m), en bicarbonato de amonio

50 mM, pH 8.0, a 37 °C durante toda la noche y luego se extrajeron los péptidos con ácido trifluoroacético 0.1% en acetonitrilo (ACN) 60%. Las muestras se secaron al vacío, se resuspendieron en ácido fórmico (AF) 0.1% y se limpiaron de sales y partículas usando micro-columnas C18 Ziptip® (Millipore).

Los péptidos tripticos se separaron usando un nano-HPLC (UltiMate 300, Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa híbrido Q-Orbitarp (QExactive Plus, Thermo Fisher Scientific). Las mezclas de péptidos fueron cargadas en una pre-columna Acclaim PepMap™ 100 C18 (75 µm x 2 cm, 3 µm, Thermo Fisher Scientific) y separadas en una columna analítica PepMap™RSLC C18 (75 µm x 50 cm, 2 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) a un flujo constante de 250 nL/min y 40°C. La columna se equilibró con 1% de la fase móvil B (A: AF 0,1%; B: AF 0,1% en ACN) seguido de un gradiente de elución: 1%-10% B 30 minutos, 10%-35% B 120 minutos, 35%-50% B 30 minutos, 50%-99% B 3 minutos. Se corrieron dos réplicas técnicas para cada muestra.

El análisis de masa se realizó en dos pasos: adquisición de MS en un rango de m/z entre 200 y 2000; seguido de la fragmentación por energía de disociación colisional (HCD) de los 12 iones más intensos en cada segmento utilizando una energía de colisión normalizada (NCE) escalonada de 25, 30 y 35. Tanto los espectros de MS como los de MS/MS se adquirieron con alta resolución (70000 y 17500 a 200 m/z respectivamente). Los iones precursores con estado de carga no asignado, con una carga, y con cinco o más fueron excluidos para la fragmentación. Se estableció un tiempo de exclusión dinámica en 30 s.

Análisis de los datos generados por LC-MS/MS

Los datos generados por nano-HPLC MS/MS se analizaron con el software libre *PatternLab for proteomics* (*PatternLab*) 4.0 [363]. Para la búsqueda se generó una base de datos de proteínas de *Mus musculus* (Uniprot, <http://www.uniprot.org/>; 23/09/2019) a la que se adicionaron los contaminantes más frecuentes en experimentos de proteómica y la secuencia reversa de cada proteína, estas últimas fueron usadas como señuelos para el cálculo de la tasa de falso descubrimiento (FDR). La búsqueda se realizó utilizando los siguientes parámetros: tolerancia del valor de m/z del ion precursor de 40 ppm; oxidación de metionina como modificación variable y carbamidometilación de cisteínas como modificación fija. Se permitió un máximo de 2 sitios de corte salteados y un máximo de 2 modificaciones variables por péptido. Los resultados de las búsquedas se filtraron mediante el módulo *Search Engine Processor* (SEPro) del *PatternLab* para obtener listas de identificación con un valor de $FDR \leq 1\%$ a nivel de proteínas.

El módulo de diagrama de Venn del *PatternLab* se usó para determinar las proteínas detectadas de manera única en cada condición biológica con $P < 0.05$. El módulo TFold del *PatternLab* se usó para detectar proteínas presentes en ambas condiciones, pero con una abundancia relativa significativamente diferente [364]. La abundancia de cada proteína se obtuvo cuantificando los cromatogramas de iones extraídos (XIC). Se

consideraron las proteínas presentes en 6 réplicas del total de 8 en ambas condiciones y se consideraron en los análisis solo las proteínas que aparecían como proteínas revisadas en la base de datos Uniprot.

Para realizar los análisis de enriquecimiento de vías con las proteínas expresadas diferencialmente entre las condiciones y las proteínas únicas de cada condición, se utilizó la aplicación ClueGO del software Cytoscape [365] y las bases de datos Gene Ontology y Reactome [366–368]. Se estableció que las vías y procesos debían tener un P valor menor a 0.05 y debían estar representadas por un mínimo de cinco proteínas y por un mínimo de un 10% del total de la lista de las proteínas de cada vía o proceso.

Análisis de datos y estadística

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 o Sidak post-hoc para comparaciones múltiples considerando una diferencia significativa con un valor de $P < 0.05$. Los análisis de distribución de la frecuencia se realizaron mediante tablas de contingencia y test de Chi cuadrado [369]. Para graficar la mayoría de los datos experimentales se utilizaron gráficos de dispersión de puntos, mientras que para muestras de $n > 8$ utilizamos gráficos de barra. 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, cubreobjetos o ratones independientes por grupo o condición). En todos los experimentos y análisis estadísticos se utilizó un $n \geq 3$.

Resultados

I. Inducción de senescencia celular por exposición a TMZ

En este proyecto de tesis doctoral se planteó establecer modelos de senescencia de melanoma inducida por quimioterápicos para estudiar las alteraciones en el metabolismo energético y su vinculación con el fenotipo secretor asociado a la senescencia. Para esto se expusieron células de melanoma de ratón B16-F1 al agente metilante TMZ (200 μ M) durante 5 horas, se realizaron dos exposiciones separadas por un intervalo de 24 horas. Las células B16-F1 presentan una delección en el locus *Ink4a/Arf* y no expresan p16, pero tienen un fenotipo salvaje para p53, B-RAF y N-RAS [370], son por tanto adecuadas para el estudio de la senescencia inducida por el daño al ADN. Se utilizó una concentración clínicamente relevante de TMZ, comparable a los niveles encontrados en sangre de pacientes sometidos a quimioterapia con esta droga [371,372]. A fin de corroborar la inducción de la senescencia, se evaluaron varios marcadores a distintos tiempos después de la segunda exposición a la droga [373].

i. Respuesta al daño al ADN y proliferación celular

La TMZ metila varias bases del ADN y la metilación en el O6 de las guaninas es la responsable de la toxicidad de la droga [13]. Por lo tanto, se evaluó si la exposición a TMZ conducía a la activación de la respuesta al daño al ADN. Para esto se midieron los niveles y la fosforilación de las proteínas ATM y sus sustratos p53 y la histona H2AX. El factor de transcripción p53 regula la expresión de genes de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular como p21, un inhibidor de las CDKs [374].

Se observó que ATM y p53 se encontraban fosforiladas a las 24 horas luego de la exposición a TMZ y se mantuvieron fosforiladas hasta 5 días luego del tratamiento con TMZ. Esto se acompañó de un aumento en los niveles de p53 y de los niveles de ARNm y proteína de p21 en las células tratadas con TMZ respecto al control (**Figuras 8A y B**). La exposición a TMZ también promovió la formación de focos de γ -H2AX en el ADN en 66 ± 2 % de las células mientras que solo se encontraron en 19 ± 2 % de las células control (**Figura 8C**). Estos resultados indican que la exposición a TMZ activa de forma persistente la respuesta al daño al ADN en las células de melanoma

Por otro lado, se observó una clara disminución en el número de células en el cultivo tratado con TMZ con respecto al cultivo control (**Figura 8D**). Así como una disminución en la incorporación del análogo de timidina BrdU al ADN (**Figura 8E**) en las células expuestas a TMZ con respecto a las células control. Esto estaría de acuerdo con una inhibición de la proliferación, que podría deberse al aumento en los niveles de p21.

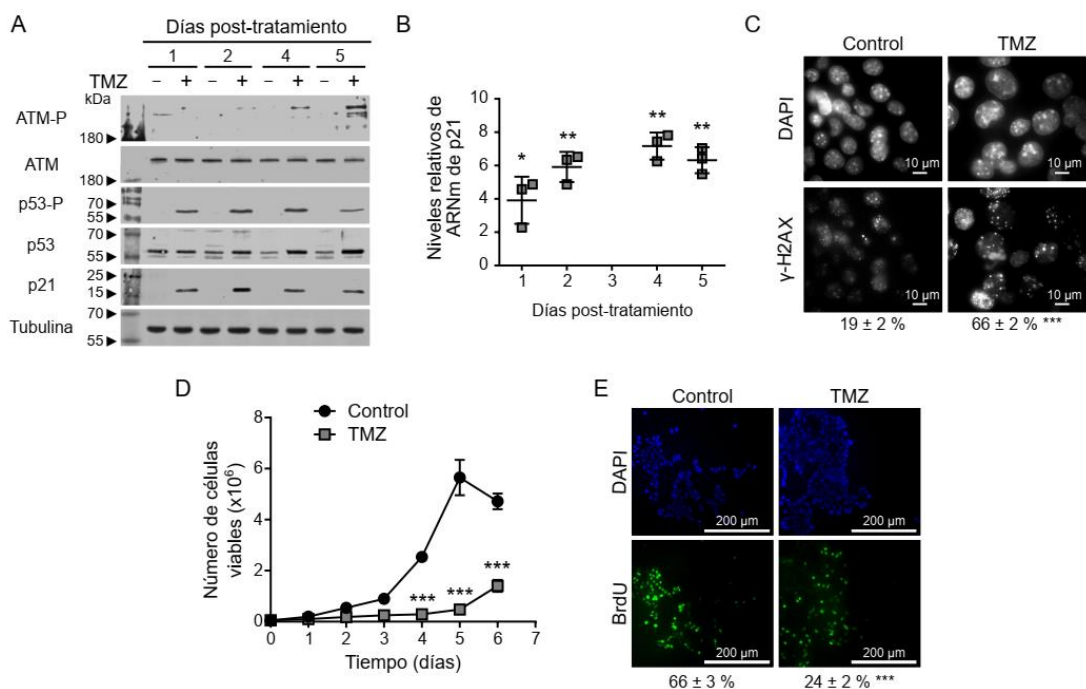


Figura 8. Respuesta al daño al ADN y proliferación celular en células de melanoma tratadas con TMZ. Las células B16-F1 se expusieron dos veces a TMZ (200 μM) o DMSO (Control) durante 5 horas con un intervalo de 24 horas. Se realizaron los ensayos a distintos tiempos luego de la segunda exposición a la droga. **A:** Western blots con anticuerpos para ATM-P (Ser1981), ATM, p53-P (Ser15), p53, p21 y tubulina como control de carga (se muestra un experimento representativo de $n = 3$). **B:** RT-qPCR para la expresión de p21. Los resultados se expresan relativos a la condición control ($n = 3$). **C:** Imágenes representativas de focos nucleares de γ-H2AX obtenidas dos días luego del tratamiento con TMZ. Debajo de cada imagen se indica el porcentaje de células con focos nucleares ($n = 6$). **D:** Curvas de crecimiento del cultivo celular. Las células viables fueron detectadas por exclusión de Trypan blue ($n = 9$). **E:** Imágenes representativas del ensayo de incorporación de BrdU al ADN. Debajo de cada imagen se muestra el porcentaje de células con tinción positiva para BrdU en el núcleo ($n = 6$). Los resultados representan la media ± SD. Las diferencias significativas se determinaron: En (B) mediante ANOVA de una vía y test Sidak para comparaciones contra la condición control; en (D) mediante ANOVA de dos vías y test Sidak para comparaciones múltiples; en (C y E) mediante test de Student. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

ii. Cambios morfológicos y actividad β-galactosidasa asociada a la senescencia

Como se observa en la **Figura 9A**, el tratamiento con TMZ llevó a un aumento en la actividad SA-β-gal. Un $64 \pm 2 \%$ de las células tratadas con TMZ resultaron positivas para esta tinción mientras que solo se encontró un $2 \pm 1 \%$ de células positivas en la condición control. El tratamiento con TMZ también condujo a importantes cambios morfológicos en las células, estas aumentaron de tamaño y presentaron una disposición más extendida que las células control (**Figura 9A**). Los cambios morfológicos también fueron evaluados mediante citometría de flujo. Se midió la dispersión frontal de la luz (FSC-H), indicativa del tamaño celular, y la dispersión lateral (SSC-H), asociada a la complejidad celular. En la **Figura 9B** se aprecia un importante cambio en ambos parámetros en las células tratadas con respecto a las células control. Para determinar el porcentaje de células que sufren estas alteraciones morfológicas, la población total de células (R1) se separó en dos subpoblaciones

(R2 y R3), basadas en las diferencias en la dispersión frontal y lateral de la luz, y por tanto en el tamaño y complejidad celular. Encontramos $71 \pm 1\%$ de las células expuestas a TMZ en R3 (células de mayor tamaño y con mayor complejidad celular), mientras que solo un $7.7 \pm 0.5\%$ de las células control se encontraron en esta región (**Figura 9B**).

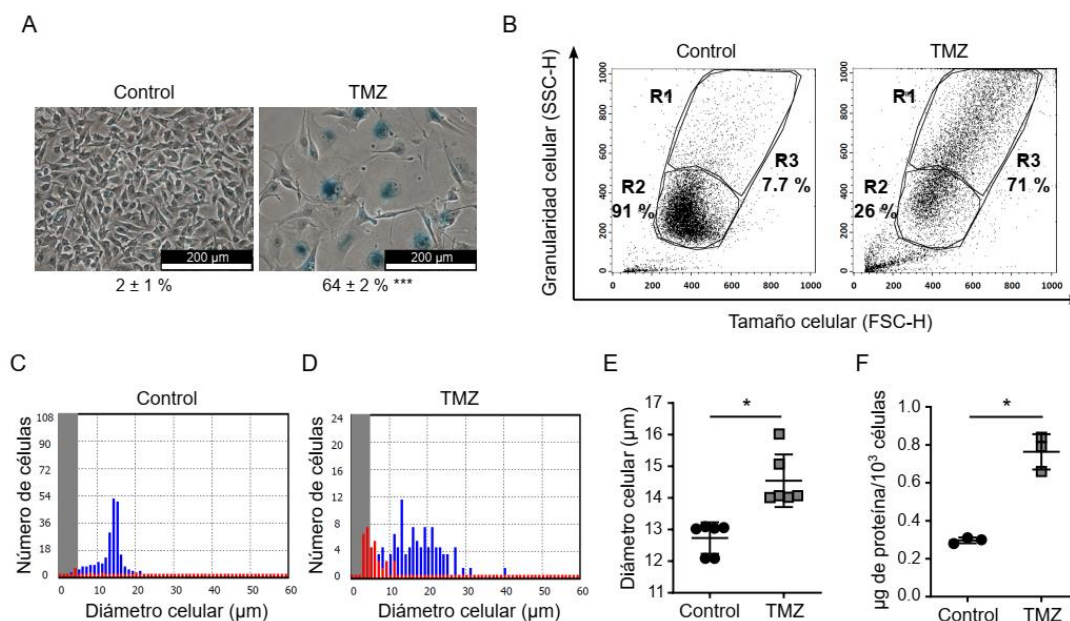


Figura 9. Cambios morfológicos y actividad SA-β-gal en células de melanoma luego de la exposición a TMZ. Las células B16-F1 se expusieron dos veces a TMZ (200 μM) o DMSO (Control) durante 5 horas con un intervalo de 24 horas. A los 4 días de la segunda exposición a la droga se realizaron diferentes experimentos. **A:** Se midió la actividad SA-β-gal. Se muestran imágenes representativas de microscopía de campo claro y debajo los porcentajes de células positivas en los cultivos (n = 6). **B:** Citometría de flujo midiendo la dispersión frontal (FSC-H, indicativa del tamaño celular) y lateral (SSC-H, indicativa de la complejidad celular) de la luz. Se muestran gráficos representativos con los porcentajes de eventos en cada subpoblación (n = 3). **C-E:** Evaluación del diámetro de células vivas (barras azules) y células muertas (barras rojas). Se muestran histogramas representativos de la distribución del diámetro celular en células control (**C**) y tratadas con TMZ (**D**) y la media del diámetro de las células vivas, obtenida a partir de los histogramas (**E**) (n = 6). **F:** Cuantificación de la masa proteica (μg) de las células (n = 3). Los resultados representan la media ± SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. *P < 0.05, ***P < 0.0001.

Para cuantificar los cambios en el tamaño celular, se colectaron las células de las placas de cultivo y se analizaron en un contador automático (Countess™). Se observó un aumento en el diámetro celular de las células tratadas ($14.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$) con respecto a las células control ($12.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$) (**Figuras 9C-E**), indicativo de un aumento de cerca del 50% en el volumen celular (células control $1100 \pm 100 \mu\text{m}^3$ y células tratadas $1600 \pm 300 \mu\text{m}^3$). Por otro lado, se midió la cantidad de proteínas en las células y se observó un aumento de 2.6 veces en los μg de proteína total por célula, en las células tratadas con TMZ con respecto a las células control (**Figura 9F**), que excede al aumento en el volumen celular.

iii. Fenotipo secretor asociado a la senescencia

Las células senescentes se caracterizan por presentar un fenotipo secretor. Por esto se evaluó la expresión de genes de varias citoquinas mediante RT-qPCR. La expresión de los genes de las interleuquinas 6 y 18 (*Il6* e *Il18*), ligandos de quimioquinas (motivo C-C) 2 y 5 (*Ccl2* y *Ccl5*), ligandos de quimioquinas (motivo C-X-C) 9, 10 y 11 (*Cxcl9*, *Cxcl10* y *Cxcl11*), homólogos de la interleuquina 8 (*Cxcl1* y *Cxcl2*), factor de necrosis tumoral α (*Tnfa*) y del factor de crecimiento transformante β (*Tgfb*) aumentó luego del tratamiento con TMZ (**Figura 10**). Muchas de estas proteínas ya han sido descritas como componentes del secretoma de células de melanoma senescentes [107,128,375,376]. La evaluación a distintos tiempos mostró un pico en la expresión de estos genes a los cuatro días de la exposición a la droga.

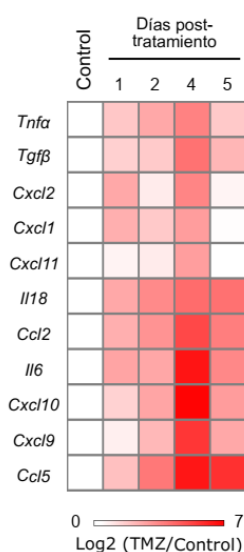


Figura 10. Expresión de componentes del fenotipo secretor. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control) y se evaluó la expresión de varias citoquinas y factores de crecimiento por medio de RT-qPCR. Los resultados son la media de n = 3 muestras por condición y se expresan relativos a la condición control.

iv. Modelo murino de melanoma subcutáneo sometido a quimioterapia

Con el fin de trasladar las observaciones realizadas en las células a un modelo de melanoma *in vivo* se establecieron tumores en ratones C57BL/6, mediante la inoculación de células B16-F1 en el flanco derecho del animal. A los días 11, 12 y 13 de la inoculación, cuando los tumores eran palpables, se realizaron los tratamientos con DTIC a una dosis de 150 mg/Kg o con el vehículo (PBS). Como se observa en la **Figura 11A** el tratamiento con DTIC condujo a un aumento en la sobrevivencia de los animales y a una disminución en el volumen tumoral (**Figura 11B** y **Figura 11C**).

Para evaluar si el tratamiento con DTIC inducía la senescencia en las células tumorales, se evaluó la actividad SA- β -gal un día o cuatro días después de último tratamiento con DTIC. Sólo se observó un aumento en la

tinción de las células (**Figura 11D**) a los cuatro días del último tratamiento con DTIC, con respecto a los animales tratados con PBS (**Figura 11E**). Además, se pudo apreciar un gran aumento en el tamaño de las células en los tumores de animales tratados con DTIC en relación a las células tumorales de animales tratados con vehículo. Esto concuerda con las observaciones previas en las células en cultivo tratadas con TMZ.

En suma, estos resultados sugieren que el tratamiento con agentes alquilantes, como DTIC y TMZ, induciría senescencia en células de melanoma tanto *in vitro* como *in vivo*.

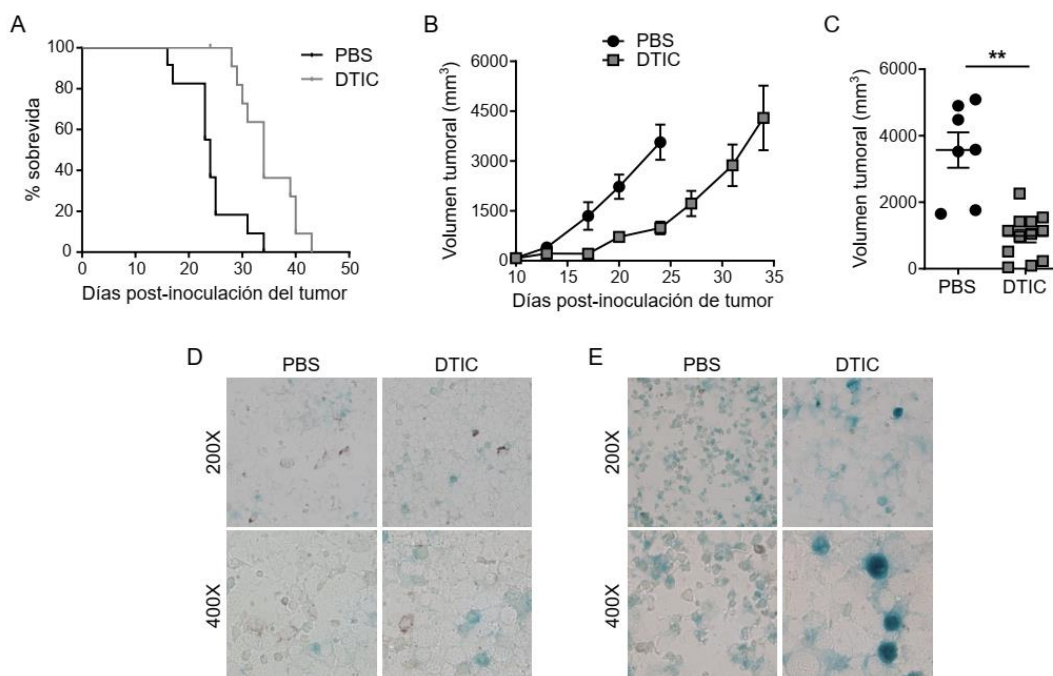


Figura 11. Inducción de senescencia en un modelo *in vivo*. Se generaron tumores en ratones C57BL/6 mediante inoculación subcutánea de células B16-F1. Luego de que los tumores fueron palpables se realizaron tres inyecciones intraperitoneales de DTIC 150 mg/Kg/dosis o PBS para el grupo control ($n = 12$). **A:** Curva de sobrevivencia de Kaplan-Meier. La curva muestra el porcentaje de ratones supervivientes a los tiempos indicados luego de la inoculación, $P = 0.0003$. **B:** Volumen del tumor a distintas fechas después de la implantación. **C:** Volumen del tumor 24 días después de la implantación de las células. **D:** Actividad de SA- β -gal en células obtenidas luego del disgregado de tumores de ratones tratados con PBS o DTIC un día después del último tratamiento. **E:** Actividad de SA- β -gal en células obtenidas luego del disgregado de tumores de ratones tratados con PBS o DTIC cuatro días después del último tratamiento ($n = 3$). Las diferencias significativas se determinaron: En (**A**) mediante test Mantel-Cox; en (**C**) mediante test de Student. $^{**}P < 0.001$.

II. Metabolismo energético de las células senescentes

Las células de melanoma, al igual que otras células tumorales, dependen de la glucólisis para obtener ATP. Estas células fermentan la glucosa a lactato, independientemente de la concentración de oxígeno en el medio [377]. Varios reportes de nuestro grupo y de otros autores muestran que la inducción de la senescencia se acompaña de cambios en el metabolismo energético celular. Sin embargo, estos pueden ser diferentes

dependiendo del tipo celular y del estímulo inductor [288,290,292–295]. Por este motivo, analizamos el metabolismo de la glucosa y la función mitocondrial en nuestro modelo de senescencia.

i. Catabolismo de la glucosa

El catabolismo de la glucosa resulta en un aumento en la producción de ácido láctico o ácido carbónico, dependiendo de si la glucosa es degradada en una vía fermentativa u oxidativa, respectivamente. El lactato formado por la reducción del piruvato, en la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), es excretado por la célula junto con un hidrogenión (H^+) (**Figura 12A**) [352]. Por otra parte, el dióxido de carbono (CO_2), formado durante la oxidación del piruvato, por la piruvato deshidrogenasa (PDH) y las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en la mitocondria, se hidrata formando ácido carbónico (H_2CO_3). A pH fisiológico el H_2CO_3 se disocia en el anión bicarbonato (HCO_3^-) y un H^+ (**Figura 12A**) [378]. El catabolismo de la glucosa, tanto a lactato como a CO_2 , conduce a una disminución en el pH extracelular por esto medimos la velocidad de acidificación extracelular para evaluar el metabolismo glucolítico.

Como se observa en la **Figura 12B y D**, la velocidad de acidificación extracelular basal (en ausencia del agregado de drogas) de las células senescentes resultó significativamente menor a la de las células control. Para determinar que fracción de la acidificación era debida a la formación de lactato, utilizamos 2-deoxiglucosa (2-DG), un inhibidor de la hexoquinasa, y oxamato, un inhibidor de la enzima lactato deshidrogenasa (**Figura 12A**) [352]. La adición de 2-DG (**Figura 12B**) redujo significativamente la velocidad de acidificación extracelular, tanto en las células control como en las células senescentes, y se obtuvo una fracción de acidificación extracelular sensible a 2-DG mayor a 0.7 en ambas condiciones (**Figura 12C**). Por el contrario, la adición de oxamato produjo una disminución en la velocidad de acidificación extracelular en las células control, mientras que prácticamente no tuvo efecto en las células senescentes (**Figura 12D y E**).

Estos resultados sugieren que, si bien el catabolismo de la glucosa es una vía relevante tanto en las células de melanoma senescentes como no senescentes, el destino del piruvato formado en la glucólisis de las células de melanoma no es el mismo. En las células de melanoma ocurre principalmente una reducción de piruvato a lactato, mientras que en las células de melanoma senescentes el piruvato tendría un destino diferente, siendo oxidado probablemente a nivel mitocondrial.

A

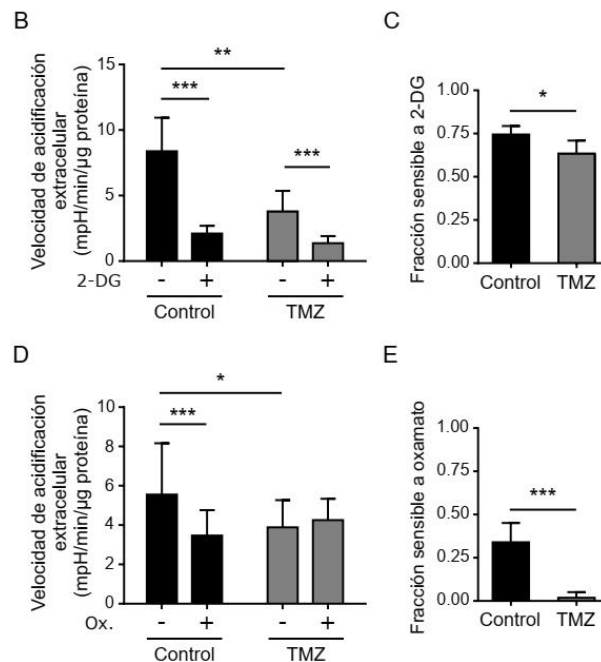
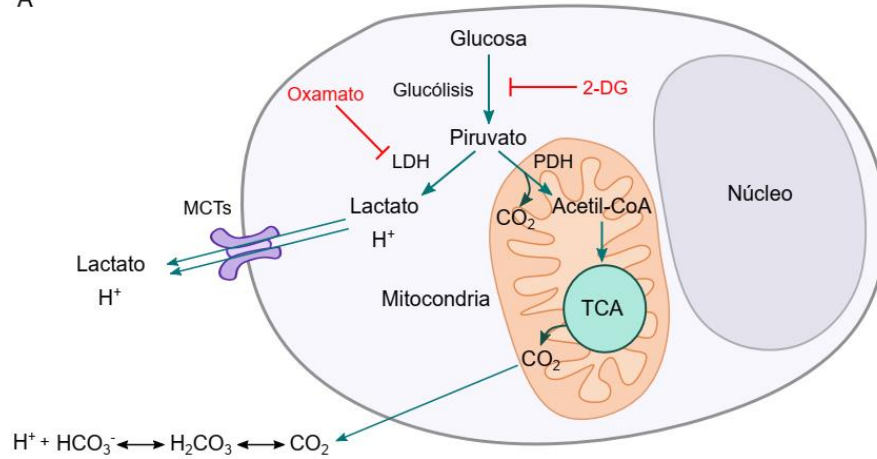


Figura 12. Catabolismo de glucosa a lactato. **A:** Esquema de las vías de producción ácidos en la célula y los puntos de inhibición de la glucólisis por 2-DG y oxamato. **B-E:** Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μM) o DMSO (Control) y se midió la velocidad de acidificación extracelular antes y después del agregado de 2-DG (80 mM) (**B**) u oxamato (80 mM) (**D**). A partir de estos datos se calculó la fracción de la acidificación extracelular basal sensible a 2-DG (**C**) u oxamato (**E**), respectivamente. Los resultados representan la media ± SD (n = 10). Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. **P* < 0.05, ***P* < 0.001, ****P* < 0.0001.

ii. Función mitocondrial

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al evaluar el metabolismo glucolítico (**Figura 12**), se procedió a evaluar la función mitocondrial de las células de melanoma tras la inducción de la senescencia.

Para estudiar la función mitocondrial en células intactas, se midió la velocidad de consumo de oxígeno por célula, antes y después del agregado de inhibidores y un desacoplante de la cadena respiratoria y de la

fosforilación oxidativa (**Figuras 13A y B**). En las células senescentes se observó un aumento significativo tanto en la respiración basal (obtenida en ausencia de inhibidores), como en la respiración ligada a la síntesis de ATP (respiración sensible al agregado de oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa), con respecto a la condición control. Sin embargo, no se observaron diferencias en la respiración independiente de ATP (respiración resistente al agregado de oligomicina) entre las condiciones. Las células senescentes también presentaron un aumento en el consumo de oxígeno máximo (obtenido luego del agregado del desacoplante FCCP), con respecto a las células control, indicativo de un aumento en el número o actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Finalmente, luego del agregado de antimicina A (un inhibidor del complejo III), se determinó el consumo de oxígeno no mitocondrial, que resultó mayor en las células senescentes que en las no senescentes (**Figuras 13A y B**). Para verificar si el aumento en la velocidad de consumo de oxígeno se debía únicamente al aumento en el tamaño y masa celular, se normalizó la velocidad de consumo de oxígeno por cantidad de proteínas. Como se puede observar en la **Figura 13C**, el consumo máximo de oxígeno por μg de proteína es mayor en las células senescentes que en las células control, confirmando que el aumento en la función mitocondrial sobrepasa al aumento en el tamaño celular.

A partir de los datos obtenidos en la **Figura 13B** se calcularon los siguientes índices respiratorios: la eficiencia de acoplamiento (respiración dependiente de ATP/respiración basal), la capacidad de reserva (respiración máxima/respiración basal) y el índice de control respiratorio (respiración máxima/respiración resistente a oligomicina) (**Tabla 3**). Como se puede apreciar estos índices son relaciones entre parámetros respiratorios obtenidos en diferentes condiciones, por lo tanto, son independientes del número de células y del contenido proteico [349]. La eficiencia de acoplamiento resultó significativamente mayor en las células senescentes, indicando que presentan un mayor acoplamiento entre el transporte de electrones y síntesis de ATP a partir de ADP y P_i , que las células control. La capacidad de reserva también fue mayor en las células senescentes, lo que sugiere que estas células responderían mejor frente a una situación de demanda energética o de daño mitocondrial. Por último, se obtuvo un índice de control respiratorio mayor en las células senescentes que en las no senescentes, que apunta a un aumento general en la función mitocondrial tras la inducción de la senescencia por TMZ.

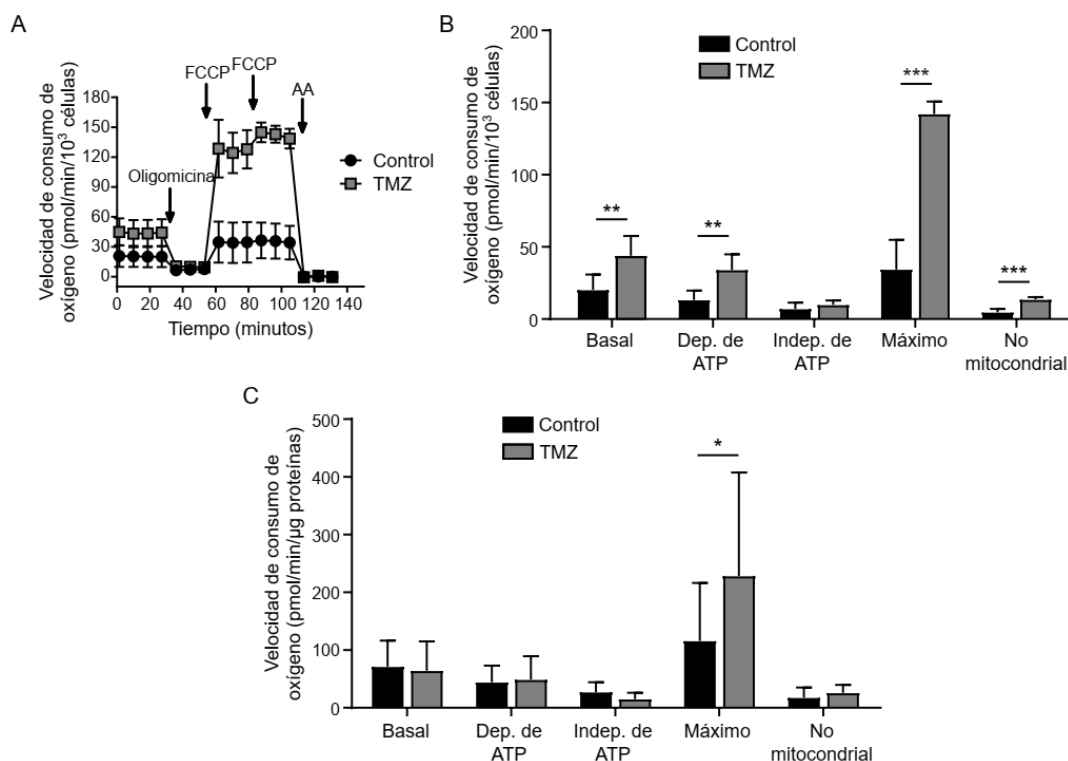


Figura 13. Función mitocondrial. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control) y se evaluó la velocidad de consumo de oxígeno. **A:** Velocidad de consumo de oxígeno antes y después del agregado secuencial de oligomicina (1 μ M), FCCP (dos inyecciones de 1.5 μ M) y antimicina A (AA, 0.5 μ M). El gráfico representa la velocidad de consumo de oxígeno por 10³ células. **B:** Parámetros respiratorios obtenidos a partir de las medidas de la velocidad de consumo de oxígeno de la Figura 13A. **C:** Parámetros respiratorios obtenidos de experimentos similares al que se muestra en la Figura 13A pero normalizados por el contenido total de proteínas. Los resultados representan la media $\pm$ SD (n = 9 - 10). Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. * P < 0.05, ** P < 0.001, *** P < 0.0001.

Tabla 3. Índices respiratorios mitocondriales. A partir de las medidas de consumo de oxígeno del experimento de la Figura 13 se calcularon los siguientes índices respiratorios: Eficiencia de acoplamiento, capacidad de reserva e índice de control respiratorio. Los resultados muestran la media $\pm$ SD (n = 9-10). Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. *** P < 0.0001.

Índice	Control	TMZ
Eficiencia de acoplamiento	0.67 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.03 ***
Capacidad de reserva	1.6 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.7 ***
Índice de control respiratorio	4.9 $\pm$ 0.7	15 $\pm$ 4 ***

Los experimentos que se muestran en la **Figura 13**, fueron realizados utilizando células enteras. Por lo tanto, las diferencias observadas en la velocidad de consumo de oxígeno podrían deberse tanto a cambios en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa mitocondrial, como a alteraciones en etapas previas como la captación de glucosa o la vía glucolítica. Para evaluar la función mitocondrial en forma exclusiva, se midió la velocidad de consumo de oxígeno en células permeabilizadas con digitonina. Primeramente, se determinó la concentración de digitonina capaz de permeabilizar la membrana plasmática sin afectar la integridad de la

membrana mitocondrial [350]. Como se puede observar en la **Figura 14A** en ambas condiciones empleando 42 $\mu\text{g/ml}$ de digitonina se obtienen los valores máximos de velocidad de consumo de oxígeno. Una vez definida la concentración del detergente a utilizar se determinó la respiración en estado 2, agregando sustratos específicos para los complejos mitocondriales: piruvato y malato para el complejo I (**Figura 14B**) y succinato para el complejo II (**Figura 14C**). La respiración en el estado 3 se determinó luego del agregado de ADP. Para ambos complejos, la respiración en estado 3 y los índices de control respiratorio (RCR), resultaron significativamente mayores en las células senescentes que en las células control.

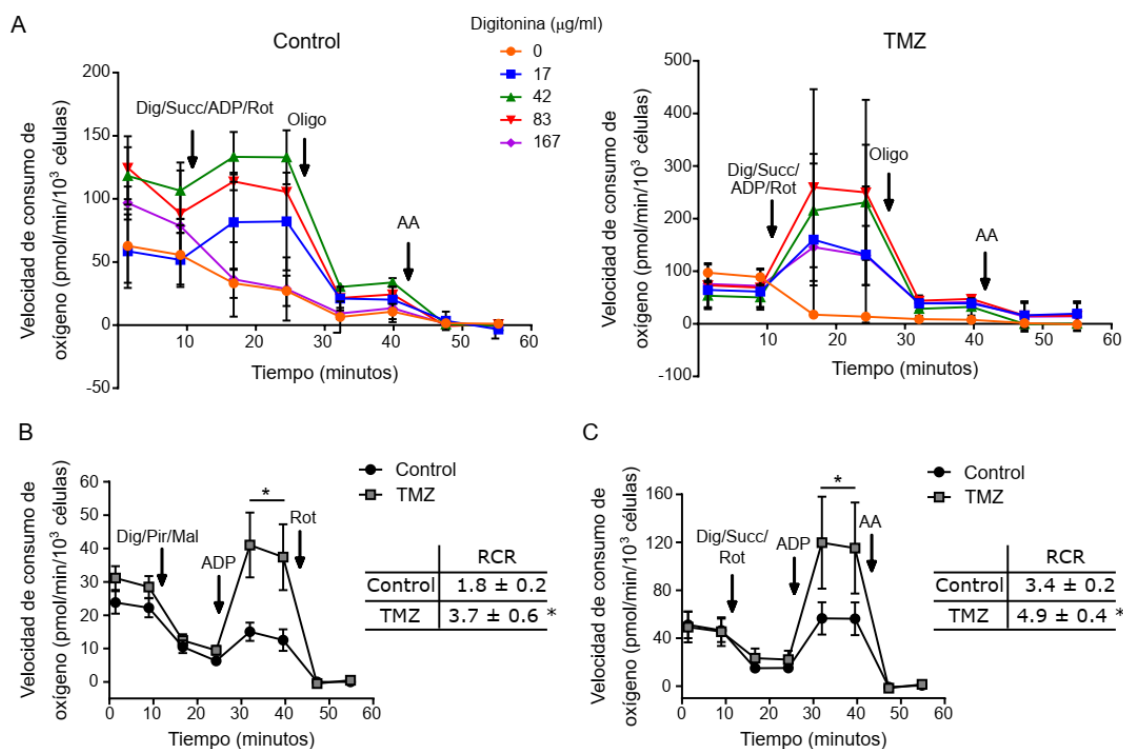


Figura 14. Función mitocondrial en células permeabilizadas. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μM) o DMSO (Control) y se analizó la función mitocondrial en células permeabilizadas. **A:** Puesta a punto de la permeabilización de la membrana plasmática con diferentes concentraciones de digitonina ($n = 5$). **B:** Análisis de la respiración dependiente del complejo I. Para esto se agregó en forma secuencial digitonina (42 $\mu\text{g/ml}$)/piruvato (5 mM)/malato (2.5 mM), ADP (1 mM) y rotenona (1 μM). **C:** Análisis de la respiración dependiente del complejo II. Para esto se agregó en forma secuencial digitonina (42 $\mu\text{g/ml}$)/succinato (10 mM)/rotenona (1 μM), ADP (1 mM) y AA (1 μM). Las tablas a la derecha de cada gráfico muestran el valor del RCR para cada condición determinado como el cociente entre el consumo de oxígeno en estado 3 y estado 2. Los resultados representan la media $\pm$ SD ($n = 10-15$). Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. $^*P < 0.05$.

Estos resultados confirman que las mitocondrias de las células senescentes presentan un aumento en el número y/o actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones, así como un mayor acoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa mitocondrial. Serían por tanto más eficientes a la

hora de aprovechar la energía liberada durante la oxidación de sustratos para sintetizar ATP, que las mitocondrias de las células de melanoma control.

iii. Niveles de oxidantes

La mitocondria es el principal organelo productor de especies reactivas del oxígeno en la célula [176]. Por esto, se midieron los niveles intracelulares de especies oxidantes mediante citometría de flujo utilizando la sonda DCFH-DA, que al reaccionar con oxidantes intracelulares forma la molécula fluorescente DCF [379]. Como se observa en las **Figuras 15A y B** las células senescentes presentaron un aumento significativo en los niveles de DCF intracelular en comparación con las células control. La incubación de las células con el desacoplante FCCP, previo al agregado de DCFH-DA, inhibió la oxidación de la sonda en ambas condiciones. Estos resultados indican que la inducción de la senescencia en células de melanoma se acompaña de un aumento en los niveles de especies oxidantes, el cual podría deberse al aumento en la actividad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

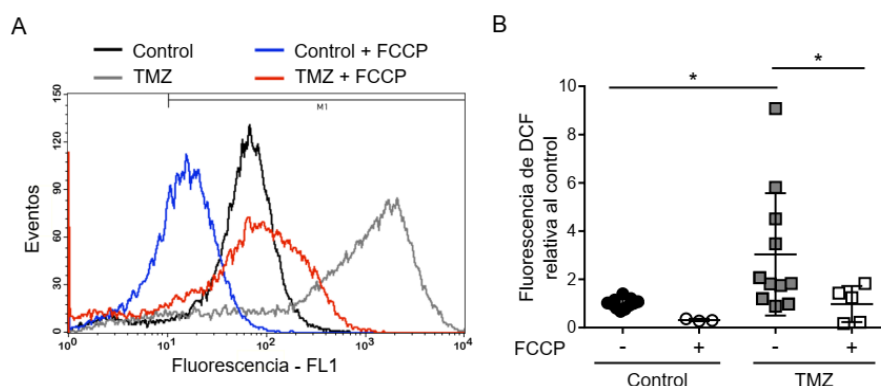


Figura 15. Niveles de oxidantes intracelulares. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control). Las células se incubaron con la sonda DCFH-DA (10 μ M) en ausencia y presencia de FCCP (2.5 μ M) y se analizaron mediante citometría de flujo. **A:** Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de DCF. **B:** Media geométrica de la intensidad de fluorescencia para las diferentes condiciones, obtenida a partir de los histogramas en (A) ($n = 3-11$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. * $P < 0.05$.

iv. Inducción de senescencia y función mitocondrial células de melanoma metastásicas

Las líneas celulares B16-F1 y B16-F10 derivan de la línea madre B16. Fueron seleccionadas a partir de colonias pulmonares formadas *in vivo* después de uno (B16-F1) o diez (B16-F10) ciclos de inoculación en ratones, respectivamente [380,381]. Las células B16-F10 presentan una capacidad de generar metástasis pulmonar mayor que las células B16-F1 [382], debido principalmente a diferencias en los carbohidratos de la superficie celular [383]. Con el fin de evaluar la inducción de la senescencia en células con diferente capacidad metastásica, se expuso a las células B16-F10 a TMZ, en las mismas condiciones que utilizamos para las células

B16-F1. Como se observa en la **Figura 16A**, el tratamiento con TMZ aumentó la fosforilación de ATM y su sustrato p53, indicando la activación de la respuesta al daño al ADN y produciendo un aumento en los niveles de p21. También condujo a una disminución en el crecimiento del cultivo, sugerente de una inhibición en la proliferación celular (**Figura 16B**).

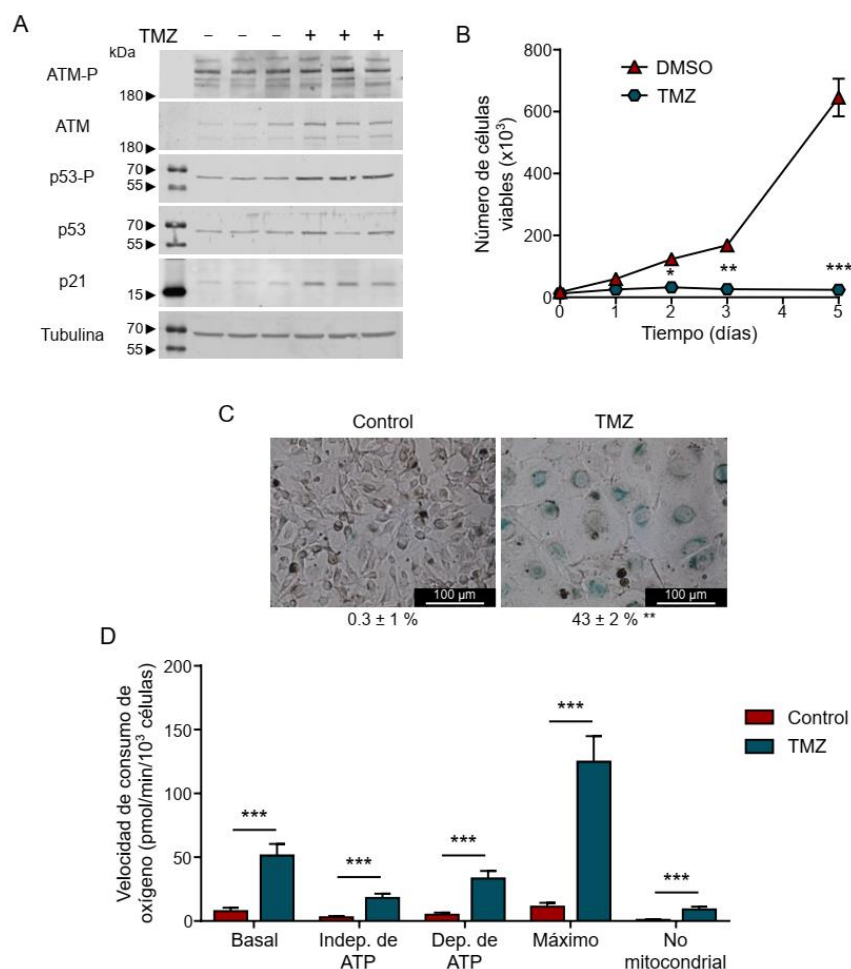


Figura 16. Inducción de senescencia y función mitocondrial en células con mayor capacidad metastásica. Las células B16-F10 se expusieron dos veces a TMZ (200 μ M) o DMSO durante 5 horas con un intervalo de 24 horas. A los 4 días de la última exposición se realizaron los siguientes experimentos **A**: Western blots con anticuerpos para ATM-P (Ser1981), ATM, p53-P (Ser15), p53, p21 y tubulina como control de carga (n = 3). **B**: Curvas de crecimiento del cultivo, discriminando las células viables por exclusión de Trypan blue (n = 4). **C**: Actividad SA- β -gal. Se muestran imágenes representativas del ensayo y los porcentajes de células positivas en cada condición (n = 3). **D**: Evaluación de la velocidad de consumo de oxígeno. Se muestran los parámetros respiratorios obtenidos como se describe en la Figura 13 (n = 10). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. * P < 0.05, ** P < 0.001, *** P < 0.0001.

Tras la exposición a TMZ también se observó un aumento de en la actividad SA- β -gal con respecto a las células tratadas con el vehículo (**Figura 16C**). Por último, se evaluó la función mitocondrial y al igual que las células B16-F1, en las células B16-F10 se observó un aumento los parámetros respiratorios tras el tratamiento con TMZ (**Figura 16D**).

v. Exposición a vemurafenib y función mitocondrial en células BRAF V600E

Con el objetivo de trasladar nuestras observaciones a otros modelos de senescencia se expusieron células de melanoma metastásico humano (SK-MEL-28) a vemurafenib, un inhibidor de B-RAF V600E [42]. Estos experimentos se basaron en un reporte realizado por Haferkamp et al., que indicaba que el tratamiento de células de melanoma humano mutantes para B-RAF (incluyendo las células SK-MEL-28) con vemurafenib inducía la senescencia celular [160].

Sin embargo, al evaluar la actividad SA- β -gal no se observaron cambios significativos entre las células tratadas con vemurafenib y la condición control (**Figura 17A**). De hecho, en el cultivo de células control se observó un alto porcentaje de células positivas para la tinción. Esto estaría de acuerdo con reportes previos, que indican que células con la mutación B-RAF V600E presentan mayor actividad SA- β -gal que las células con B-RAF salvaje [384]. Luego se evaluó el impacto del vemurafenib en el crecimiento del cultivo y se observó que la exposición a la droga, en concentraciones similares a las reportadas por Haferkamp et al. (2 y 5 μ M), disminuía el número de células viables en el cultivo a partir del quinto día del inicio del tratamiento (**Figura 17B**). Estos resultados, sugirieron que la disminución en el número de células quizás se debía a un aumento en la muerte celular, más que al cese de la proliferación asociado a la senescencia. Para confirmar estas observaciones, se evaluó la viabilidad celular por citometría de flujo con ioduro de propidio. Este compuesto, al igual que al Trypan Blue, se acumula en el núcleo de las células dañadas o muertas, pero no entra a las células vivas que tienen la membrana intacta. En el histograma de la **Figura 17C** se observan claramente dos regiones: la región M1 de menor intensidad de fluorescencia (células vivas) y la región M2 de mayor intensidad de fluorescencia (células muertas). Se observó una disminución en el porcentaje de células en M1 y un aumento en el porcentaje de células en M2 luego del tratamiento con vemurafenib (**Figura 17D**). Estos resultados confirman que esta droga produce una disminución en la viabilidad celular de las células SK-MEL-28. Al evaluar el efecto del vemurafenib sobre la función mitocondrial se observó una importante disminución de todos los parámetros respiratorios, en las células tratadas con vemurafenib con respecto a las células tratadas con vehículo (**Figura 17E**).

En resumen, no se logró inducir la senescencia en células de melanoma tratadas con vemurafenib; de hecho, observamos una disminución en la viabilidad celular y una caída en la función mitocondrial de las células remanentes en el cultivo luego de la exposición a la droga. Resultados similares han sido reportados en células de melanoma SK-MEL-19 con la mutación B-RAF V600E expuestas a vemurafenib, en las cuales se observó la activación de la vía intrínseca de la apoptosis [385].

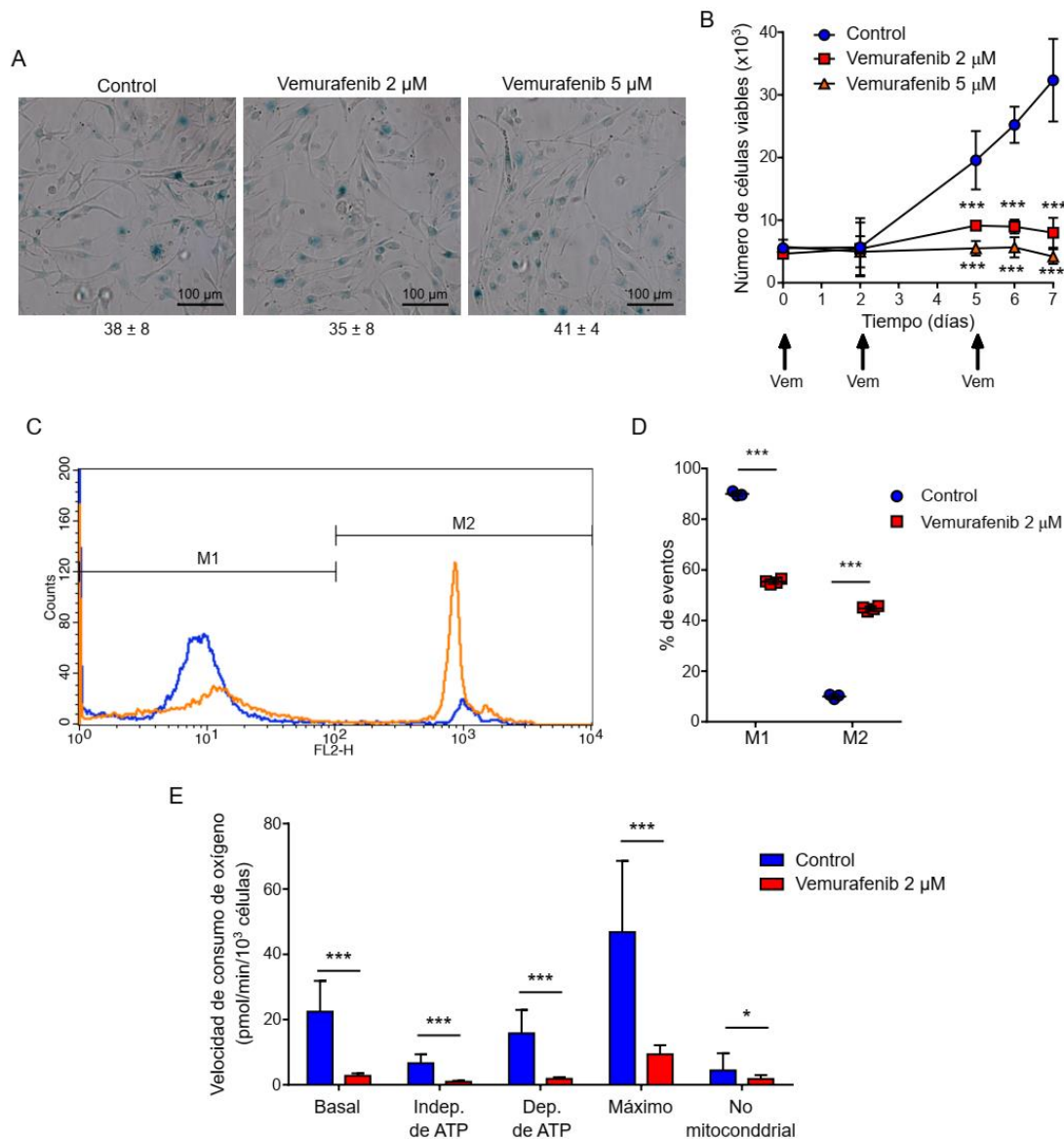


Figura 17. Exposición de células de melanoma humano con la mutación BRAFV600E a vemurafenib. Las células SK-MEL-28 se expusieron a vemurafenib o DMSO (Control) y se evaluó la inducción de la senescencia, la viabilidad celular y la función mitocondrial. **A:** Actividad SA-β-gal 10 días después del primer tratamiento con vemurafenib 2 o 5 μM. Debajo de cada imagen se muestra el porcentaje de células positivas (n = 3). **B:** Curvas de crecimiento por conteo de células en un contador de partículas Beckman (n = 4). Las flechas indican los días en que se cambió el medio con la droga. **C:** Viabilidad celular evaluada mediante citometría de flujo con ioduro de propidio (10 μM) 10 días después del primer tratamiento con vemurafenib 2 μM. En los histogramas se muestran dos poblaciones: M1 de menor intensidad de fluorescencia (células vivas) y M2 de mayor intensidad de fluorescencia (células muertas). **D:** Porcentaje de células (eventos) en M1 y M2 obtenido a partir de histogramas como el que se muestra en **C** (n = 3). **E:** Parámetros respiratorios obtenidos 10 días después del primer tratamiento con vemurafenib 2 μM (n = 10). Los resultados representan la media ± SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. **P* < 0.05, ****P* < 0.0001.

III. Bases moleculares de los cambios en la función mitocondrial de las células de melanoma senescentes

Con el fin de dilucidar los eventos detrás del aumento en la función mitocondrial en las células melanoma senescentes, evaluamos la masa y la forma mitocondrial, así como las vías que regulan estos procesos. También caracterizamos el proteoma mitocondrial de células senescentes y no senescentes.

A. Masa y biogénesis mitocondrial

i. Masa mitocondrial

Se comenzó evaluando la masa mitocondrial de las células senescentes y no senescentes. Para esto se utilizó la sonda fluorescente MitoTracker Green FM, que se acumula en las mitocondrias de las células vivas independientemente del potencial de membrana [386]. Se incubaron las células con la sonda y se determinó la intensidad de fluorescencia de la población mediante citometría de flujo. Las células senescentes presentaron una mayor intensidad de fluorescencia que las células control (**Figura 18A y B**), indicativo de un aumento en el contenido mitocondrial por célula.

Para confirmar esta observación se midió la relación ADN_{mit}/ADN_{nuc} [387] y la actividad de la citrato sintasa, una enzima constitutiva presente en la matriz mitocondrial de las células [388]. Las células senescentes presentaron un aumento de tres veces en ambos parámetros con respecto a las células control (**Figura 18C y D**). Sin embargo, cuando se normalizó la actividad citrato sintasa considerando la masa (mg) de proteínas por célula no se encontraron diferencias entre las dos condiciones (**Figura 18E**). Tampoco se observaron diferencias en los niveles de varios complejos mitocondriales evaluados por medio de Western blots con anticuerpos específicos (**Figura 18F**), utilizando tubulina como control de carga (**Figura 18G**). Estos resultados indican que el aumento en la masa mitocondrial en las células senescentes se acompaña al aumento observado en la masa celular en las células senescentes (**Figura 9F**).

Debemos mencionar que al realizar estos ensayos tuvimos un resultado inesperado. A diferencia de lo observado para la mayoría de las subunidades evaluadas y para la citrato sintasa, los niveles de la subunidad II del complejo mitocondrial IV (codificada por el genoma mitocondrial [389]) disminuyeron en las células senescentes. Esto podría deberse a diferencias en la degradación de la proteína [390], o en la transcripción o traducción del ADN_{mit} .

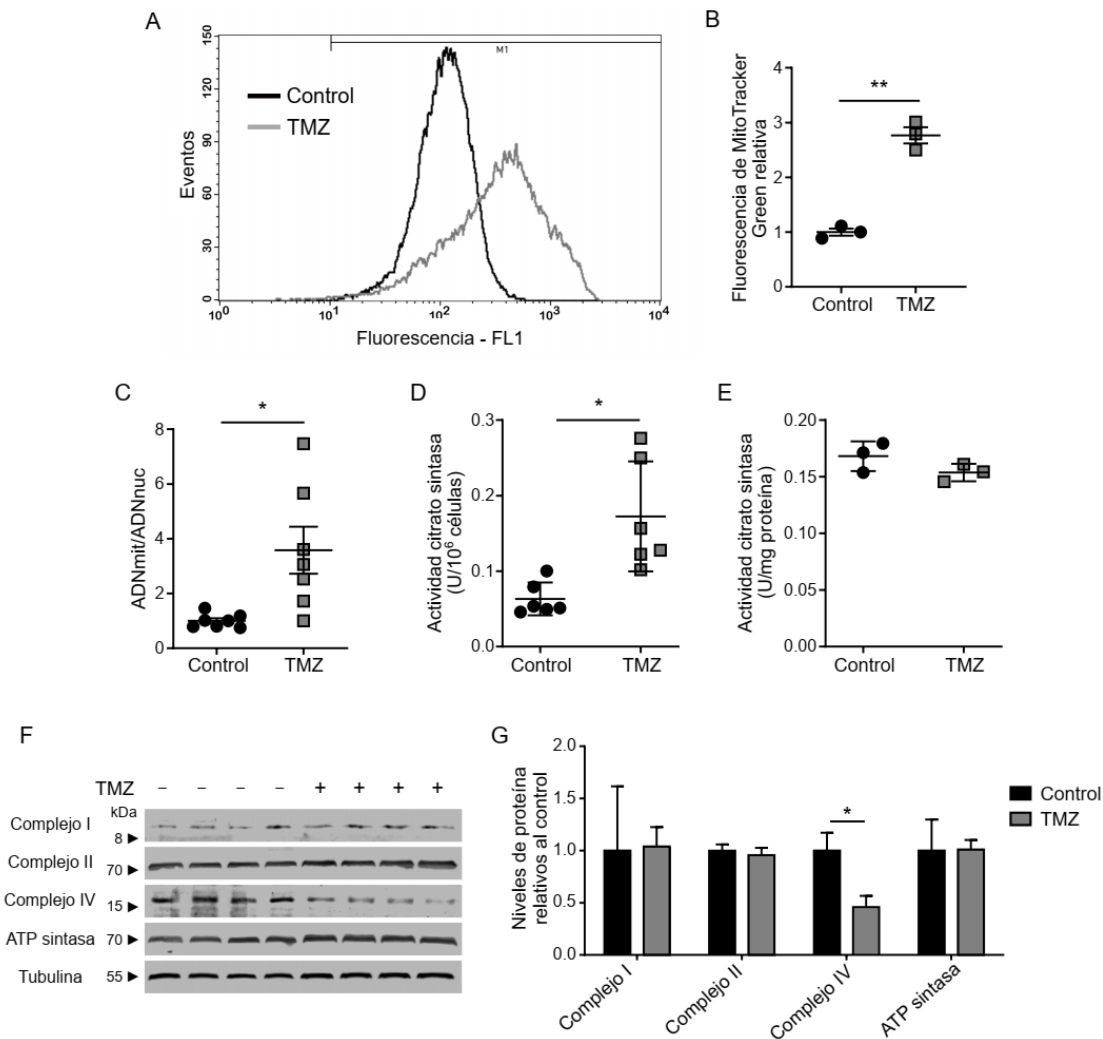


Figura 18. Masa mitocondrial. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control). Se emplearon diferentes aproximaciones experimentales para evaluar la masa mitocondrial. **A:** Las células se incubaron con MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de la sonda. **B:** Cuantificación de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia de MitoTracker Green FM (n = 3). **C:** Relación ADNmit/ADNnuc determinada mediante qPCR (n = 7). **D y E:** Actividad enzimática citrato sintasa, los valores se normalizaron por 10⁶ células (n = 6) (**D**) o por mg de proteína (n = 3) (**E**). **F:** Western blots con anticuerpos para subunidades de los complejos I, II, IV de la cadena respiratoria, ATP sintasa y tubulina como control de carga (n = 4). **G:** Cuantificación de los niveles de las proteínas de los Western blots presentes en el panel (**E**), normalizados por los niveles de tubulina (n = 7-8). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (**B**, **C** y **G**) los resultados se expresan relativos a la condición control. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

ii. Biogénesis mitocondrial

Para corroborar si el aumento en la masa mitocondrial se debía a un aumento en la biogénesis, evaluamos los niveles de PGC-1 α , uno de los reguladores principales de la biogénesis mitocondrial. Como se observa en la **Figura 19A**, las células senescentes presentaron un aumento significativo en la expresión de PGC-1 α . Además, se observó un aumento significativo en los niveles de TFAM (**Figura 19B y C**), un factor que participa en la

formación de nucleoides, el mantenimiento y transcripción del ADN mitocondrial [391]; cuya expresión se encuentra regulada por PGC-1 α y NRF-1 [392,393].

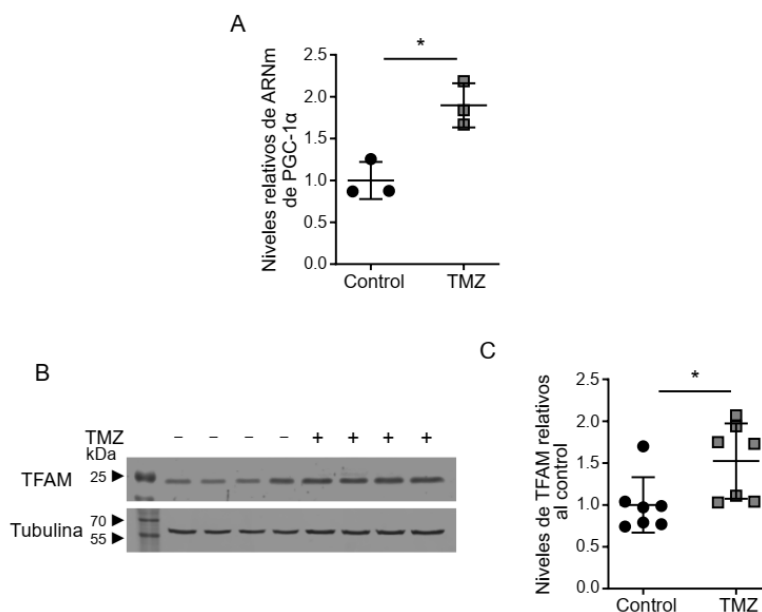


Figura 19. Biogénesis mitocondrial. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control) y se llevaron a cabo los siguientes experimentos: **A:** RT-qPCR con cebadores para PGC-1 α (n = 3). **B:** Western blots con anticuerpos para TFAM y tubulina como control de carga. **C:** Cuantificación de los niveles de TFAM normalizados por los niveles de tubulina (n = 7). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (**A** y **C**) los resultados se expresan relativos a la condición control. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. * P < 0.05.

B. Proteoma mitocondrial

Luego se analizó el proteoma mitocondrial de las células de melanoma expuestas a TMZ o al vehículo. Para esto, se realizó un fraccionamiento subcelular y se obtuvieron fracciones enriquecidas en mitocondrias. Se verificó el enriquecimiento mediante Western blot con anticuerpos contra la subunidad A de la succinato deshidrogenasa (SDHA, proteína mitocondrial) y la tubulina (proteína del citoplasma) (**Figuras 20A y B**).

Las proteínas de la fracción mitocondrial se separaron mediante electroforesis en poliacrilamida y fueron sometidas a digestión con tripsina. Los péptidos se separaron por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y analizaron por técnicas de espectrometría de masa.

Con este abordaje se identificaron 1285 proteínas presentes en las 4 réplicas control y 1462 proteínas presentes en las 4 réplicas tratadas con TMZ. Para identificar las proteínas mitocondriales se utilizó el inventario de genes mitocondriales de mamíferos MitoCarta 2.0, que contiene 1158 genes de proteínas mitocondriales de ratón [394]. De este análisis surgió que un 28 y un 34% de las proteínas de las fracciones de células control y senescentes respectivamente, eran proteínas mitocondriales.

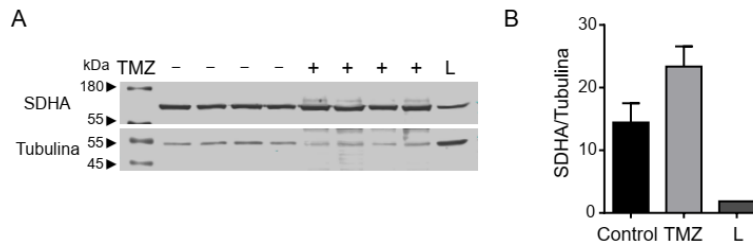


Figura 20. Fraccionamiento subcelular. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control) y se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener una fracción enriquecida en mitocondrias. **A:** Western blots con anticuerpos para SDHA como marcador mitocondrial y tubulina como marcador citosólico. **B:** Cuantificación de la relación SDHA/Tubulina ($n = 1-4$), en las fracciones mitocondriales de células Control y expuestas a TMZ y en el lisado celular (L), que se muestra en (A). Los resultados representan la media $\pm$ SD.

Se detectaron 16 proteínas presentes exclusivamente en células control, 53 presentes solo en células senescentes y 996 en ambas condiciones (**Figura 21A, Anexo Tablas 4 y 5**).

Luego se analizaron las proteínas encontradas en ambas condiciones y se encontraron 517 proteínas con niveles significativamente diferentes entre las células control y las células tratadas con TMZ (**Figura 21B, Anexo Tabla 6**). En la **Figura 21B** se muestra un gráfico de volcán y se indican con puntos grandes las diez proteínas con mayor y menor relación TMZ/Control. En las células tratadas con TMZ dentro de las proteínas más abundantes se encontraron la 4-aminobutirato aminotransferasa (ABAT), conocida por su rol en el catabolismo del neurotransmisor γ -aminobutirato (GABA) y las enzimas delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (ALDH4A1), isobutiril-CoA deshidrogenasa (ACAD8) y metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (ALDH6A1) que participan en el catabolismo de aminoácidos y pirimidinas, respectivamente [395–397]. También se destacan la enzima carbonil reductasa 4 (CBR4) que participa en la síntesis mitocondrial de ácidos grasos [398]; la peptidil-prolil cis-trans isomerasa F (PPIF) que asiste en el plegamiento de proteínas [399,400].

Vale la pena desatacar que en las células tratadas con TMZ también se evidenció un aumento en varias subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones (**Anexo Tabla 6**), resultado que estaría de acuerdo con el aumento en la respiración mitocondrial observado tras la inducción de la senescencia (**Figura 13**).

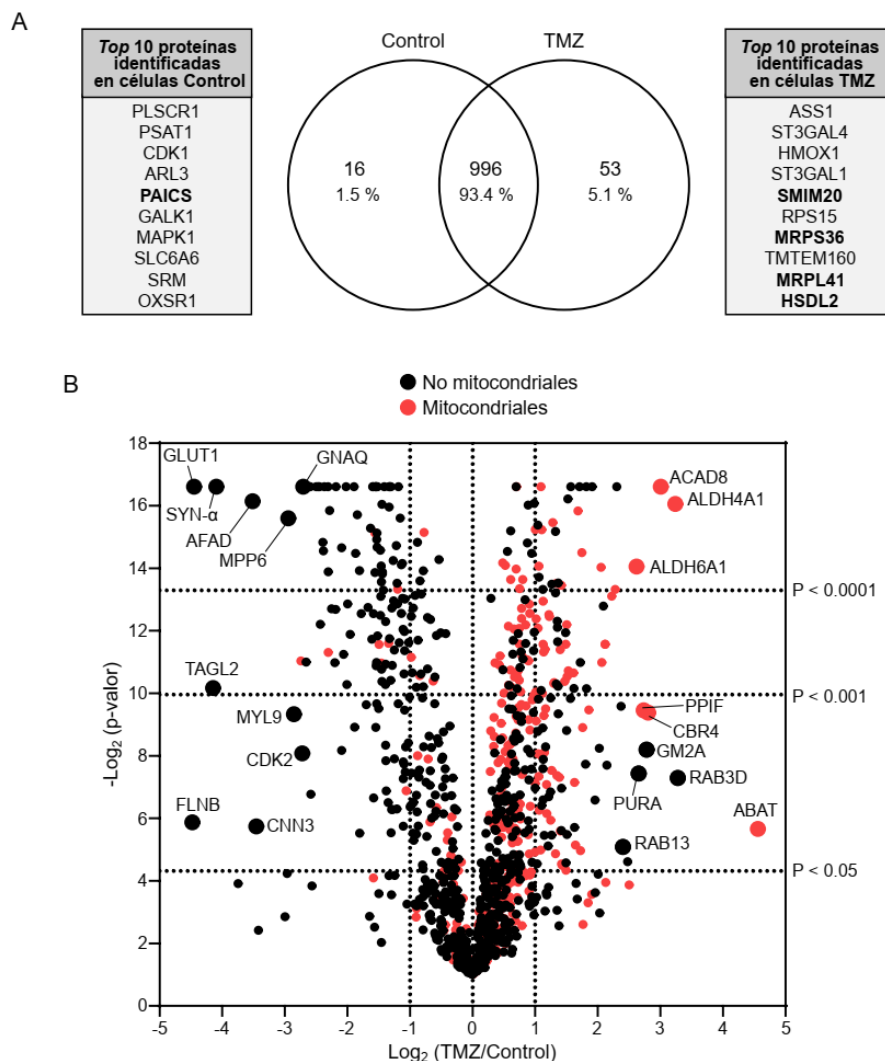


Figura 21. Proteoma de las fracciones mitocondriales. Las fracciones enriquecidas en mitocondrias se analizaron mediante espectrometría de masa. **A:** Diagrama de Venn con las proteínas identificadas en células Control (10 proteínas más abundantes), células expuestas a TMZ (10 proteínas más abundantes) y su intersección. Se destacan en negrita las proteínas que fueron identificadas como proteínas mitocondriales empleando la base de datos de MitoCarta 2.0. **B:** Gráfico de volcán de las proteínas presentes en las fracciones mitocondriales. Se destacan en rojo las proteínas que se encuentran en la base de datos de MitoCarta 2.0. Cada punto representa una proteína identificada en al menos 3 réplicas de cada condición con un cambio relativo ≥ 2 entre la condición Control y TMZ.

Luego se realizó un análisis diferencial de enriquecimiento de vías empleando las bases de datos *Gene Ontology*. En la **Figura 22A** se muestran las vías o procesos estadísticamente significativos dentro de las categorías Función molecular, Componente celular y Procesos biológicos que se identificaron en las fracciones enriquecidas de las células control y se observa que se enriquecieron de forma significativa procesos de señalización celular y transporte que involucran al citoesqueleto (**Figura 22A, Anexo Tabla 7-9**). Por otro lado, en las células tratadas con TMZ se encuentran enriquecidas de forma significativa vías vinculadas a procesos mitocondriales y metabólicos (**Figura 22B, Anexo Tablas 7-9**).

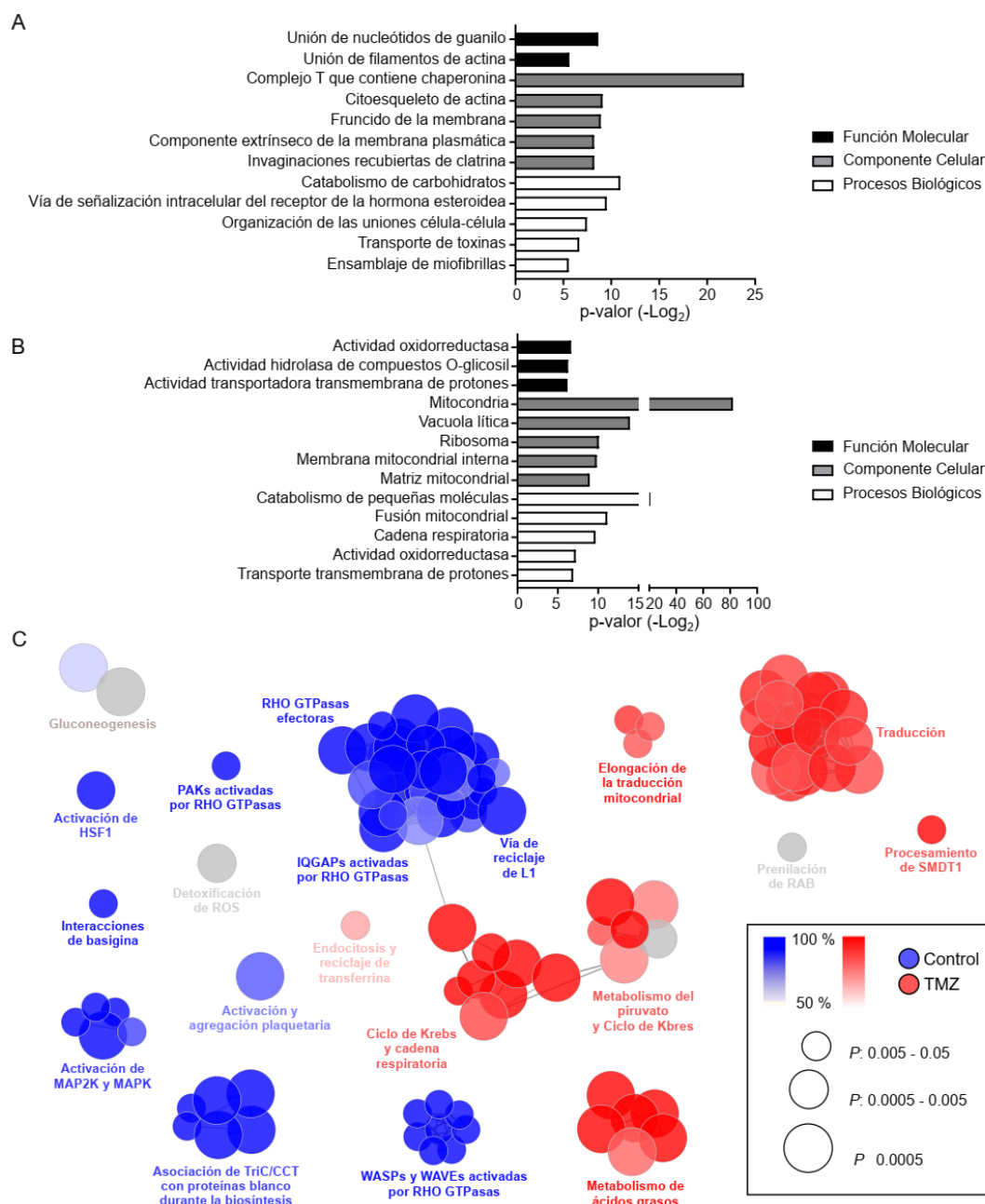


Figura 22. Enriquecimiento de vías y procesos del proteoma de las fracciones enriquecidas en mitocondrias de células control y tratadas con TMZ. **A:** Análisis en *ClueGO* de enriquecimiento de las Funciones Moleculares, Componentes Celulares y Procesos Biológicos utilizando la base de datos de *GeneOntology* para todas las proteínas presentes en la fracción mitocondrial obtenida de las células control (**A**) y células tratadas con TMZ (**B**). Cada barra representa un término y cada color un grupo (el detalle de los términos y los genes de las proteínas que los componen se encuentra en el **Anexo Tablas 7-9**). **C:** Análisis en *ClueGO* de vías enriquecidas en la condición Control (azul) o tratada con TMZ (rojo) utilizando la base de datos de *Reactome*. Cada conjunto de círculos representa una vía y dentro de cada vía aparecen los términos representados por un círculo (el detalle de los términos y los genes de las proteínas que los componen se encuentra en el **Anexo Tabla 10**). En todos los análisis se incluyeron las proteínas identificadas únicamente en cada condición (**Anexo Tablas 4 y 5**) y las proteínas expresadas mayoritariamente en cada condición (TMZ/Control > 1.2, Control/TMZ > 1.2, $P < 0.05$, **Anexo Tabla 6**). El tono del color (oscuro o claro) indica el porcentaje de genes en cada término y el tamaño de los círculos el rango del valor P para cada término.

Por último, se realizó un análisis de enriquecimiento diferencial con la base de datos del *Reactome* y se observó que las vías enriquecidas en las células tratadas con TMZ correspondían con vías catabólicas (**Figura 22B, Anexo Tabla 10**). Entre las vías identificadas se encuentran la β -oxidación mitocondrial de ácidos grasos, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena respiratoria. Además, se encontró un enriquecimiento en componentes de la traducción mitocondrial de proteínas (**Figura 22B, Anexo Tabla 10**). Estos resultados están de acuerdo con el aumento en la función y en la masa mitocondrial observado tras la inducción de la senescencia con TMZ (**Figuras 13, 18 y 19**). Por otra parte, se encontró un enriquecimiento en la vía *Procesamiento de SMDT1* en las células tratadas con TMZ (**Figura 22B, Anexo Tabla 10**). Esta vía regula el ensamblaje del complejo transportador de calcio mitocondrial (MCU) [401], responsable de la captación de calcio por parte de la mitocondria [255].

C. Dinámica mitocondrial

i. Morfología mitocondrial

Para evaluar la forma de las mitocondrias se incubaron las células con la sonda MitoTracker Green FM y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia. Como se puede apreciar en la **Figura 23A** las células control presentaron, en su mayoría, mitocondrias cortas y redondeadas. Mientras que las células senescentes presentaron mitocondrias más largas e interconectadas. Al evaluar el tamaño de las mitocondrias presentes en la periferia de las células se observó que las células senescentes presentaban mitocondrias con un largo promedio significativamente mayor al de las células control (**Figura 23A**).

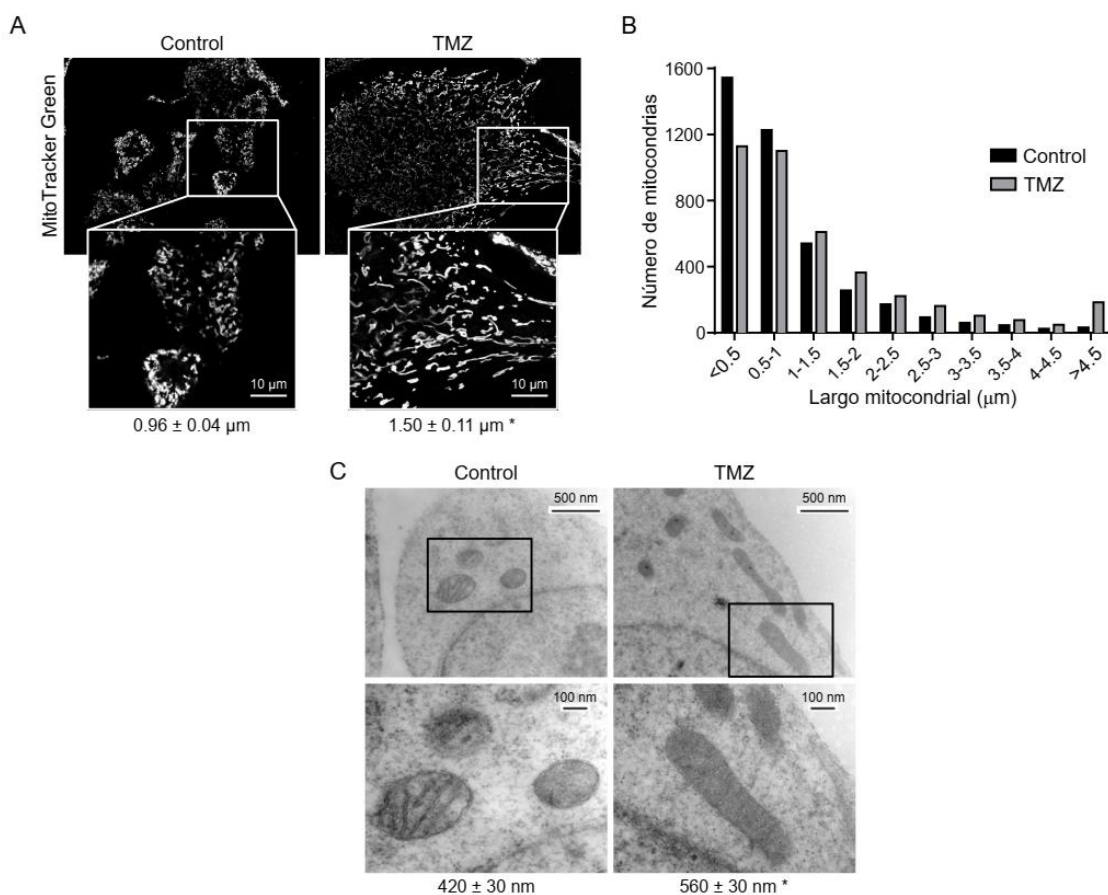


Figura 23. Morfología mitocondrial. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control) y se evaluó el tamaño de las mitocondrias **A**: Las células se incubaron con MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (630X). Los recuadros grises se muestran debajo magnificados. Debajo de cada imagen se muestra la media de largo mitocondrial (n = 6). **B**: Análisis de la distribución de la frecuencia del largo mitocondrial con datos obtenidos de imágenes como se describe en (A). Las diferencias entre las distribuciones se analizaron mediante tablas de contingencia y test de Chi cuadrado ($P < 0.0001$). **C**: Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión obtenidas a 20000X (arriba) y a 50000X (abajo). Los recuadros negros se muestran debajo magnificados. Debajo de cada imagen se muestra la media del largo mitocondrial (n = 3). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. * $P < 0.05$.

Además, mediante un análisis de distribución de la frecuencia se encontró un mayor número de mitocondrias pequeñas ($< 0.5 \mu$ m) en las células control, mientras que las mitocondrias más largas ($> 4.5 \mu$ m) eran más abundantes en las células senescentes (**Figura 23B**). Se obtuvieron resultados similares al analizar las células mediante microscopía electrónica de transmisión, que confirmaron el aumento en el largo de las mitocondrias en las células senescentes con respecto a las células control (**Figura 23C**).

ii. Proteínas de dinámica mitocondrial

Para caracterizar los eventos moleculares responsables de los cambios en la morfología mitocondrial observados tras la inducción de la senescencia, se analizaron los niveles de las proteínas involucradas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial.

En cuanto a las proteínas de fusión mitocondrial, en las células tratadas con TMZ se observó un aumento en los niveles de las mitofusinas, MFN1 y MFN2, pero no se detectaron cambios en los niveles de OPA1 (**Figura 24A y B**). Mediante RT-qPCR se confirmó además un aumento en la expresión de los genes de *Mfn1* y *Mfn2* (**Figura 24C**), que sugiere una regulación a nivel de la expresión génica para estas proteínas. En los análisis de proteómica las proteínas MFN1 y MFN2 fueron identificadas únicamente en las células tratadas con TMZ (**Anexo Tabla 5**) y estos Western blots confirman las diferencias, en los niveles de proteínas de fusión, entre las condiciones.

En cuanto a las proteínas de fisión mitocondrial, los niveles de DRP1 se mantuvieron iguales en las células control y las tratadas con TMZ, pero se observó una disminución en los niveles de FIS1 y MFF (**Figura 24A y B**). MFF presenta varias isoformas y modificaciones post-traduccionales que podrían explicar el bandeo observado en la figura [272,402–405]. Por otra parte, también se observó un aumento en la expresión de los genes de *Fis1* y *Mff* (**Figura 24C**). Dado que los niveles de proteínas de FIS1 y MFF se encuentran disminuidos en las células senescentes, estos resultados sugieren que la regulación de estas dos proteínas podría ocurrir a nivel post-traduccional.

Luego se evaluó la localización de DRP1, ya que es necesario que esta proteína se transloque a la mitocondria para promover la fisión de las mismas [228]. En las células senescentes se observó una disminución en la co-localización de DRP1 con la subunidad A de la succinato deshidrogenasa (SDHA), un proteína mitocondrial (**Figura 24D**); con una disminución pequeña pero significativa del coeficiente de correlación de Pearson (Control 0.4 ± 0.02 , TMZ 0.34 ± 0.02 , $P = 0.02$) [341]. Para confirmar la migración de DRP1 a la superficie mitocondrial se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular. Sin embargo, al evaluar los niveles de DRP1 en las fracciones enriquecidas en citoplasma y mitocondria no se observaron diferencias significativas entre las células control y las células senescentes (**Figura 24E**).

En suma, estos resultados sugieren que el aumento en el largo de las mitocondrias, observado en las células senescentes, se debería principalmente a un aumento en los eventos de fusión mediados por MFN1 y MFN2.

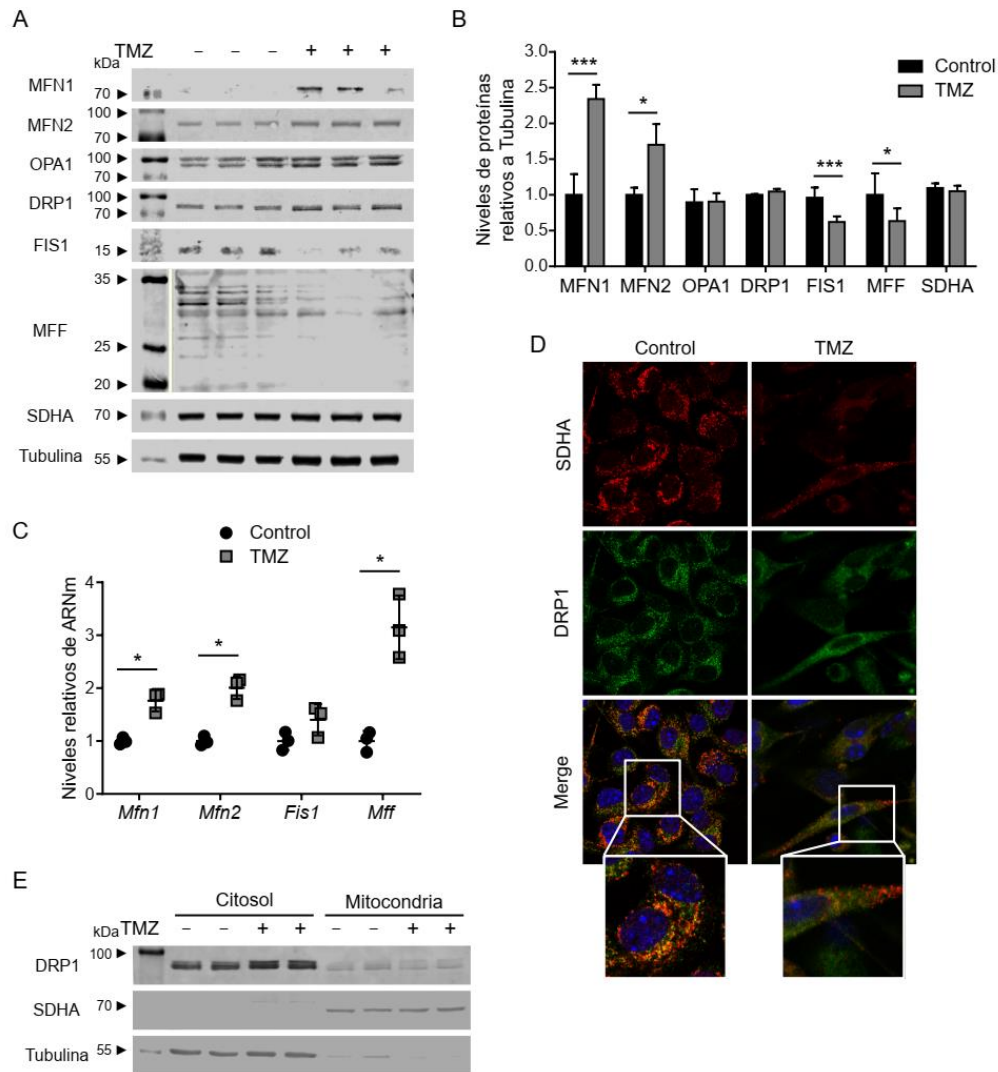


Figura 24. Proteínas de dinámica mitocondrial. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control) y se llevaron a cabo los siguientes ensayos: **A:** Western blots con anticuerpos para MFN1, MFN2, OPA1, DRP1, FIS1, MFF, SDHA y tubulina como control de carga. **B:** Cuantificación de los niveles de las proteínas a partir de Western blots como el que se muestra en (A) normalizados contra los niveles de tubulina (n = 3-10). **C:** RT-qPCR para la expresión de *Mfn1*, *Mfn2*, *Fis1* y *Mff* (n = 3). **D:** Imágenes representativas de la co-localización de SDHA (rojo) y DRP1 (verde), obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia (630X). DAPI (azul) marca los núcleos. Los recuadros blancos se muestran debajo magnificados (n = 4). **E:** Western blots con anticuerpos para DRP1, SHDA y tubulina en fracciones subcelulares enriquecidas en citosol o mitocondrias. Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (B y C) los resultados se expresan relativos a la condición control. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

D. Análisis de poblaciones celulares resultantes de la exposición a TMZ

Luego del tratamiento con TMZ entre el 60-70% del cultivo se tornó senescente (Figura 8 y 9). Sin embargo, un porcentaje alto de células 30-40%, resistió el tratamiento y siguió proliferando. Reportes de otros autores indicaban que las células de glioma resistentes a la TMZ presentaban un aumento en la actividad de la cadena

de transporte de electrones [319]. Por estas razones, decidimos evaluar si el aumento en la función mitocondrial y los cambios en la masa y forma de las mitocondrias se encontraban asociados específicamente a la inducción de la senescencia o si eran consecuencia del tratamiento con TMZ.

Se separaron las células senescentes y no senescentes presentes en el cultivo expuesto a TMZ tomando en cuenta las diferencias de tamaño y complejidad celular (**Figura 9B**). Utilizando un *cell sorter* las células fueron separadas en dos grupos: células de mayor tamaño y con mayor complejidad celular (TMZ (Grandes)) y células más chicas y con menor complejidad celular (TMZ (Chicas)) (**Figura 25A**). Se confirmó el enriquecimiento de células senescentes en la población TMZ (Grandes), midiendo la actividad SA- β -gal (**Figura 25B**).

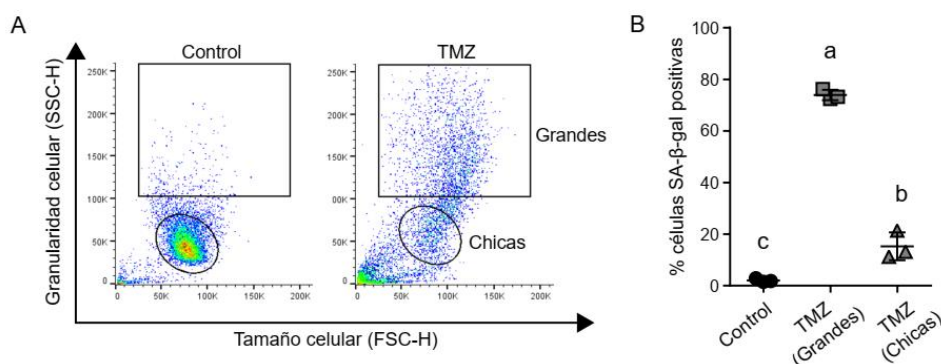


Figura 25. Aislamiento de células senescentes por *sorting* celular. Las células B16-F1 se expusieron a TMZ (200 μ M) o DMSO (Control) y a los 4 días del tratamiento se separaron las células por *sorting* celular teniendo en cuenta las diferencias en el tamaño y complejidad celular. **A:** En los gráficos se muestran las regiones seleccionadas para separar las dos poblaciones de células tratadas con TMZ: células senescentes más grandes (mayor FSC-H) y más complejas (mayor SSC-H) (Grandes) de las células no senescentes de menor tamaño (menor FSC-H) y menos complejas (menor SSC-H) (Chicas). **B:** Actividad SA- β -gal en las distintas poblaciones celulares ($n = 3$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de una vía y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Luego se evaluó la función mitocondrial en las distintas poblaciones. Las células TMZ (Grandes) presentaron mayor velocidad de consumo de oxígeno basal, independiente de ATP, dependiente de ATP, máximo y no mitocondrial, comparado con las células control y con las células TMZ (Chicas) (**Figura 26A**). Además, estas células presentaron un aumento en la eficiencia de acoplamiento, la capacidad de reserva y en el índice de control respiratorio (**Tabla 4**). En la población de células tratadas con TMZ no senescentes (TMZ (Chicas)) también se observó un aumento pequeño pero significativo en la eficiencia de acoplamiento con respecto a las células control. Sin embargo, los parámetros respiratorios no presentaron mayores diferencias con los de las células control. Por lo tanto, las células senescentes serían las responsables del aumento en la función mitocondrial que se observó luego del tratamiento con TMZ.

Mediante microscopía confocal de fluorescencia se evaluó la morfología de las mitocondrias en las diferentes poblaciones celulares. Se observó que el largo de las mitocondrias era mayor en las células de TMZ (Grandes) ($1.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$) que en las células TMZ (Chicas) ($1.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$) y las células control ($0.97 \pm 0.09 \mu\text{m}$) (**Figura**

26B). El análisis de distribución de frecuencia del largo mitocondrial mostró que las mitocondrias más cortas (< 1 μm) eran más abundantes en las células control que en las células tratadas con TMZ, tanto para la población de células TMZ (Grandes) como para la población de células TMZ (Chicas); mientras que las mitocondrias con tamaño > 4.5 μm se encontraron principalmente en las células TMZ (Grandes) (**Figura 26C**). Las células TMZ (Grandes) también presentaron un aumento significativo en los niveles de ARNm de *Mfn1* y *Mfn2* comparado con las células control (**Figura 26D**), que no se observó en las células TMZ (chicas).

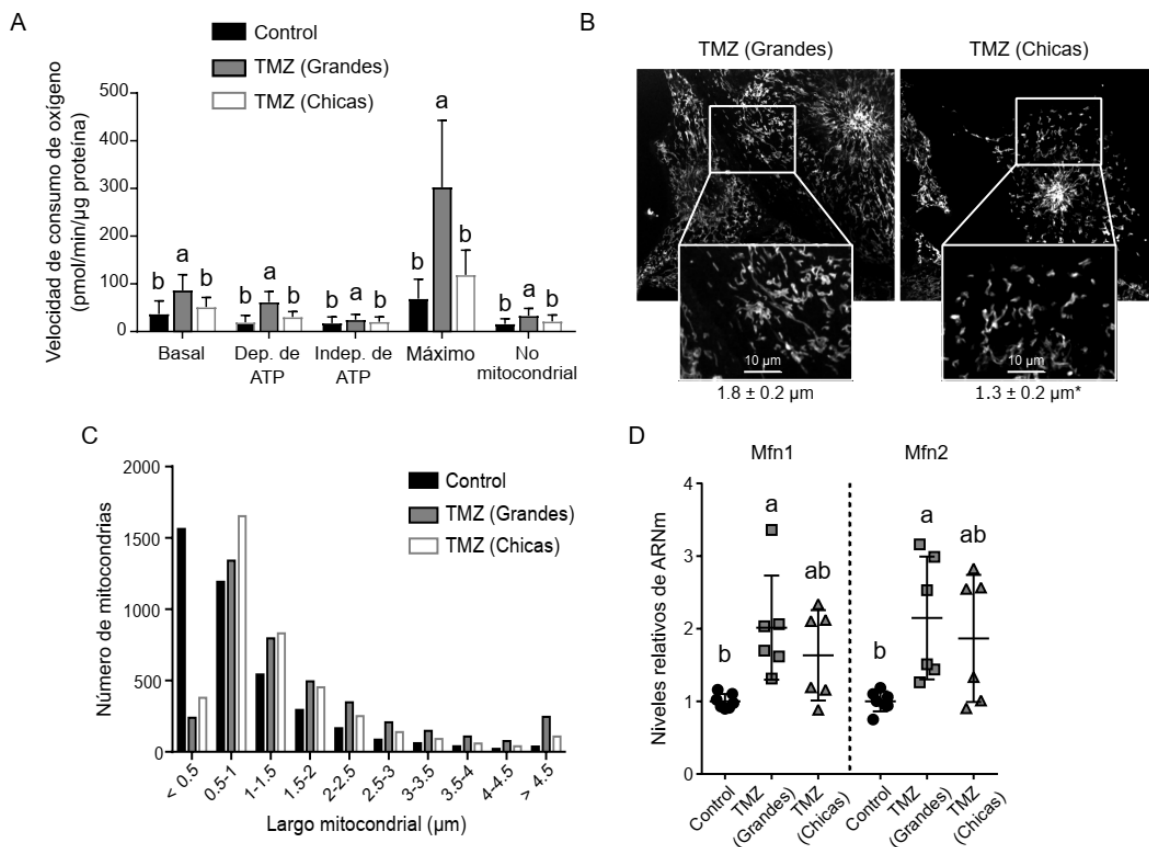


Figura 26. Función y dinámica mitocondrial en células separadas por *sorting* celular. Se evaluó la respiración y dinámica mitocondrial de las células separadas por *sorting* celular. **A:** Evaluación de la velocidad de consumo de oxígeno. Se muestran los parámetros respiratorios obtenidos como se describe en la Figura 13 (n = 18-21). **B:** Las células se incubaron con la sonda MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (630X). Los recuadros grises se muestran magnificados. Debajo de cada imagen se indica la media del largo mitocondrial (n = 3). **C:** Distribución de la frecuencia del largo mitocondrial con datos obtenidos a partir de imágenes como la que se muestra en (**B**). Las diferencias entre las distribuciones se analizaron mediante tablas de contingencia y test de Chi cuadrado ($P < 0.0001$). **D:** RT-qPCR para la expresión de *Mfn1* y *Mfn2*. Los resultados se expresan relativos a la condición control (n = 6). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de una vía y prueba post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras o con un asterisco son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Tabla 4. Índices respiratorios mitocondriales en células senescentes separadas por *sorting* celular. A partir de las medidas de velocidad de consumo de oxígeno de la **Figura 27A** se calcularon los siguientes índices respiratorios: Eficiencia de acoplamiento, capacidad de reserva e índice de control respiratorio. Los resultados muestran la media $\pm$ SD (n = 18-21). Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de una vía y test post hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con letras diferentes son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Índice	Control	TMZ (Grandes)	TMZ (Chicas)
Eficiencia de acoplamiento	0.49 $\pm$ 0.06 ^c	0.71 $\pm$ 0.05 ^a	0.56 $\pm$ 0.03 ^b
Capacidad de reserva	1.5 $\pm$ 0.2 ^b	3.2 $\pm$ 1.0 ^a	1.9 $\pm$ 0.5 ^b
Índice de control respiratorio	3.0 $\pm$ 0.6 ^b	12 $\pm$ 6 ^a	4 $\pm$ 1 ^b

En su conjunto, estos resultados indican que los cambios observados en la función y morfología mitocondrial están asociados específicamente a la inducción de senescencia por TMZ, y no se deben al tratamiento con TMZ per se.

IV. Rol de la mitocondria en la senescencia celular

A. Mitofusinas en la senescencia del melanoma inducida por TMZ

Los importantes cambios en la dinámica mitocondrial que sufrieron las células de melanoma luego del tratamiento con TMZ, nos llevaron a evaluar si algunas de estas alteraciones eran necesarias para la inducción de la senescencia y el fenotipo secretor. Para esto se generaron líneas celulares donde la expresión de los genes *Mfn1* y *Mfn2* se encontraba silenciada. El silenciamiento se realizó transduciendo las células B16-F1 con partículas lentivirales portadores de shARN contra *Mfn1* o *Mfn2*, o un shARN control sin blanco o *scrambled* (*Scr*) y seleccionando con el antibiótico puromicina. Luego se estudió el impacto de la disminución en los niveles de MFN1 y MFN2 sobre la morfología mitocondrial, los parámetros respiratorios y distintos marcadores de senescencia.

i. Mitofusina 2 en la senescencia inducida por TMZ

La transducción de las células con las partículas lentivirales portadoras de shARN contra *Mfn2*, redujo considerablemente los niveles del ARNm (**Figura 27A**) y de proteína MFN2 (**Figura 27B y C**). Para evaluar el impacto del silenciamiento de *Mfn2* en la morfología mitocondrial, se incubaron las células con MitoTracker Green FM y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (**Figura 27D**). La disminución en los niveles de esta mitofusina no afectó significativamente el largo mitocondrial promedio de las células control o tratadas con TMZ (**Figura 27E**). Sin embargo, al analizar la distribución de frecuencia del largo de mitocondrias se observó un aumento en el número de mitocondrias pequeñas ($< 0.5 \mu\text{m}$), en las células con niveles menores

de MFN2. El análisis de distribución de frecuencias también reveló que el silenciamiento de la expresión de *Mfn2* evitó la formación de mitocondrias grandes ($> 4.5 \mu\text{m}$) en respuesta al tratamiento con TMZ (Figura 27F).

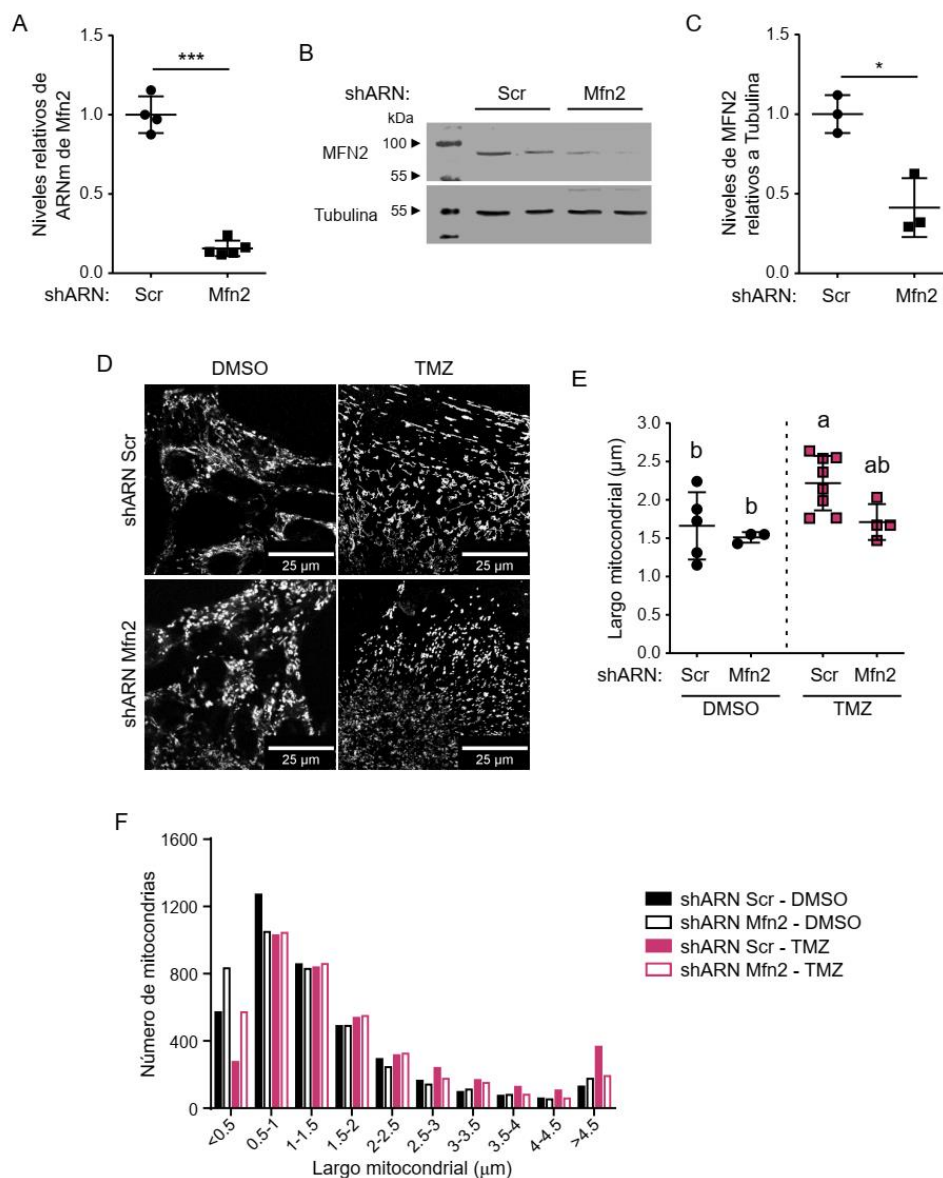


Figura 27. Silenciamiento de *Mfn2*. Las células B16-F1 se incubaron con partículas lentivirales portadoras de plásmidos que codifican al shARN contra *Mfn2* o un shARN control (Scr) y se seleccionó con puromicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ (200 μM). **A:** RT-qPCR para la expresión de *Mfn2*. (n = 4-5). **B:** Western blots con anticuerpos para MFN2 y tubulina como control de carga. **C:** Cuantificación de los niveles de MFN2 normalizados contra los niveles de tubulina. (n = 3). **D:** Las células se incubaron con MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (630X). **E:** El largo de las mitocondrias se determinó a partir de imágenes obtenidas en (D). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.05$), del shARN ($P = 0.058$) e interacción ($P = 0.28$) (n = 3-8). **F:** Distribución de frecuencia del largo mitocondrial de los datos obtenidos en (D). Las diferencias entre las distribuciones se analizaron mediante tablas de contingencia y test de Chi cuadrado ($P < 0.0001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (A) y (C) los resultados se expresan relativos a la condición control (Scr). Las diferencias significativas se determinaron en (A y C) mediante test de Student, $*P < 0.05$, $***P < 0.0001$; y en (E) mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Luego se procedió al estudio de la función mitocondrial en células sin y con la expresión de *Mfn2* silenciada, tratadas con vehículo (DMSO) o TMZ. No se observaron diferencias en los parámetros respiratorios mitocondriales entre las células luego del tratamiento con el DMSO. Indicando que el silenciamiento de *Mfn2* no impacta en la función mitocondrial de la célula no senescente. Sin embargo, en las células tratadas con TMZ sí se encontraron diferencias; observándose una disminución en la respiración basal, respiración dependiente de ATP y respiración máxima (**Figura 28A**) en las células con niveles menores de MFN2, con respecto a las células control (Scr). Estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de la proteína MFN2 estaría involucrado en el aumento en la función mitocondrial observado en las células senescentes.

Al analizar la masa mitocondrial, se observó un aumento del 30% en la masa mitocondrial en las células con la expresión de *Mfn2* silenciada tratadas con TMZ con respecto a las células control (Scr) tratadas con TMZ (**Figura 28B**). Estos resultados reafirman que el silenciamiento de *Mfn2* impacta negativamente en la función mitocondrial; ya que se observa a una caída en la respiración a pesar del aumento en la masa mitocondrial.

A continuación, evaluamos el impacto del silenciamiento de la expresión de *Mfn2* en la inducción de la senescencia. La disminución en los niveles de esta mitofusina no redujo el porcentaje de células SA- β -gal positivas (**Figura 28C**), ni evitó la inhibición de la proliferación en los cultivos celulares tratados con TMZ (**Figura 28D**). Sin embargo, disminuyó significativamente la secreción de IL-6 en las células tratadas con TMZ, sin afectar las células tratadas con DMSO (**Figura 28F**). La caída en la secreción de esta citoquina no se debió a una disminución en la expresión génica (**Figura 28E**). Estos resultados indican que la MFN2 es necesaria para la secreción de factores por las células senescentes.

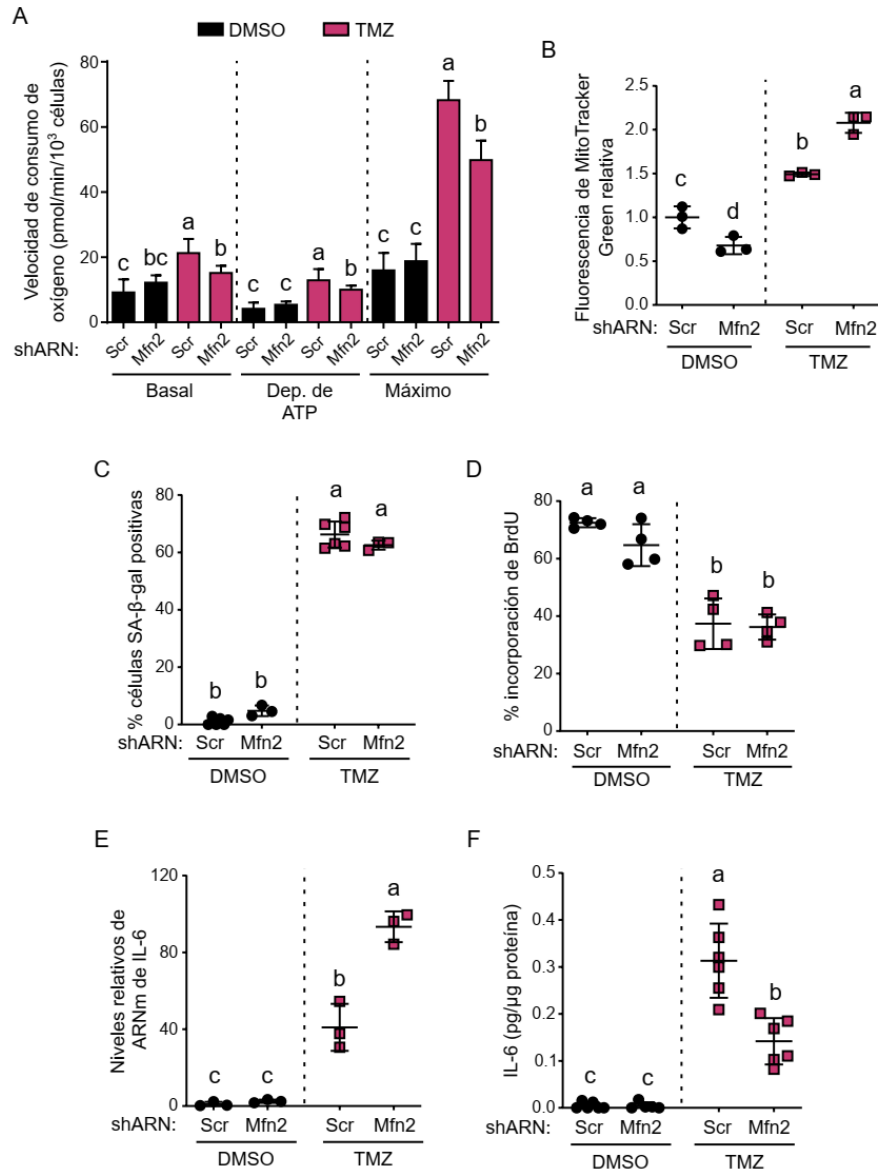


Figura 28. Efecto del silenciamiento de *Mfn2* en las células senescentes. Se incubaron las células B16-F1 con partículas lentivirales portadoras de plásmidos que codifican al shARN contra *Mfn2* o un shARN control (*Scr*), se seleccionó con puromicina, y se trató con DMSO o TMZ (200 μ M). **A:** Parámetros respiratorios obtenidos midiendo la velocidad de consumo de oxígeno ($n = 5$). Se indica el efecto principal del tratamiento, del shARN y la interacción de estos factores, respectivamente para: OCR basal ($P < 0.0001$, $P = 0.24$, $P < 0.05$); OCR dependiente de ATP ($P < 0.0001$, $P = 0.36$, $P < 0.05$); OCR máximo ($P < 0.0001$, $P < 0.05$, $P < 0.0001$). **B:** Las células se incubaron con MitoTracker Green FM 300 nM y se analizaron mediante citometría de flujo, se muestra la media geométrica de la intensidad de fluorescencia. ($n = 3$). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P < 0.05$) e interacción ($P < 0.0001$). **C:** Actividad SA- β -gal ($n = 3-6$). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P = 0.99$) e interacción ($P < 0.05$). **D:** Proliferación celular midiendo el porcentaje de células que incorporaron BrdU al ADN. Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P = 0.17$) e interacción ($P = 0.30$). **E:** RT-qPCR para la expresión de *Il-6*. ($n = 3$). **F:** Niveles de IL-6 determinados por ELISA ($n = 5-6$). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P < 0.001$) e interacción ($P < 0.001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (B) y (E) los resultados se expresan relativos a la condición control Scr - DMSO. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

ii. Mitofusina 1 en la senescencia inducida por TMZ

A continuación, se silenció la expresión de *Mfn1* y también se verificó una disminución significativa en los niveles del ARNm (**Figura 29A**) y de la proteína MFN1 (**Figura 29B**). Al igual a lo visto para MFN2, la caída en los niveles de MFN1 no condujo a una disminución significativa del largo promedio de las mitocondrias en las distintas condiciones (**Figura 29C y D**). Sin embargo, el análisis de la distribución de frecuencias reveló un aumento importante en el número de mitocondrias pequeñas (< 1 μ m) en células con *Mfn1* silenciada tratadas con DMSO con respecto a las células Scr incubadas con el vehículo. Además, la disminución en los niveles de MFN1 evitó la formación de mitocondrias de largas (> 4.5 μ m) en las células tratadas con TMZ (**Figura 29E**).

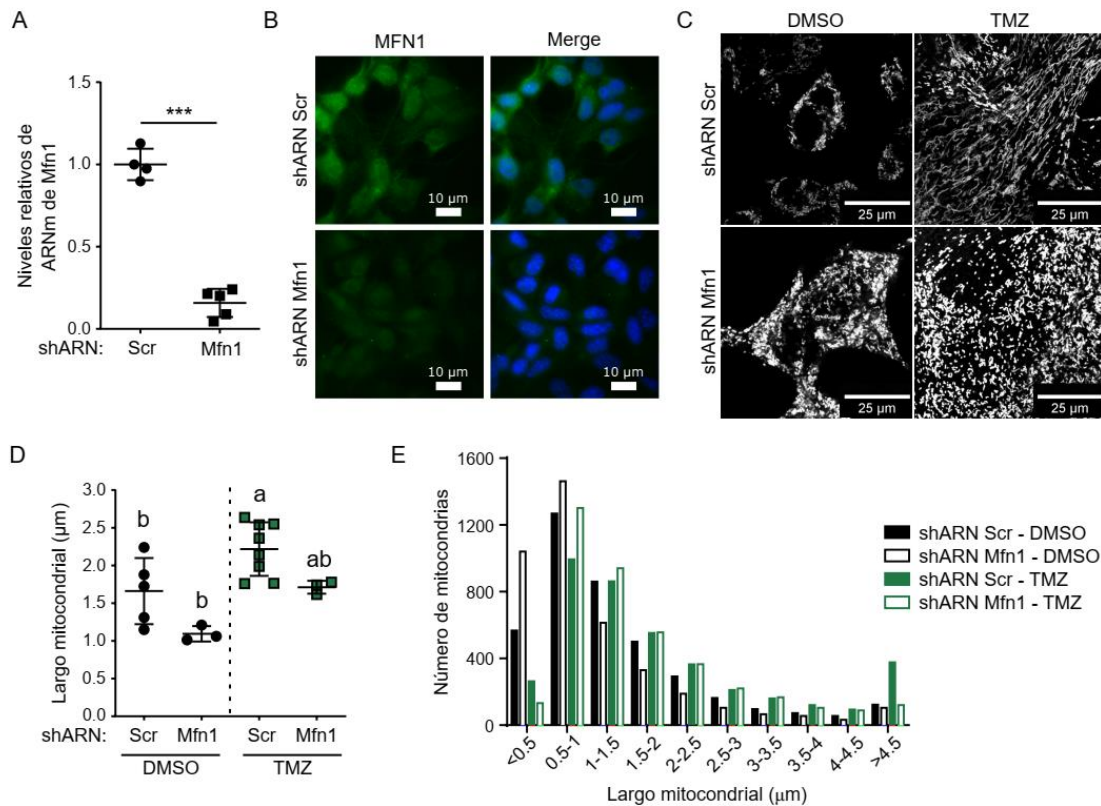


Figura 29. Silenciamiento de *Mfn1*. Las células B16-F1 se expusieron a partículas lentivirales portadoras de plásmidos que codifican un shARN contra *Mfn1* o un shARN control (Scr) y se seleccionó con puromicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ (200 μ M). **A:** RT-qPCR para la expresión de *Mfn1*. Los resultados se expresan relativos a la condición control Scr (n = 4-5). **B:** Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-MFN1 (verde) y DAPI (azul) para marcar los núcleos, analizada por microscopía de epifluorescencia (1000X). **C:** Las células se incubaron con MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (630X) (n = 3-5). **D:** Análisis de la media del largo mitocondrial de imágenes obtenidas como en (C). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.05$), shARN ($P = 0.05$) e interacción ($P = 0.86$) (n = 3-8). **E:** Análisis de la distribución de la frecuencia del largo mitocondrial obtenido de imágenes como se describe en (C). La diferencia entre las distribuciones se analizó mediante tablas de contingencia y test de Chi cuadrado ($P < 0.0001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron en (A) mediante test de Student, *** $P < 0.0001$; y en (D) mediante ANOVA de dos vías y test post hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

A diferencia de lo observado para MFN2, la disminución en los niveles de MFN1 no afectó significativamente la respiración mitocondrial en las células tratadas con DMSO o con TMZ (Figura 30A). Al evaluar la masa mitocondrial, mediante citometría de flujo, se observó que luego del tratamiento con TMZ las células con la expresión de *Mfn1* silenciada presentaron un aumento de 50% en la masa mitocondrial con respecto a las células Scr (Figura 30B). Esto podría deberse a un efecto compensatorio a la disminución en esta mitofusina y explicar la ausencia de cambios en la función mitocondrial.

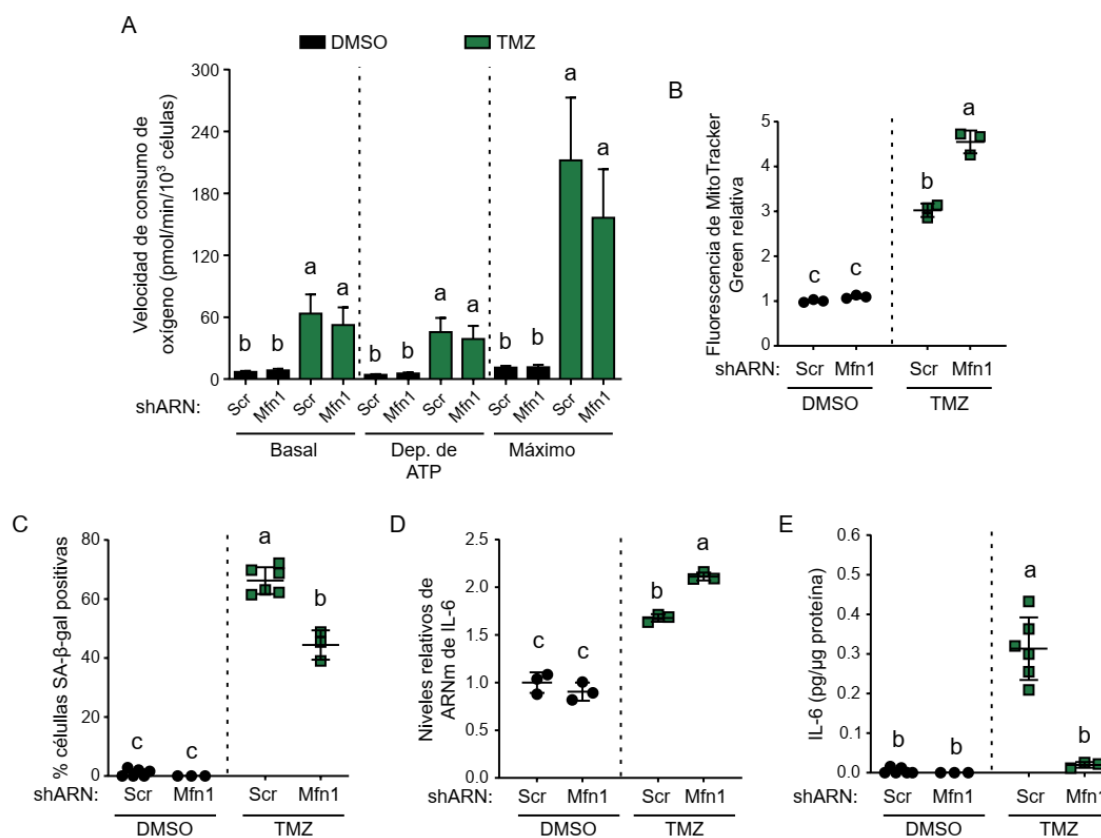


Figura 30. Efecto del silenciamiento de *Mfn1* en las células senescentes. **A:** Parámetros respiratorios obtenidos midiendo la velocidad de consumo de oxígeno ($n = 5$). Efecto principal del tratamiento, shARN e interacción, respectivamente: OCR basal ($P < 0.0001$, $P = 0.42$, $P = 0.28$); OCR dependiente de ATP ($P < 0.0001$, $P = 0.54$, $P = 0.36$); OCR máximo ($P < 0.0001$, $P = 0.13$, $P = 0.12$). **B:** Las células se incubaron con MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra la media geométrica de la intensidad de fluorescencia ($n = 3$). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P < 0.0001$) e interacción ($P < 0.0001$). **C:** Actividad SA-β-gal ($n = 3-6$). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P < 0.0001$) e interacción ($P < 0.0001$). **D:** RT-qPCR para la expresión de *IL-6* ($n = 3$). **E:** Niveles de IL-6 determinados por ELISA ($n = 3-6$). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P < 0.0001$) e interacción de los factores ($P < 0.001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (B) y (D) los resultados se expresan relativos a la condición control Scr - DMSO. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y test post hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Al evaluar el impacto sobre la inducción de la senescencia se observó que el silenciamiento de *Mfn1* redujo el porcentaje de células SA-β-gal positivas en el cultivo (Figura 30C). Al igual a lo visto para MFN2, la reducción

en los niveles de MFN1 no afectó la expresión de *Il-6* (**Figura 30D**); pero disminuyó considerablemente los niveles de IL-6 en el sobrenadante de las células tratadas con TMZ (**Figura 30E**).

Para confirmar los resultados obtenidos y descartar que se debieran a efectos del shARN sobre blancos inespecíficos se utilizó un segundo shARN de secuencia diferente, para silenciar la expresión de *Mfn1*. Se incubó a las células con partículas lentivirales portadoras de plásmidos codificantes de este constructo y se verificó que disminuyeran los niveles de ARNm y proteína de MFN1 (**Figura 31A y B**). En estas células se evaluó la morfología mitocondrial (**Figura 31C**) y la velocidad de consumo de oxígeno (**Figura 31D y C**) obteniéndose resultados similares a los anteriores (**Figura 30**). En cuanto a los marcadores de senescencia celular, en este caso la actividad SA- β -gal no se vio alterada por el silenciamiento de *Mfn1* (**Figura 31E**); pero se observó nuevamente una disminución significativa en los niveles de IL-6 secretadas por las células luego del tratamiento con TMZ (**Figura 31F**).

En suma, estos resultados indican que las mitofusinas median el aumento en el largo de las mitocondrias en la senescencia por inducida por TMZ en melanoma y son necesarias para la secreción de IL-6 un componente del secretoma de las células senescentes. Además, el silenciamiento de *Mfn2*, pero no de *Mfn1*, impactó negativamente en la función mitocondrial, indicando que estas mitofusinas, podrían cumplir roles diferentes en la senescencia inducida por TMZ.

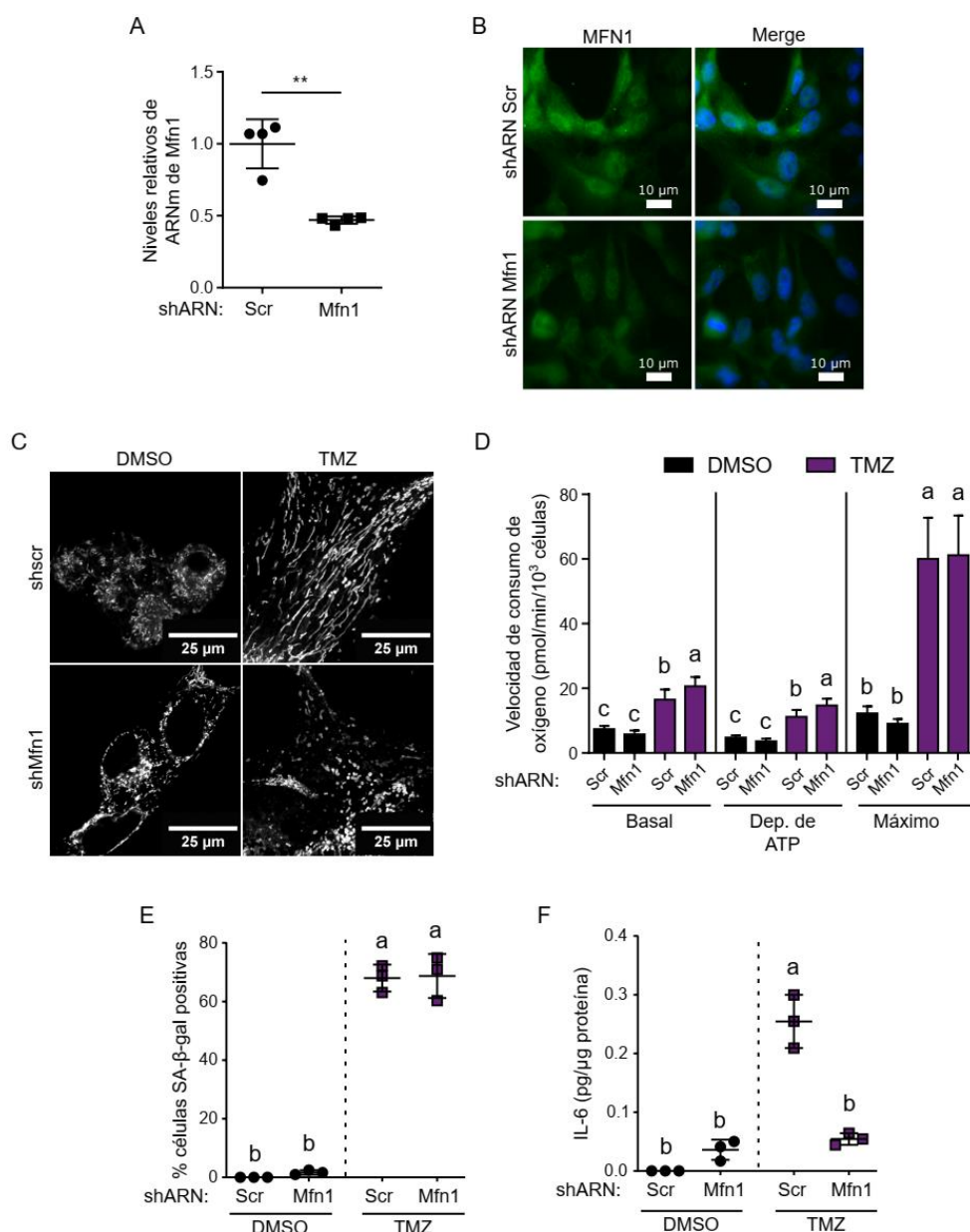


Figura 31. Silenciamiento de *Mfn1* con un segundo shARN. Las células B16-F1 se expusieron a partículas lentivirales portadoras de plásmidos que codifican para un segundo shARN contra *Mfn1* o un shARN control (Scr) y se seleccionó con puomicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ (200 μM). **A:** RT-qPCR para la expresión de *Mfn1*. Los resultados se expresan relativos a la condición control Scr (n = 4). **B:** Inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-MFN1 (verde), DAPI (azul) para marcar los núcleos y analizada por microscopía de epifluorescencia (1000X). **C:** Las células se incubaron con MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (630X) (n = 3-5). **D:** Parámetros respiratorios obtenidos midiendo la velocidad de consumo de oxígeno (n = 5). Efecto principal del tratamiento, shARN e interacción de los factores, respectivamente: OCR basal ($P < 0.0001$, $P = 0.22$, $P < 0.05$); OCR dependiente de ATP ($P < 0.0001$, $P = 0.09$, $P < 0.05$); OCR máximo ($P < 0.0001$, $P = 0.80$, $P = 0.60$). **E:** Actividad SA-β-gal (n = 3). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), del shARN ($P = 0.65$) e interacción de los factores ($P = 0.85$). **F:** Niveles de IL-6 determinados por ELISA (n = 3). Efecto principal del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P < 0.001$) e interacción ($P < 0.0001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron en **(A)** mediante test de Student, $***P < 0.0001$; y en **(D-F)** mediante ANOVA de dos vías y test post hoc de Tukey para comparaciones múltiples. Los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

B. p53 y función mitocondrial

Luego se evaluó si algunos factores implicados en inducción de la senescencia y el fenotipo secretor eran responsables también de la regulación de la función mitocondrial en la senescencia inducida por TMZ.

El factor de transcripción p53 tiene un papel central en la senescencia [81] y también se ha visto que regula el metabolismo celular y la función mitocondrial a distintos niveles [299,406]. Nuestros resultados muestran que los niveles de esta proteína aumentan luego de la exposición a TMZ (**Figura 8A y B**). Por esto, se evaluó el rol de p53 en la inducción de la senescencia y las alteraciones en la función, morfología y masa mitocondrial observadas tras la exposición a TMZ.

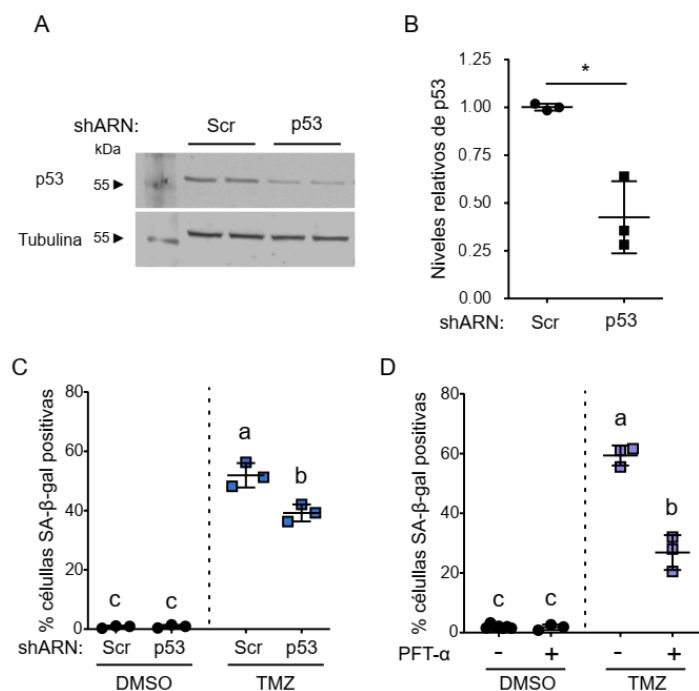


Figura 32. Silenciamiento e inhibición de p53. (A-C) Las células B16-F1 se expusieron a partículas lentivirales portadoras de plásmidos codificantes de un shARN contra p53 o un shARN control (Scr) y luego se seleccionó con puromicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ (200 μ M). **A:** Western blot con anticuerpos para p53 y tubulina como control de carga. **B:** Cuantificación de los niveles de p53 normalizados con los niveles de tubulina. Los resultados se expresan relativos a la condición control Scr ($n = 3$). **C:** Actividad SA- β -gal ($n = 3$). Efectos principales del tratamiento ($P < 0.0001$) y del shARN ($P < 0.05$) e interacción de los factores ($P < 0.05$). **D:** Previo al tratamiento con TMZ (200 μ M) o DMSO las células B16-F1 se incubaron con PFT- α (30 μ M) durante dos horas. Actividad SA- β -gal a los 4 días del segundo tratamiento con TMZ (200 μ M) ($n = 5-3$). Efectos principales del tratamiento con TMZ ($P < 0.0001$), del tratamiento con PFT- α ($P < 0.0001$) e interacción de los factores ($P < 0.0001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante test de Student, $*P < 0.05$ en (B); y mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples en (C y D), los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Para esto, se transdujeron las células B16-F1 con partículas lentivirales portadores de shARN contra p53, o un shARN control scrambled (Scr) y se seleccionó con puromicina previo al tratamiento con TMZ o DMSO. El shARN utilizado para silenciar la expresión de p53 condujo a una disminución de aproximadamente un 50% en

los niveles de la proteína (**Figura 32A y B**). Además, se observó una caída significativa en la actividad SA- β -gal luego del tratamiento con TMZ (**Figura 32C**), que confirma el rol de p53 en la inducción de la senescencia por TMZ. Se observaron resultados similares en la actividad SA- β -gal en presencia de PFT- α (30 μ M) un inhibidor de la actividad transcripcional de p53 [407] (**Figura 32D**).

El silenciamiento de la expresión de p53 también impactó significativamente en la función mitocondrial, reduciendo la mayoría de los parámetros respiratorios en las células de melanoma senescentes y no senescentes (**Figura 33A**). Sin embargo, no evitó el aumento en la velocidad de consumo de oxígeno mitocondrial al tratar las células con TMZ (**Figura 33A**). La inhibición de la actividad transcripcional de p53 no afectó la función mitocondrial en las células no senescentes; pero disminuyó la respiración, basal, dependiente de ATP y máxima de las células senescentes (**Figura 33B**).

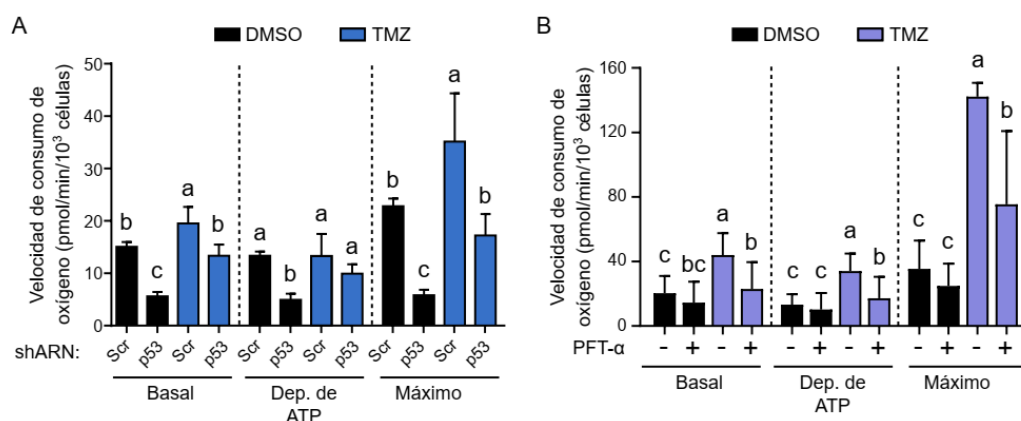


Figura 33. Efecto del silenciamiento e inhibición de la actividad de p53 en la función mitocondrial. **A:** Las células B16-F1 se expusieron a partículas lentivirales portadoras de plásmidos codificantes para un shARN contra p53 o un shARN control (Scr) y luego se seleccionó con puromicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ (200 μ M). Se obtuvieron los parámetros respiratorios a partir de las medidas de velocidad de consumo de oxígeno (n = 5). Efectos principales del tratamiento, del shARN e interacción de estos factores, respectivamente: OCR basal ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P = 0.084$); OCR dependiente de ATP ($P < 0.05$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$); OCR máximo ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P = 0.84$). **B:** Previo al tratamiento con TMZ (200 μ M) o DMSO las células B16-F1 se incubaron con PFT- α (30 μ M) durante dos horas. Parámetros respiratorios a partir de medidas de velocidad de consumo de oxígeno (n = 5-3). Efectos principales del tratamiento con TMZ, del tratamiento con PFT- α e interacción de estos factores, respectivamente: OCR basal ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P = 0.096$); OCR dependiente de ATP ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P = 0.051$); OCR máximo ($P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

El silenciamiento de p53 tampoco evitó el aumento del contenido mitocondrial de las células tras la exposición a TMZ (**Figura 34A**). Sin embargo, se observó una gran disminución en la expresión del regulador de la biogénesis mitocondrial PGC1- α (**Figura 34B**). Estas observaciones parecen en cierta medida contradictorias y su comprensión requiere un estudio más profundo, ya que la actividad de PGC1- α se encuentra regulada también a nivel postranscripcional [192].

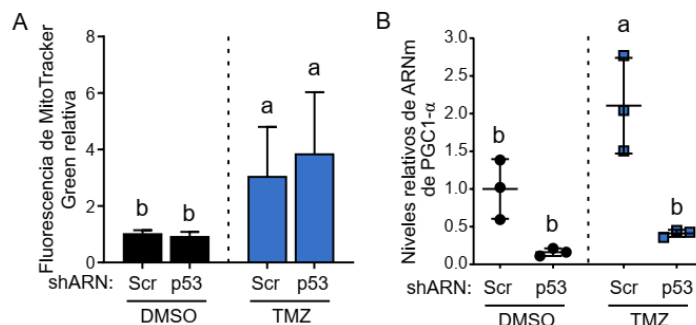


Figura 34. Efecto del silenciamiento de *p53* en la masa y biogénesis mitocondrial. Las células B16-F1 se expusieron a partículas lentivirales portadoras de plásmidos que codifican al shARN contra *p53* o un shARN control (Scr) y luego se seleccionó con puromicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ (200 μ M). **A:** Las células se incubaron con MitoTracker Green FM (300 nM) y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestra la media geométrica de la intensidad de fluorescencia ($n = 9$). Efectos principales del tratamiento ($P < 0.0001$), del shARN ($P = 0.46$) e interacción ($P = 0.35$). **B:** RT-qPCR para la expresión de *PGC-1 α* . ($n = 3$). Efectos principales del tratamiento ($P < 0.05$), del shARN ($P < 0.001$) e interacción ($P = 0.08$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. Los resultados se expresan relativos a la condición control Scr - DMSO. Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

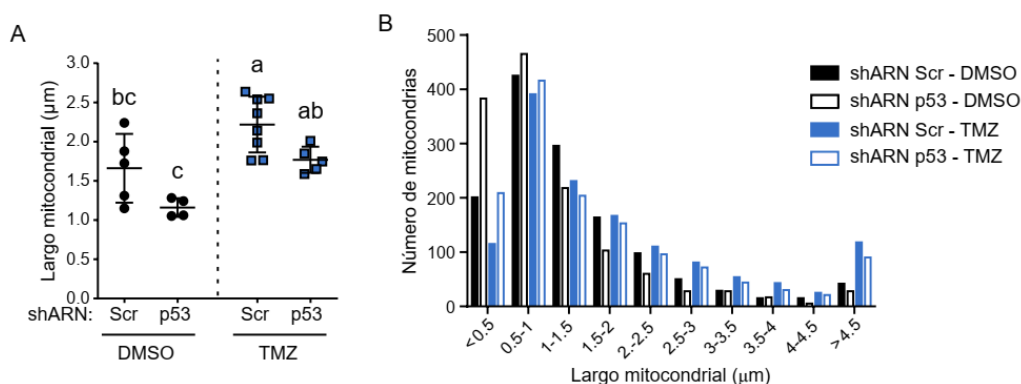


Figura 35. Efecto del silenciamiento de *p53* en la morfología mitocondrial. Las células B16-F1 se expusieron a partículas lentivirales portadoras de plásmidos que codifican al shARN contra *p53* o un shARN control (Scr) y luego se seleccionó con puromicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ (200 μ M). **A:** Análisis del largo mitocondrial, a partir de imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células teñidas con MitoTracker Green FM (300 nM) ($n = 4-8$). Efectos principales del tratamiento ($P < 0.001$), del shARN ($P < 0.05$) e interacción de los factores ($P = 0.85$). **B:** Distribución de frecuencias del largo mitocondrial de imágenes obtenidas como se describe en (A). Las diferencias entre las distribuciones se analizaron mediante tablas de contingencia y test de Chi cuadrado ($P < 0.0001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (A) Las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Por otra parte, no se observaron cambios en el largo mitocondrial promedio, tras el silenciamiento de *p53* (Figura 35A). Sin embargo, al analizar la distribución de frecuencias se observó una acumulación de mitocondrias de menor tamaño ($< 0.5 \mu$ m) en las células con niveles menores de *p53* tratadas tanto con TMZ como con DMSO (Figura 35B). Mientras que la disminución en los niveles de *p53* no evitó el aumento en el número de mitocondrias grandes ($> 4.5 \mu$ m) tras el tratamiento con TMZ (Figura 35B).

En suma, se comprobó la dependencia de p53 en la inducción de la senescencia por TMZ. Además, se observó que el silenciamiento de p53 tuvo un fuerte impacto sobre la función y forma de las mitocondrias de las células de melanoma; pero no impidió el aumento en la respiración y el tamaño mitocondrial luego del tratamiento con TMZ.

C. Factores reguladores del fenotipo secretor asociado a la senescencia y función mitocondrial

Con el objetivo de determinar si existía una vinculación entre la adquisición del fenotipo secretor y los cambios observados en el metabolismo energético se utilizaron estrategias para inhibir a NF- κ B y NOTCH1, debido a que se ha reportado que estos factores regulan la secreción de factores en varios modelos de senescencia celular [112,114,116,128].

En primera instancia se evaluaron los niveles de la subunidad p65 de NF- κ B (un componente también conocido como RELA) y la fosforilación de IKB mediante Western blots (**Figura 36A**), pero no se encontraron diferencias entre células senescentes y no senescentes. Se intentó determinar la localización subcelular de NF- κ B mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo para la subunidad p65 pero no se pudo detectar a la proteína por este medio. Como estos resultados no permitían evidenciar la activación de la vía de NF- κ B, se optó por abordar el problema con una estrategia experimental diferente. Se silenció la expresión de la subunidad p65 con dos shARN diferentes que denominamos a y b (**Figura 36B**). El primero (a) prácticamente no redujo niveles de p65 mientras que el segundo (b) provocó una caída de aproximadamente 60% en los niveles de la proteína (**Figura 36C**). Para verificar si el silenciamiento de p65 afectaba el fenotipo secretor senescente, se midieron los niveles de ARNm de IL-6. Sorprendentemente, no se evidenció una caída en la expresión de esta interleuquina al silenciar p65 (**Figura 36D**). La disminución en los niveles de p65 tampoco alteró los parámetros respiratorios antes ni después de la inducción de la senescencia (**Figura 36E**). En suma, nuestros resultados sugieren que NF- κ B no se encuentra activado en la senescencia inducida por TMZ en esta línea celular, por lo menos a los tiempos evaluados. En las condiciones de nuestros ensayos este factor de transcripción no regularía la expresión de IL-6 ni sería necesario para el aumento en la función mitocondrial que acompaña la inducción de la senescencia por TMZ.

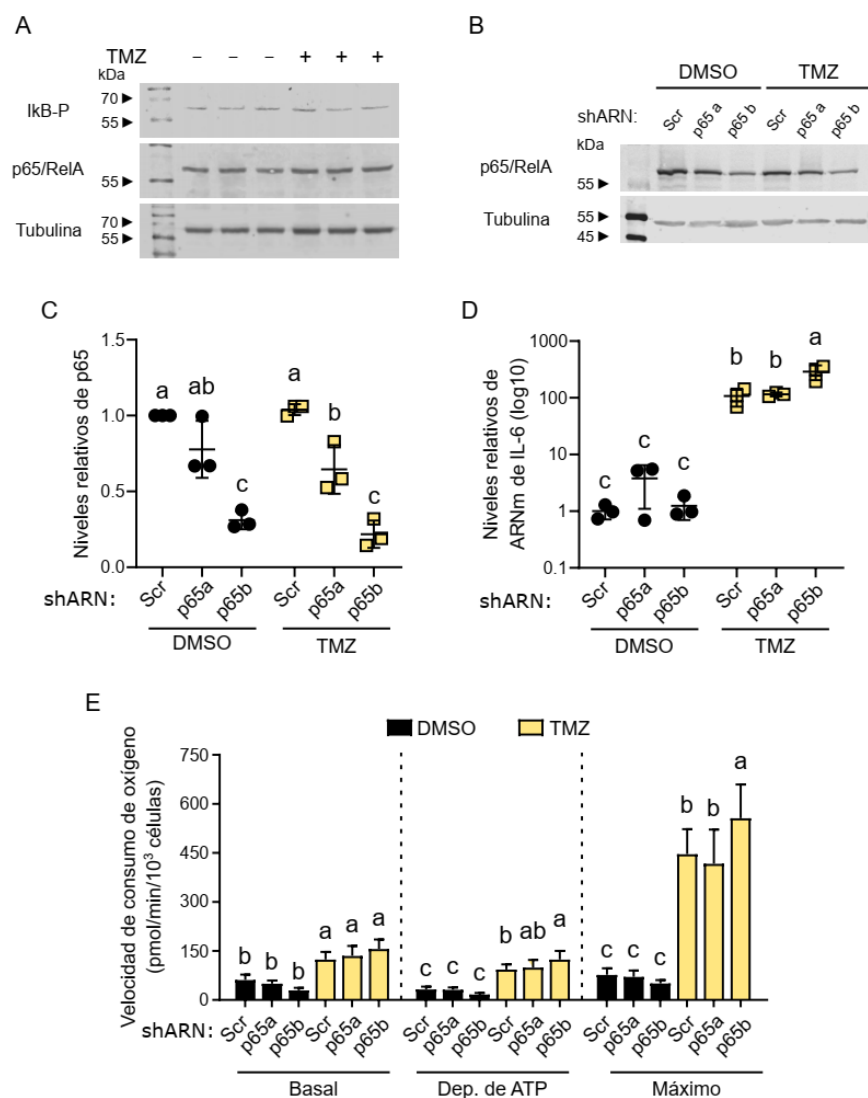


Figura 36. Rol de p65/RelA en la secreción de citoquinas y la función mitocondrial. **A:** Western blot con anticuerpos para IκB-P, p65 y tubulina como control de carga en células B16-F1 expuestas a TMZ o vehículo. **(B-E)** Las células B16-F1 se expusieron a partículas lentivirales portadoras de plásmidos que codifican al shARN contra p65 o un shARN control (Scr) y luego se seleccionó con puromicina, previo al tratamiento con DMSO o TMZ. **B:** Western blot con anticuerpos para p65 y tubulina como control de carga. **C:** Cuantificación de los niveles de p65 normalizados con los niveles de tubulina ($n = 3$). Efecto del tratamiento ($P = 0.26$), shARN ($P < 0.0001$) e interacción ($P = 0.41$). **D:** RT-qPCR para la expresión de *IL-6* ($n = 3$). Efecto del tratamiento ($P < 0.0001$), shARN ($P < 0.05$) e interacción ($P < 0.05$). **E:** Parámetros respiratorios obtenidos midiendo la velocidad de consumo de oxígeno ($n = 4-10$). Efectos principales del tratamiento, del shARN e interacción, respectivamente: OCR basal ($P < 0.0001$, $P = 0.99$, $P < 0.05$); OCR dependiente de ATP ($P < 0.0001$, $P = 0.45$, $P < 0.05$); OCR máximo ($P < 0.0001$, $P = 0.12$, $P < 0.05$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En **(C)** y **(D)** los resultados se expresan relativos a la condición control Scr – DMSO. En **(C-E)** las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey; los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

A continuación, se evaluó la vía de NOTCH1 en la senescencia inducida por TMZ en melanoma ya que este factor se ha visto involucrado en la regulación del fenotipo secretor en otros modelos de senescencia [112,116]. La activación de esta vía requiere la proteólisis del receptor de membrana NOTCH1 por una γ -secretasa, que

conduce a la liberación del dominio citoplasmático (NICD) de 110 kDa [133,140,141]. Por esto, para evaluar la activación de la vía de NOTCH se realizaron los ensayos en ausencia y en presencia de DAPT (10 μ M), un inhibidor de la γ -secretasa.

Las células B16-F1 se incubaron con 10 μ M DAPT, dos horas previo al tratamiento con TMZ o DMSO y se mantuvo el cultivo en presencia de este compuesto. Como se observa en los Western blots el tratamiento con TMZ condujo a un aumento en los niveles del receptor NOTCH1 (**Figuras 37A y B**), de acuerdo a lo reportado en otras células senescentes [116]. Por otro lado, en los Western blots utilizando un anticuerpo que reconoce exclusivamente al dominio citoplasmático NICD, co-activador de la transcripción, también se encontraron diferencias entre las condiciones. En las células expuestas al vehículo se observó principalmente una banda de peso molecular cercano a los 130 kDa, mientras que en las células tratadas con TMZ se apreciaron dos bandas, de 130 y 110 kDa aproximadamente. La banda de menor peso molecular (marcada con un asterisco rojo), presente en las células tratadas con TMZ, disminuye en presencia de DAPT sugiriendo que corresponde a NICD la porción activa de NOTCH. La identidad de la banda de mayor peso molecular no es clara (aunque su peso molecular es muy similar al de la proteína NOTCH1 sin cortar), ya que según el fabricante este anticuerpo no debería reconocer otro antígeno. Estas observaciones sugieren que la vía de NOTCH1 se encuentra activada y podría regular el fenotipo secretor en las células de melanoma senescentes por exposición a TMZ.

La inhibición de la vía de NOTCH1 por DAPT no afectó la inducción de la senescencia, evaluada midiendo los niveles de p21 (**Figura 37C**). Sin embargo, la incubación con DAPT, tuvo un impacto significativo en la función mitocondrial, produciendo una caída en la respiración basal, dependiente de ATP y máxima en las células senescentes, sin afectar a las células no senescentes (**Figura 37D**). Indicando que la activación de la vía de NOTCH1 es necesaria para el aumento en la respiración mitocondrial que acompaña la inducción de la senescencia por TMZ.

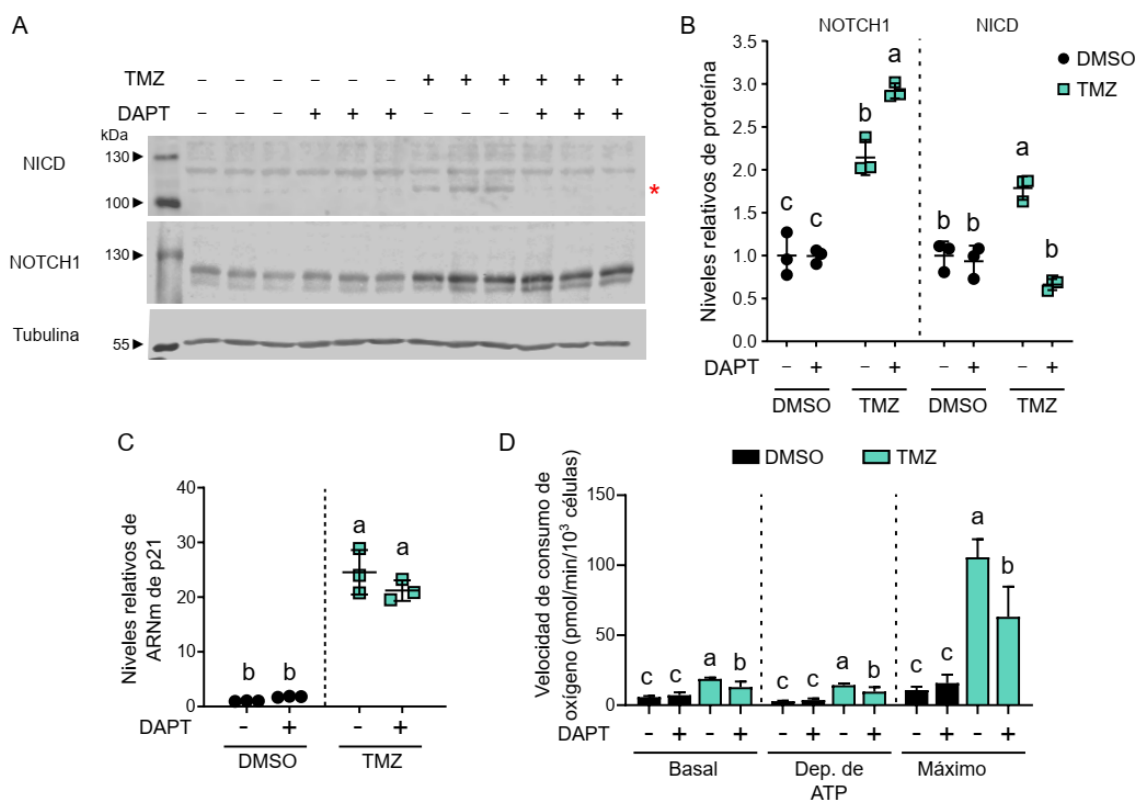


Figura 37. Activación de la vía de NOTCH. Previo al tratamiento con DMSO o TMZ se incubaron las células de melanoma B16-F1 con DAPT 10 μ M durante dos horas y se mantuvo el inhibidor en el cultivo hasta el día del ensayo. **A:** Western blot con anticuerpos para NICD, NOTCH1 y tubulina como control de carga. **B:** Cuantificación de los niveles de NOTCH1 y del NICD normalizados con los niveles de tubulina ($n = 3$). Para NOTCH1: Efectos principales del tratamiento con TMZ ($P < 0.05$), con DAPT ($P < 0.0001$) e interacción ($P < 0.001$). Para NICD: Efectos principales del tratamiento con TMZ ($P < 0.0001$), con DAPT ($P < 0.05$) e interacción ($P < 0.05$). **C:** RT-qPCR para la expresión de *p21* ($n = 3$). Efecto del tratamiento con TMZ ($P < 0.0001$), del tratamiento con DAPT ($P = 0.35$) e interacción ($P = 0.15$). **D:** Parámetros respiratorios obtenidos a partir de medidas de velocidad de consumo de oxígeno ($n = 5$). Efectos principales del tratamiento con TMZ, del tratamiento con DAPT e interacción, respectivamente: OCR basal ($P < 0.0001$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); OCR dependiente de ATP ($P < 0.0001$, $P < 0.05$, $P < 0.05$); OCR máximo ($P < 0.0001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$). Los resultados representan la media $\pm$ SD. En (**B**) y (**C**) los resultados se expresan relativos a la condición control sin DAPT. En (**B-D**) las diferencias significativas se determinaron mediante ANOVA de dos vías y test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples, los grupos con diferentes letras son significativamente diferentes con $P < 0.05$.

Discusión

Cambios metabólicos asociados la inducción de la senescencia en melanoma por la quimioterapia

Con el propósito de estudiar el metabolismo de las células senescentes en un modelo de senescencia inducida por la terapia en melanoma, expusimos células de melanoma de ratón B16-F1 a TMZ, un agente genotóxico utilizado en la quimioterapia de esta enfermedad. Luego del tratamiento con TMZ, se observó alrededor de un 60-70% del cultivo senescente y la adquisición de un fenotipo secretor asociado a la senescencia. Por otro lado, basándonos en un protocolo de la literatura, evaluamos la inducción de la senescencia en células SK-MEL-28 con la mutación B-RAF V600E exponiéndolas a vemurafenib; sin embargo, no observamos un aumento en el número de células senescentes utilizando dos concentraciones diferentes de vemurafenib.

Los estudios metabólicos en células de melanoma de ratón senescentes evidenciaron que la inducción de la senescencia se acompaña de importantes alteraciones bioenergéticas, que involucran la transición de un metabolismo principalmente fermentativo a un metabolismo más oxidativo. En las células de melanoma senescentes el piruvato, producido en la glucólisis, es reducido a lactato [408,409]. Mientras que en las células senescentes la oxidación de la glucosa no produce lactato y se observa un aumento en la función mitocondrial. El aumento en la función mitocondrial se evidenció por un aumento en varios parámetros (respiración basal, dependiente de ATP y máxima) e índices respiratorios (eficiencia de acoplamiento, capacidad de reserva e índice de control respiratorio). Estos resultados indican que las mitocondrias de las células de melanoma senescentes estarían mejor preparadas para enfrentar una situación de demanda energética y que presentan un mejor acoplamiento del transporte de electrones con la síntesis de ATP. Vale la pena destacar que, aunque la inducción de la senescencia se acompañó de un aumento en el volumen y masa celular, el aumento en la función mitocondrial sobrepasa al aumento en el tamaño de las células. Nuestros resultados están de acuerdo con lo observado en la senescencia inducida por expresión ectópica del oncogén RAS [288,290] y en la senescencia inducida por la quimioterapia en células de linfoma [292]. Sin embargo difieren con lo reportado en la senescencia replicativa y la senescencia inducida por exposición a H_2O_2 , donde se ha visto una disminución en la función mitocondrial [293–295].

El aumento en la respiración mitocondrial de las células senescentes se acompañó de un aumento en los niveles de oxidantes. Parte de estos oxidantes podrían estarse formando durante el transporte de electrones mitocondrial ya que el agregado de un desacoplante disminuyó la oxidación de la DCFH-DA. Sin embargo, la oxidación de la DCFH-DA no fue suprimida totalmente por el desacoplante. Esto sumado al aumento en el consumo de oxígeno no mitocondrial, obtenido luego del agregado de un inhibidor del transporte electrónico, sugiere la existencia de otras fuentes de estas especies reactivas. En este sentido, en la senescencia inducida

por oncogenes y por daño al ADN [291,410] se ha reportado que la producción de oxidantes sería consecuencia de un aumento en el transporte de electrones [291,411] y también en la actividad de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) [412,413].

Por otro lado, comprobamos que las células B16-F10, con mayor poder metastásico que las B16-F1, también entran en senescencia tras la exposición a TMZ. Aunque en las células B16-F10 el porcentaje de células senescentes (43%), evidenciado midiendo la actividad SA- β -gal, resultó menor que en las células B16-F1 (>60%). Esto estaría de acuerdo con reportes que indican que la capacidad de las células tumorales de “escapar” a la senescencia celular se relaciona con el potencial metastásico [414,415]. En las células B16-F10 también observamos un aumento en los parámetros respiratorios, confirmando las observaciones realizadas en la línea celular B16-F1.

Como se menciona previamente, luego del tratamiento con TMZ alrededor del 60-70% de las células de melanoma B16-F1 se tornaron senescentes, mientras que entre un 30-40% del cultivo resistió el tratamiento y mantuvo la proliferación. Por esto, se separaron las dos poblaciones tomando en cuenta los cambios en el tamaño y complejidad celular de las células senescentes, y se evaluó si las alteraciones metabólicas observadas se debían a la inducción de la senescencia o eran producto del tratamiento con TMZ per se. Con esta aproximación se obtuvo una población de células enriquecida en células senescentes y se comprobó que esta población presentaba un aumento en la función mitocondrial. También observamos que las células tratadas con TMZ no senescentes, tenían un pequeño aumento en la eficiencia de acoplamiento con respecto a las células de control. Esta observación podría estar asociada a un fenotipo resistente al tratamiento, previamente reportado para células de glioma resistentes a la TMZ [319]. En estos trabajos los autores reportan una remodelación de la cadena de transporte de electrones en células de glioma resistentes, las cuales presentan un aumento en la actividad de los complejos II/III y complejo IV, un mayor acoplamiento mitocondrial y una disminución en los niveles de oxidantes [318,319].

Bases moleculares de las alteraciones metabólicas

La inducción de la senescencia en células de melanoma por el tratamiento con TMZ se acompañó de un importante aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial. Estos cambios, en particular el aumento en la respiración máxima, podrían ser consecuencia de un aumento en la masa mitocondrial y/o en los niveles o actividad de proteínas de vías catabólicas o de los complejos de la cadena respiratoria, debidos por ejemplo a modificaciones post-traduccionales o formación de supercomplejos [175,260,416]. Por esto empleamos diferentes aproximaciones experimentales evaluar qué procesos se encontraban alterados en las células senescentes.

En las células de melanoma se observó un aumento en la masa mitocondrial, junto con una mayor expresión de PGC-1 α y TFAM, tras la inducción de la senescencia. PGC-1 α promueve la expresión de varias proteínas involucradas en el transporte electrónico y TFAM es un regulador directo de la replicación y transcripción del ADN mitocondrial [191,417]. PGC-1 α promueve la biogénesis mitocondrial en diferentes situaciones fisiológicas, incluido el cáncer [313,418], y podría estar detrás del aumento de la masa mitocondrial en nuestro modelo.

Mediante estudios de espectrometría de masa se evidenciaron profundos cambios en el proteoma mitocondrial de las células senescentes. Las mitocondrias de las células senescentes presentan un aumento en las proteínas relacionadas con procesos oxidativos, como el catabolismo de aminoácidos y de ácidos grasos, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Estos resultados están de acuerdo con los estudios de proteómica y transcriptómica de Flor et. al, donde encontraron un aumento en las enzimas del metabolismo de lípidos de células senescentes por exposición a etopósido [419]. Además, están de acuerdo con el aumento en la oxidación de ácidos grasos observado en fibroblastos senescentes por expresión del oncogén RAS [288]; así como con lo reportado por Baraibar et. al, en relación a un aumento en el catabolismo de lípidos y de aminoácidos ramificados en células musculares senescentes [297]. El aumento en el catabolismo de aminoácidos podría estar relacionado con el aumento en la autofagia, un proceso esencial para el mantenimiento del fenotipo secretor senescentes [82,210,420].

En el proteoma de las mitocondrias de las células senescentes también se observó un aumento en varias subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones y de la ATP sintasa. Estos resultados van en línea con los cambios metabólicos observados en las células de melanoma senescentes, e indican que el aumento en la respiración mitocondrial se podría explicar, al menos en parte, por un aumento en los niveles de proteínas de diferentes vías. Conjuntamente, los resultados de espectrometría de masa mostraron un enriquecimiento de las vías de biogénesis y traducción mitocondrial de proteínas, que también está de acuerdo con el aumento en el contenido mitocondrial determinado midiendo la acumulación de Mitotracker Green, la actividad citrato sintasa y los niveles de ADN_{mit}/ADN_{nuc} en las células de melanoma senescentes.

Otro resultado interesante fue el gran aumento en los niveles de la enzima 4-aminobutirato aminotransferasa (ABAT) en las células senescentes. Esta enzima participa en el metabolismo del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) pero además es necesaria para el mantenimiento del ADN mitocondrial. ABAT forma un complejo junto con la nucleósido difosfato quinasa mitocondrial (NME4) y subunidades de la succinil-CoA sintetasa [421] (SUCLG1, SUCGL2 y SUCLA2), que también se encontraron aumentadas en las células senescentes (**Anexo Tabla 6**). La formación de este complejo es necesaria para la síntesis mitocondrial de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), utilizados en la replicación del ADN mitocondrial [421,422]. Vale la pena destacar que en células no proliferantes, como las células quiescentes y senescentes, la biosíntesis de nucleótidos en el citosol se encuentra reducida [423,424]. En este contexto, la activación de esta ruta de

salvataje de nucleótidos mitocondrial está de acuerdo con el aumento en el número de copias de ADN mitocondrial y la biogénesis mitocondrial observada en las células senescentes.

También se encontraron enriquecidas las células senescentes en proteínas involucradas en el procesamiento del regulador esencial de complejo transportador de calcio a la mitocondria (SMDT1 o ERMES) [401]. El procesamiento de SMDT1/ERMES es necesario para el ensamblaje del complejo transportador de calcio a la mitocondria (MCU) [401]. La entrada de calcio a la mitocondria activa a la piruvato deshidrogenasa y enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa) [257]; por lo que en las células senescentes el calcio podría jugar un papel relevante en el aumento del metabolismo mitocondrial.

Además de un aumento en la masa mitocondrial, la senescencia inducida por TMZ se acompañó de un aumento en la longitud de las mitocondrias, mediado por las proteínas de fusión MFN1 y MFN2. Los niveles de estas proteínas, medidos por Western blot y espectrometría de masa, fueron mayores en las células senescentes que en las no senescentes. De hecho, mediante espectrometría de masa las MFN1 y MFN2 se detectaron únicamente en las células senescentes (**Anexo Tabla 5**). Se ha reportado que PGC-1 α regula la expresión del gen *Mfn2* en músculo esquelético [425]. Este co-activador de la transcripción se encuentra elevado y podría estar regulando la expresión de MFN2 en la senescencia inducida por TMZ. También, se observó una disminución en los niveles de las proteínas relacionadas con la fisión mitocondrial MFF y FIS1; sin embargo, la translocación de DRP1 a la mitocondria se mantuvo prácticamente sin cambios. Estos resultados, apuntaban a que el aumento en los eventos de fusión, mediado por el aumento en los niveles de mitofusinas, sería el mecanismo principal responsable de los cambios en la morfología de las mitocondrias. Los experimentos de silenciamiento de la expresión de las mitofusinas confirmaron esta idea, ya que la disminución en los niveles de MFN1 y MFN2 aumentó el número de mitocondrias pequeñas, de acuerdo con observaciones de otros autores [274,275] y previno la formación de mitocondrias de mayor tamaño en cultivos tratados con TMZ.

Algunos reportes en la literatura muestran que las mitocondrias más largas e interconectadas presentan niveles más altos de fosforilación oxidativa que las mitocondrias pequeñas y fragmentadas [262,283–285,294]. Sin embargo, la relación entre la morfología mitocondrial y la función es compleja y alteraciones similares en la morfología pueden tener resultados diferentes según el tipo de célula y el contexto fisiológico [258–260]. En las células de melanoma senescentes observamos un aumento tanto en la fusión mitocondrial como en la respiración y fosforilación oxidativa mitocondrial. El aumento en la síntesis de ATP a nivel mitocondrial podría colaborar al mantenimiento de procesos energéticamente demandantes, como la síntesis y secreción de proteínas. Por otro lado, la fusión mitocondrial proporciona resistencia a estímulos pro-apoptóticos, como las especies oxidantes [426], estaurosporina y actinomicina D [427]; y es posible que contribuyan a la resistencia a la apoptosis asociada a la senescencia celular [428,429].

Algunos autores sugieren que el aumento en la función mitocondrial podría estar relacionado con una disminución en la proliferación; por ejemplo, se ha observado que células de melanoma con tiempo de duplicación lento presentan un aumento en los niveles de proteínas de la fosforilación oxidativa y una tasa de consumo de oxígeno elevada; y además, presentan una gran resistencia a las terapias citotóxicas y terapias dirigidas [430]. Sin embargo, en fibroblastos proliferantes se observa un aumento en la fosforilación oxidativa y alrededor de un 30% en la eficiencia de acoplamiento mitocondrial, ambos eventos dependientes de la fusión mitocondrial mediada por MFN2 [285]; mientras que los fibroblastos quiescentes presentan una disminución en la actividad mitocondrial [285]. En células de glioblastoma quiescentes se ha reportado una disminución en la masa y potencial de membrana mitocondrial [431]; y la presencia de mitocondrias fragmentadas y con morfología de donas [432]. Por lo tanto, aunque el aumento de la función mitocondrial podría ser una característica común de las células que sobreviven al tratamiento con agentes genotóxicos, no parece estar relacionado directamente con la inhibición de la proliferación.

Rol de las mitofusinas en la senescencia del melanoma: la mitocondria en la síntesis y secreción de proteínas

Para investigar si el aumento en la fusión mitocondrial tenía un rol en la senescencia celular, silenciámos la expresión de *Mfn1* y *Mfn2*. La disminución en los niveles de las mitofusinas afectó la morfología de mitocondrias; y en el caso del silenciamiento de *Mfn2* también impactó en el transporte electrónico y fosforilación oxidativa de las células senescentes. Además, el silenciamiento de *Mfn1* y *Mfn2* inhibió la secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-6 en células senescentes, sin afectar los niveles del ARN mensajero de esta citoquina. En conjunto, nuestras observaciones apuntan a que las mitofusinas desempeñan un papel en la secreción de factores por las células senescentes.

La mitocondria tiene un rol central en los procesos de secreción de proteínas. Varios de los pasos en la secreción de proteínas, incluyendo la translocación al RE durante su síntesis, el plegamiento, el transporte mediante vesículas y exocitosis de las proteínas consumen energía (**Figura 38**). La mitocondria aporta el ATP necesario para que estos eventos se lleven a cabo y además cumple un rol amortiguando las concentraciones de Ca^{2+} en los sitios de exocitosis (**Figura 38**) [433]. La MFN2, está presente en el RE y participa en la asociación entre las mitocondrias y este organelo, donde se sintetizan IL-6 y otros componentes del SASP [223,434]. La MFN1 se encuentra solo en la mitocondria, pero también puede interaccionar con la MFN2 del RE aportando a la asociación entre estos organelos (**Figura 38**) [223]. Por otro lado, la proteína responsable del ingreso de ATP al retículo endoplásmico (SCL35B1/AXER) probablemente se encuentra en estas regiones de contacto entre los dos organelos, ya que co-inmunoprecipita junto a subunidades de la ATP sintasa y proteínas del RE (**Figura 38**) [435]. Nuestros resultados muestran que la falta de ATP podría no ser el evento

principal detrás de la inhibición de la síntesis y secreción de IL-6 ya que el silenciamiento de MFN1 afectó considerablemente la secreción de IL-6 sin alterar el consumo de oxígeno. Sin embargo, en las células de melanoma senescentes el silenciamiento de MFN2 o MFN1 podría interferir en la transferencia de ATP de la mitocondria al RE afectando el plegamiento y control de calidad de las proteínas en este organelo, afectando la secreción de IL-6 y otros componentes del SASP.

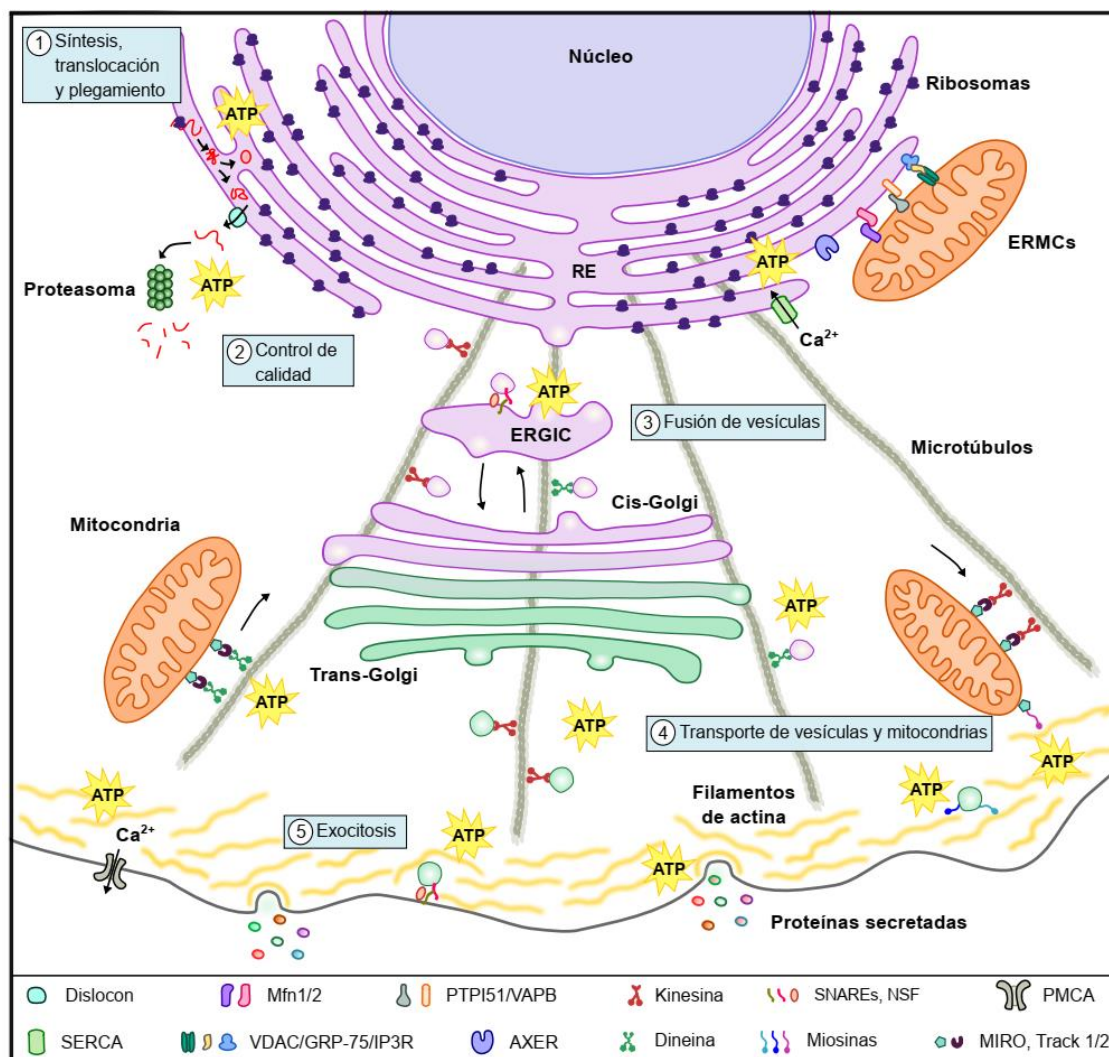


Figura 38. La mitocondria en la vía convencional de secreción de proteínas. La síntesis y secreción de proteínas son procesos costosos desde el punto de vista energético y la mitocondria interacciona con organelos y componentes del citoesqueleto para aportar ATP para: 1) La síntesis, translocación al RE donde ocurre el plegamiento de las proteínas. 2) El control de calidad de proteínas en particular la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD) es un proceso que consume energía. 3) La fusión de vesículas con membranas blancas en el RE, del compartimento intermedio RE-Golgi (ERGIC), Golgi y la membrana plasmática. 4) El transporte de vesículas y mitocondrias a través de los microtúbulos y los filamentos de actina. 5) Exocitosis. En el panel de abajo se muestran algunas moléculas y complejos que tienen funciones relevantes en estos eventos.

Factores reguladores del aumento en la función mitocondrial y del SASP

i. p53 en la senescencia del melanoma inducida por TMZ

Nuestros resultados sugieren que en las células de melanoma senescentes por exposición a TMZ la inhibición en la proliferación estaría mediada por la activación de la vía de p53/p21, lo que concuerda con reportes previos [159]. El silenciamiento de *p53* afectó significativamente el consumo de oxígeno en las células de melanoma senescentes y no senescentes; apoyando que p53 regula el metabolismo celular y en particular la actividad de la cadena de transporte electrónico [298–305]. Mientras que PFT- α , el inhibidor de la actividad transcripcional de p53, redujo solamente el consumo de oxígeno de las células tratadas con TMZ. Esto podría deberse a que el silenciamiento de *p53* afectó los niveles totales de p53, no solo la actividad transcripcional de p53, impactando en otras funciones independientes de su rol como factor de transcripción, como podría ser el mantenimiento de números de copias de ADN mitocondrial. Ni el silenciamiento de *p53* ni el tratamiento PFT- α evitaron completamente el aumento en los parámetros respiratorios tras el tratamiento con TMZ, por lo que el aumento en los niveles p53 en las células senescentes, no sería el principal responsable de las alteraciones en el metabolismo energético que acompañan la inducción de senescencia en nuestro modelo.

Por otro lado, el silenciamiento de *p53* provocó un aumento en la cantidad de mitocondrias pequeñas tanto en las células de melanoma como en las células de melanoma senescentes. El rol de p53 en la regulación de los procesos de dinámica mitocondrial se encuentra poco estudiado en la literatura. Se ha propuesto que p53 podría modular la expresión algunas proteínas de fusión y fisión mitocondrial [436,437].

ii. Vinculación entre los cambios metabólicos asociados a la senescencia y la adquisición del SASP

Como se mencionó anteriormente, la senescencia celular está marcada por un aumento en la síntesis y secreción de factores; cuyos efectos sobre el microambiente celular son aún controversiales. Nuestro trabajo parte de la hipótesis de que la síntesis y secreción de estos factores implicaría un gran gasto energético para la célula senescentes. Por esto, se estudió la vinculación de dos vías reguladoras principales del fenotipo secretor, descritas en la literatura, con los cambios en la función mitocondrial.

Evaluamos inicialmente la vía del factor de transcripción NF- κ B, que es responsable de la secreción de citoquinas en varios modelos de senescencia celular [123]. Sin embargo, en nuestro modelo de inducción de senescencia por TMZ en melanoma, no encontramos evidencia de la activación de la vía de NF- κ B. Además, el silenciamiento de la expresión de la subunidad *p65/RelA* no afectó la expresión de *IL-6* ni los parámetros respiratorios mitocondriales, sugiriendo que en nuestro modelo de senescencia el fenotipo secretor no se encuentra regulado por la vía de NF- κ B, por lo menos a los tiempos evaluados. Vale la pena destacar que el

fenotipo secretor regulado por NF- κ B y CEBP suele presentarse varios días después del estímulo inductor de la senescencia [112]. La proliferación de las células no senescentes, nos impide llevar a cabo experimentos a tiempos más largos y no permitió evaluar si esta vía se activaba más adelante.

En segundo lugar, evaluamos la activación de la vía de NOTCH1, ya que se encuentra reportado que este factor regula la expresión de muchos componentes de SASP a tiempos cortos luego de la exposición al estímulo inductor de la senescencia [112,116]. Utilizando un inhibidor de la γ -secretasa, una proteasa necesaria para la activación de NOTCH1, evidenciamos la activación de este factor en las células senescentes a los 4 días de la exposición a TMZ. La inhibición de la γ -secretasa también redujo significativamente los parámetros respiratorios mitocondriales en las células de melanoma senescentes por TMZ, sin afectar las células de melanoma no senescentes.

Nuestros resultados están de acuerdo con algunos reportes que indican que NOTCH1 regula la expresión de enzimas y componentes del metabolismo celular. Durante la activación de macrófagos M1 NOTCH1 promueve un aumento en la expresión de genes de componentes de la cadena respiratoria y de la piruvato deshidrogenasa fosfatasa 1 (PDP1) [438]. Mientras que en células de cáncer de mama, expuestas al ligando de NOTCH1 Jagged1, se observó que NOTCH1 se asocia a PINK1 en la superficie mitocondrial y estimula la respiración mitocondrial [439]. La expresión ectópica de la forma activa de NOTCH1 (NICD) conduce a un aumento en la masa mitocondrial y la expresión de PGC1- α [440]. Por último, también se ha visto que las mitofusinas son mediadores claves de la actividad anti-apoptótica de NOTCH1[441].

Estos resultados sugieren que la vía de NOTCH1 podría regular en forma coordinada la dinámica, biogénesis y la respiración mitocondrial, así como la secreción de proteínas por las células senescentes, y requieren mayor estudio.

Rol de la senescencia inducida por la terapia en melanoma

La senescencia celular es una de las consecuencias de la quimio y radioterapia, y de las terapias dirigidas contra el melanoma [107,160,162,375]; y la senescencia celular pueden influir en la respuesta del tumor a estas terapias, mediante la inhibición de la proliferación y el fenotipo secretor. El secretoma de las células senescentes, puede afectar la proliferación y migración de células tumorales, la respuesta inmune contra las células tumorales, la matriz extracelular y la angiogénesis [442,443]. La composición del secretoma senescente y los efectos sobre el entorno dependen del tipo de célula que entra en senescencia, del estímulo inductor de senescencia, el tejido blanco y la edad del organismo [327,442,443]. Actualmente existe controversia sobre los efectos del secretoma senescente en la progresión del melanoma. Por un lado, se ha visto que las células de melanoma senescentes por la terapia secretan CCL2 e IL-6 que promueven la formación de tumores, la invasión

y la resistencia a la apoptosis [128,376]. Por otro lado, la CCL5 secretada por leucocitos senescentes por la terapia inhibe el crecimiento del melanoma [107]. Por lo tanto, se requiere más investigación para establecer si la senescencia inducida por la terapia tiene efectos positivos o negativos en el desarrollo del melanoma.

Las células senescentes, producto del tratamiento contra el cáncer, además de ser capaces de promover la progresión del tumor [128,376], son responsables de muchos de los efectos secundarios de las terapias [323]. Por lo tanto, es importante el desarrollo estrategias farmacológicas contra el cáncer que incluyan senolíticos o senomórficos, para eliminar las células senescentes [336,442] o el SASP [327], respectivamente. En este sentido, algunos experimentos ya han mostrado la sinergia entre senolíticos y quimioterapéuticos promoviendo la muerte de las células cancerosas [83,444].

Los resultados presentados en este trabajo, junto con los de otros autores [288,292], muestran que la inhibición del metabolismo energético mitocondrial disminuye la secreción de citoquinas pro-inflamatorias [445], e indican que las mitocondrias, especialmente las proteínas involucradas en los procesos de dinámica mitocondrial, constituyen un blanco farmacológico atractivo para modular el fenotipo secretor.

Conclusiones

En este trabajo, se estableció un modelo de senescencia inducida por la terapia, mediante la exposición de células de melanoma de ratón al quimioterápico TMZ. En este modelo se observó que la senescencia conduce a una reprogramación metabólica donde las células presentan un menor metabolismo glucolítico fermentativo y una mayor capacidad de realizar fosforilación oxidativa. Estos cambios metabólicos ocurrieron en conjunto con un aumento en la cantidad y tamaño de las mitocondrias y alteraciones en el proteoma mitocondrial. Se comprobó que las alteraciones que sufrían las células luego del tratamiento con TMZ se asociaban específicamente a la inducción de la senescencia y no se debían al tratamiento con la droga.

En relación a las bases moleculares de los cambios metabólicos de las células senescentes, se destaca el aumento en los niveles de las MFN1 y MFN2. Estas proteínas de fusión mitocondrial son responsables del aumento en el tamaño de las mitocondrias y además la MFN2 está involucrada en el aumento de la función mitocondrial en las células senescentes. Ambas mitofusinas fueron necesarias para la secreción de IL-6, una interleuquina componente del secretoma de las células senescentes. Por otra parte, se observó que la inhibición del factor NOTCH1, un regulador del secretoma senescente, impactó significativamente en la respiración mitocondrial en las células senescentes sin afectar las células control. Por lo que podría ser un factor clave en la regulación de la reprogramación metabólica que acompaña la inducción de la senescencia.

En suma, estos resultados contribuyen a comprender las adaptaciones metabólicas en la senescencia inducida por la terapia y proporcionan información para el diseño de senolíticos y senomórficos dirigidos al metabolismo energético y la dinámica mitocondrial.

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

- Martínez J, Tarallo D, Martínez-Palma L, Victoria S, Bresque M, Rodríguez-Bottero S, Marmisolle I, Escande C, Cassina P, Casanova G, Bollati-Fogolín M, Agorio C, Moreno M, Quijano C. *Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells*. *Biochemical Journal* (2019) 476 2463–2486.
- Martínez J, Marmisolle I, Tarallo D, Quijano C. *Mitochondrial Bioenergetics and Dynamics in Secretion Processes*. *Front. Endocrinol.* (2020) 11:319

Perspectivas

Nuestros resultados muestran la relevancia de la mitocondria, en particular de las proteínas de dinámica mitocondrial en la senescencia, especialmente en la secreción de proteínas por las células senescentes. Sin embargo, se necesitan más estudios que proporcionen información mecanicista sobre el papel de las mitofusinas en la síntesis y secreción de IL-6 y otros componentes del secretoma senescente, así como sobre la regulación de la expresión de las mitofusinas en la senescencia celular. En este sentido, aspiramos a la identificación de los actores y mecanismos involucrados en estos eventos. También esperamos trasladar nuestros estudios a otros modelos de senescencia celular y al modelo animal, una herramienta muy útil para el estudio de la senescencia celular en el contexto tumoral *in vivo*, evaluando si las proteínas de dinámica mitocondrial son importantes para secreción de proteínas. Pensamos que estos estudios ayudarán a la comprensión de los efectos de la terapia y colaborarán al desarrollo de nuevas opciones terapéuticas más efectivas para el tratamiento del melanoma metastásico.

También nos interesa seguir evaluando la vinculación entre la adquisición del fenotipo secretor y las alteraciones a nivel mitocondrial en las células senescentes. En este sentido, planteamos continuar con el estudio del rol de NOTCH1 en la senescencia identificando que proteínas del metabolismo energético, la biogénesis y dinámica mitocondrial se encuentran reguladas por este factor.

Agradecimientos

A Celia por ser una excelente tutora y elegirme en el año 2013 para trabajar en este proyecto. Por todo lo que me enseñó estos años y por depositar su confianza en mí. Por siempre tener una palabra de aliento cuando las cosas no iban como esperaba (en el laboratorio y en la vida). Por los momentos compartidos y contagiarme su motivación y alegría!

A Caroline por su gran apoyo, orientación y dedicación todos estos años. Por la confianza y por la visión clínica que siempre aportó al proyecto.

A María Moreno que me enseñó mucho y porque siempre me recibió con mucha alegría y disposición en su laboratorio.

A Rafael Radi por el espacio en el Ceinbio, por su apoyo y por generar instancias muy enriquecedoras de intercambio y discusiones.

A todas las personas que han colaborado en este proyecto: Mariela Bollati, Sabina Victoria, Paula Céspedes, Carlos Escande, Mariana Bresque, Gabriela Cassanova, Rosario Durán, Alejandro Leyva, Patricia Cassina, Laura Martínez y Sebastián Rodríguez.

A Mariana por enseñarme a usar el microscopio confocal y por la buena onda con que siempre me esperaba para ver las mitocondrias fluorescentes.

A los integrantes de la CAS: Eduardo Osinaga, Mercedes Rodríguez y Patricia Cassina por sus aportes.

A los integrantes del Tribunal: Gustavo Salinas, Florencia Irigoín y Mercedes Rodríguez.

A las agencias financiadoras por las becas y el apoyo financiero de proyectos: ANII, CSIC, PEDECIBA, Espacio interdisciplinario y Roche.

A todos mis compañeros del laboratorio por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A Pao, Vicky, Dani, Nico, Diego y Carlos que con su labor diario nos facilitan el trabajo.

A la Facultad de Medicina y el Depto. de Bioquímica por las instalaciones y la oportunidad de desarrollo docente.

A Gabi, Flo, Ine, Mechi y Pati que son las grandes amigas que este doctorado me regaló. Por su amistad, su apoyo, las vacaciones, las risas y las lágrimas. A Ine y Pati por los sobrinos del corazón, Franco y Alfonsina, que nos llenan de alegría.

A Dome por su amistad, por ayudarme y siempre estar disponible para hacer juntas algún experimento y por el nuevo sobrino del corazón, Felipe.

A Mauri, Niko, Nico y Santi que son los amigos que este doctorado me regaló; y me han ayudado y aportado muchas ideas.

A Lu, Noel y Caro por ser tan divertidas y porque siempre están disponibles para ayudar con algún experimento.

A mis amig@s de facultad: Marian, Caro, Pablo, Fefa, Anita, Elena, Ceci y Vero por su apoyo y por estar siempre.

A mis amigas de la vida Flo, Lu, Vir, Nati O, Caro, Lau y Nati C, Pau y Noe por el camino recorrido juntas.

A mi familia por el sostén de cada día. A mis padres que sin su apoyo nada de esto hubiese sido posible y a mis hermanos y a mi abuela por su cariño. A Rafa por la familia en proceso de construcción, por su amor y por su apoyo incondicional en todos los momentos de este doctorado y todos los años compartidos. Por alegrarme la vida!

Referencias

- 1 Uong, A. and Zon, L. I. (2010) Melanocytes in development and cancer. *J. Cell. Physiol.*, Wiley Online Library **222**, 38–41.
- 2 Bertolotto, C. (2013) Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica (Cairo)*., Hindawi **2013**.
- 3 COMISION HONORARIA DE LUCHA CONTRA EL CANCER. (2019) Incidencia del cáncer en el quinquenio 2011-2015. Tendencia de la mortalidad por cáncer hasta 2017.
- 4 Organization, W. H. Global Cancer Observatory.
- 5 de la Fuente-García, A. and Ocampo-Candiani, J. (2010) Melanoma cutáneo. *Gac. Med. Mex.* **146**, 126–135.
- 6 Domingues, B., Lopes, J. M. J., Soares, P., Populo, H. and Pópulo, H. (2018) Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.*, Dove Press **7**, 35.
- 7 Tentori, L., Lacal, P. M. and Graziani, G. (2013) Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol. Sci.*, Elsevier Ltd **34**, 656–666.
- 8 Shah, D. J. and Dronca, R. S. (2014) Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma. In *Mayo Clinic Proceedings*, pp 504–519, Elsevier.
- 9 Bhatia, S., Tykodi, S. S. and Thompson, J. A. (2009) Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncol. (willist. Park. NY)*, NIH Public Access **23**, 488.
- 10 Patterson, L. H. and Murray, G. I. (2002) Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Curr. Pharm. Des.*, Bentham Science Publishers **8**, 1335–1347.
- 11 Spassova, M. K. and Golovinsky, E. V. (1985) Pharmacobiochemistry of arylalkyltriazenes and their application in cancer chemotherapy. *Pharmacol. Ther.*, Elsevier **27**, 333–352.
- 12 Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F. G., Tsang, L. L. H. and Slack, J. A. (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*, ACS Publications **33**, 9045–9051.
- 13 Marchesi, F., Turriziani, M., Tortorelli, G., Avvisati, G., Torino, F. and De Vecchis, L. (2007) Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol. Res.*, Elsevier **56**, 275–287.
- 14 Verbeek, B., Southgate, T. D., Gilham, D. E. and Margison, G. P. (2008) O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br. Med. Bull.*, Citeseer **85**.
- 15 Naumann, S. C., Roos, W. P., Jöst, E., Belohlavek, C., Lennerz, V., Schmidt, C. W., Christmann, M. and Kaina, B. (2009) Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: Response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br. J. Cancer* **100**, 322–333.
- 16 Knizhnik, A. V., Roos, W. P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K. H., Christmann, M. and Kaina, B. (2013) Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage. *PLoS One* **8**, 1–12.
- 17 Luke, J. J. and Schwartz, G. K. (2013) Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin. Dermatol.*, Elsevier **31**, 290–297.
- 18 Hill, G. J., Krementz, E. T. and Hill, H. Z. (1984) Dimethyl triazeno imidazole carboxamide and combination therapy for melanoma IV. Late results after complete response to chemotherapy (central oncology group protocols 7130, 7131, and 7131A). *Cancer*, Wiley Online Library **53**, 1299–1305.
- 19 Quirbt, I., Verma, S., Petrella, T., Bak, K. and Charette, M. (2007) Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma. *Curr. Oncol.* **14**, 27–33.
- 20 Cantwell-Dorris, E. R., O'Leary, J. J. and Sheils, O. M. (2011) BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and

Molecular Therapy. Mol. Cancer Ther. **10**, 385–394.

- 21 Dhomen, N. and Marais, R. (2009) BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol. Clin.*, Elsevier **23**, 529–545.
- 22 Tsai, J., Lee, J. T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J. and Haass, N. K. (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **105**, 3041–3046.
- 23 Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R. C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M. K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010) Melanomas acquire resistance to B-Raf(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, Nature Publishing Group **468**, 973–977.
- 24 Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L. V., Hassel, J. C., Rutkowski, P. and Mohr, P. (2012) Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.*, Mass Medical Soc **367**, 107–114.
- 25 Rosenberg, S. A., Mule, J. J., Spiess, P. J., Reichert, C. M. and Schwarz, S. L. (1985) Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. Exp. Med.* **161**, 1169–1188.
- 26 Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M. and Rosenberg, S. A. (2000) High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: Long-term survival update. *Cancer J. Sci. Am.* **6**, S11–4.
- 27 Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D. and Hassel, J. C. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, Mass Medical Soc **363**, 711–723.
- 28 McCoy, K. D. and Le Gros, G. (1999) The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol. Cell Biol.*, Wiley Online Library **77**, 1–10.
- 29 Alegre, M.-L., Frauwirth, K. A. and Thompson, C. B. (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.*, Nature Publishing Group **1**, 220–228.
- 30 Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, Annual Reviews **26**, 677–704.
- 31 Francisco, L. M., Sage, P. T. and Sharpe, A. H. (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, Wiley Online Library **236**, 219–242.
- 32 Fife, B. T. and Pauken, K. E. (2011) The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Wiley Online Library **1217**, 45–59.
- 33 Ramos, P. and Bentires-Alj, M. (2015) Mechanism-based cancer therapy: resistance to therapy, therapy for resistance. *Oncogene*, Nature Publishing Group **34**, 3617–3626.
- 34 Roskoski Jr, R. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.*, Elsevier **66**, 105–143.
- 35 Cheng, Y., Zhang, G. and Li, G. (2013) Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, Springer **32**, 567–584.
- 36 Pochanard, P., Johannessen, C. M., Meyerson, M., Emery, C., Sawyer, A., Kehoe, S. M., MacConaill, L. E., Davis, M. J., Garraway, L. A., Hahn, W. C., et al. (2011) Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3085–3096.
- 37 Montagut, C., Sharma, S. V., Shioda, T., McDermott, U., Ulman, M., Ulkus, L. E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D. Y. and Singh, A. (2008) Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.*, AACR **68**, 4853–4861.
- 38 Wellbrock, C. (2014) MAPK pathway inhibition in melanoma: resistance three ways. *Biochem. Soc. Trans.*, Portland Press **42**, 727–732.

- 39 Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., Lichinitser, M., Dummer, R., Grange, F. and Mortier, L. (2015) Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N. Engl. J. Med., Mass Medical Soc* **372**, 30–39.
- 40 Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R. F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J. and Ibrahim, N. (2012) Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N. Engl. J. Med., Mass Medical Soc* **367**, 1694–1703.
- 41 Long, G. V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., De Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A. and Grob, J.-J. (2015) Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet, Elsevier* **386**, 444–451.
- 42 Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K. and Hirth, P. (2012) Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov., Nature Publishing Group* **11**, 873–886.
- 43 Hölzel, M., Bovier, A. and Tüting, T. (2013) Plasticity of tumour and immune cells: a source of heterogeneity and a cause for therapy resistance? *Nat. Rev. Cancer, Nature Publishing Group* **13**, 365–376.
- 44 Clínica, C. de O. (2019) *Pautas de oncologia medica* 257.
- 45 Jenkins, R. W. and Fisher, D. E. (2020) *Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. J. Invest. Dermatol., Elsevier*.
- 46 Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res., Citeseer* **37**, 614–636.
- 47 di Fagagna, F., d'Adda, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P. and Jackson, S. P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature, Nature Publishing Group* **426**, 194–198.
- 48 Chang, B.-D. B.-D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V. and Roninson, I. B. (2002) Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **99**, 389–394.
- 49 Lin, A. W., Barradas, M., Stone, J. C., van Aelst, L., Serrano, M. and Lowe, S. W. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev., Cold Spring Harbor Lab* **12**, 3008–3019.
- 50 Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. and Lowe, S. W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell, Elsevier* **88**, 593–602.
- 51 Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., Maestro, R., et al. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature, Nature Publishing Group* **444**, 638–642.
- 52 Toso, A., Revandkar, A., Di Mitri, D., Guccini, I., Proietti, M., Sarti, M., Pinton, S., Zhang, J., Kalathur, M., Civenni, G., et al. (2014) Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep., Elsevier* **9**, 75–89.
- 53 Rodier, F. and Campisi, J. (2011) Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192**, 547–556.
- 54 Campisi, J., D'Adda Di Fagagna, F., Di Fagagna, F. D. and D'Adda Di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol., Nature Publishing Group* **8**, 729–740.
- 55 Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. and Campisi, J. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J., John Wiley & Sons, Ltd Chichester, UK* **22**, 4212–4222.
- 56 D'Adda Di Fagagna, F. (2008) Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 512–522.
- 57 Shiloh, Y. and Ziv, Y. (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and

- more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Nature Publishing Group **14**, 197–210.
- 58 Zou, L. (2007) Single-and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response. *Genes Dev.*, Cold Spring Harbor Lab **21**, 879–885.
 - 59 Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M. R. and Elledge, S. J. (2003) MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, Nature Publishing Group **421**, 961–966.
 - 60 Abraham, R. T. (2002) Checkpoint signalling: focusing on 53BP1. *Nat. Cell Biol.*, Nature Publishing Group **4**, E277.
 - 61 Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., Manis, J. P., Van Deursen, J., Nussenzweig, A. and Paull, T. T. (2006) MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell*, Elsevier **21**, 187–200.
 - 62 Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J. and Lukas, J. (2005) Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J. Cell Biol.*, Rockefeller University Press **170**, 201–211.
 - 63 Buscemi, G., Perego, P., Carenini, N., Nakanishi, M., Chessa, L., Chen, J., Khanna, K. and Delia, D. (2004) Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene*, Nature Publishing Group **23**, 7691–7700.
 - 64 Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M. B., Bartek, J. and Lukas, J. (2006) Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.*, Rockefeller University Press **173**, 195–206.
 - 65 Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuåsen, R. G., Welcker, M., Bartek, J. and Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* (80-), American Association for the Advancement of Science **288**, 1425–1429.
 - 66 Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.*, Elsevier **420**, 25–27.
 - 67 Cheng, Q. and Chen, J. (2010) Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell cycle*, Taylor & Francis **9**, 472–478.
 - 68 Poyurovsky, M. V., Katz, C., Laptenko, O., Beckerman, R., Lokshin, M., Ahn, J., Byeon, I.-J. L., Gabizon, R., Mattia, M. and Zupnick, A. (2010) The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, Nature Publishing Group **17**, 982–989.
 - 69 Vassilev, L. T. (2013) In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2 **844**.
 - 70 Sdek, P., Ying, H., Chang, D. L. F., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M. J. and Xiao, Z.-X. J. (2005) MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol. Cell*, Elsevier **20**, 699–708.
 - 71 Bakkenist, C. J. and Kastan, M. B. (2004) Initiating cellular stress responses. *Cell*, Elsevier **118**, 9–17.
 - 72 Pluquet, O. and Hainaut, P. (2001) Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett.*, Elsevier **174**, 1–15.
 - 73 Khanna, K. K., Keating, K. E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D. and Lees-Miller, S. P. (1998) ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat. Genet.*, Nature Publishing Group **20**, 398–400.
 - 74 Karimian, A., Ahmadi, Y. and Yousefi, B. (2016) Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst.)*, Elsevier **42**, 63–71.
 - 75 Taylor, W. R. and Stark, G. R. (2001) Regulation of the G2 / M transition by p53 **1**.
 - 76 Gil, J. and Peters, G. (2006) Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for

all. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **7**, 667–677.

- 77 Mirzayans, R., Andrais, B., Hansen, G. and Murray, D. (2012) Role of p16INK4A in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochem. Res. Int.*, Hindawi Publishing Corporation **2012**.
- 78 Campisi, J. (2012) Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705.
- 79 Giacinti, C. and Giordano, A. (2006) RB and cell cycle progression. *Oncogene* **25**, 5220–5227.
- 80 Narita, M. M., Núñez Edith, S. 1-H., Narita, M. M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., Lowe, S. W., Núñez, S., Heard, E., et al. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703–716.
- 81 Muñoz-espín, D. and Serrano, M. (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **15**, 482–496.
- 82 Young, A. R. J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J. F. J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S. and Watt, F. M. (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.*, Cold Spring Harbor Lab **23**, 798–803.
- 83 Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I. and Pereira-Smith, O. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **92**, 9363–9367.
- 84 Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J. and Peeper, D. S. (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, Elsevier **133**, 1019–1031.
- 85 Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y. U., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y. and Campisi, J. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.*, Public Library of Science **6**.
- 86 Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C. M., Parrinello, S., Hodgson, J. G., Chin, K., Desprez, P.-Y. and Campisi, J. (2010) A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*, Public Library of Science **5**.
- 87 Acosta, J. C., O'Loughlin, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C. and Popov, N. (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, Elsevier **133**, 1006–1018.
- 88 Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F. and Andrulis, M. (2013) A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.*, Nature Publishing Group **15**, 978–990.
- 89 Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R. and Campisi, J. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.*, Nature Publishing Group **11**, 973–979.
- 90 Gonzalez-Meljem, J. M., Apps, J. R., Fraser, H. C. and Martinez-Barbera, J. P. (2018) Paracrine roles of cellular senescence in promoting tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, Nature Publishing Group **118**, 1283.
- 91 Jin, J., Ang, X. L., Ye, X., Livingstone, M. and Harper, J. W. (2008) Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *J. Biol. Chem., ASBMB* **283**, 19322–19328.
- 92 Sulli, G., Di Micco, R. and Di Fagagna, F. D. A. (2012) Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, Nature Publishing Group **12**, 709–720.
- 93 Saleh, T., Tyutyuk-Massey, L., Cudjoe Jr, E. K., Idowu, M. O., Landry, J. W. and Gewirtz, D. A. (2018) Non-cell autonomous effects of the senescence-associated secretory phenotype in cancer therapy. *Front. Oncol.*

- 94 Yuan, A., Chen, J. J., Yao, P.-L. and Yang, P.-C. (2005) The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci* **10**, 853–865.
- 95 Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K. and Campisi, J. (2009) Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **106**, 17031–17036.
- 96 Liu, D. and Hornsby, P. J. (2007) Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res., AACR* **67**, 3117–3126.
- 97 Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S. and Nelson, P. S. (2006) The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res., AACR* **66**, 794–802.
- 98 Kandhaya-Pillai, R., Miro-Mur, F., Alijotas-Reig, J., Tchkonja, T., Kirkland, J. L. and Schwartz Jr, S. (2017) TNF α -senescence initiates a STAT-dependent positive feedback loop, leading to a sustained interferon signature, DNA damage, and cytokine secretion. *Aging (Albany NY), Impact Journals, LLC* **9**, 2411.
- 99 Italiani, P. and Boraschi, D. (2014) From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol., Frontiers* **5**, 514.
- 100 Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. and Campisi, J. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., Annual Reviews* **5**, 99–118.
- 101 Bernardini, G., Benigni, G., Antonangeli, F., Ponzetta, A. and Santoni, A. (2014) Multiple levels of chemokine receptor regulation in the control of mouse natural killer cell development. *Front. Immunol., Frontiers* **5**, 44.
- 102 Zhang, L.-M., Zhang, J., Zhang, Y., Fei, C., Wang, L., Yi, Z.-W. and Zhang, Z.-Q. (2019) Interleukin-18 promotes fibroblast senescence in pulmonary fibrosis through down-regulating Klotho expression. *Biomed. Pharmacother., Elsevier* **113**, 108756.
- 103 Tominaga, K. and Suzuki, H. I. (2019) TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *Int. J. Mol. Sci., Multidisciplinary Digital Publishing Institute* **20**, 5002.
- 104 Kim, E. K., Moon, S., Kim, D. K., Zhang, X. and Kim, J. (2018) CXCL1 induces senescence of cancer-associated fibroblasts via autocrine loops in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One, Public Library of Science San Francisco, CA USA* **13**, e0188847.
- 105 Iannello, A., Thompson, T. W., Ardolino, M., Lowe, S. W. and Raulet, D. H. (2013) p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J. Exp. Med., The Rockefeller University Press* **210**, 2057–2069.
- 106 Sagiv, A. and Krizhanovsky, V. (2013) Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology, Springer* **14**, 617–628.
- 107 Vilgelm, A. E., Johnson, C. A., Prasad, N., Yang, J., Chen, S.-C., Ayers, G. D., Pawlikowski, J. S., Raman, D., Sosman, J. A. and Kelley, M. (2016) Connecting the dots: therapy-induced senescence and a tumor-suppressive immune microenvironment. *JNCI J. Natl. Cancer Inst., Oxford University Press* **108**.
- 108 Bromley, S. K., Mempel, T. R. and Luster, A. D. (2008) Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol., Nature Publishing Group* **9**, 970–980.
- 109 Wajapeyee, N., Serra, R., Mahalingam, M. and Michael, R. (2008) Oncogenic BRAF Induces Senescence Through an Autocrine / Paracrine Pathway Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363–374.
- 110 Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J. and Beauséjour, C. M. (2006) Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem., ASBMB* **281**, 29568–29574.
- 111 Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J. and Demaria, M. (2017) Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells. *Curr. Biol., Elsevier* **27**, 2652–2660.

- 112 Ito, Y., Hoare, M. and Narita, M. (2017) Spatial and temporal control of senescence. *Trends Cell Biol.*, Elsevier **27**, 820–832.
- 113 Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B. A., Campisi, J. and Elledge, S. J. (2015) The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* (80-), American Association for the Advancement of Science **349**, aaa5612.
- 114 Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premrsirut, P., Luo, W., Chicas, A. and Lee, C. S. (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.*, Cold Spring Harbor Lab **25**, 2125–2136.
- 115 Tomimatsu, K. and Narita, M. (2015) Translating the effects of mTOR on secretory senescence. *Nat. Cell Biol.*, Nature Publishing Group **17**, 1230–1232.
- 116 Hoare, M., Ito, Y., Kang, T.-W. W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A., Shetty, S., Parry, A. J., Menon, S., Salama, R., et al. (2016) NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat. Cell Biol.*, Nature Publishing Group **18**, 979.
- 117 Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H. and Dollé, M. E. T. (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell*, Elsevier **31**, 722–733.
- 118 Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*, Elsevier **132**, 344–362.
- 119 Chen, L.-F. and Greene, W. C. (2004) Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **5**, 392–401.
- 120 Rothwarf, D. M. and Karin, M. (1999) The NF- κ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE*, American Association for the Advancement of Science **1999**, re1–re1.
- 121 Hinz, M. and Scheidereit, C. (2014) The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep.*, John Wiley & Sons, Ltd **15**, 46–61.
- 122 Karin, M. and Greten, F. R. (2005) NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.*, Nature Publishing Group **5**, 749–759.
- 123 Salminen, A., Kauppinen, A. and Kaarniranta, K. (2012) Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell. Signal.*, Elsevier **24**, 835–845.
- 124 Karin, M. (2006) Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, Nature Publishing Group **441**, 431–436.
- 125 Ruland, J. (2011) Return to homeostasis: downregulation of NF- κ B responses. *Nat. Immunol.*, Nature Publishing Group **12**, 709.
- 126 Luo, J.-L., Kamata, H. and Karin, M. (2005) IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death—a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Invest.*, Am Soc Clin Investig **115**, 2625–2632.
- 127 Liu, T., Zhang, L., Joo, D. and Sun, S.-C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.*, Nature Publishing Group **2**, 1–9.
- 128 Ohanna, M., Giuliano, S., Bonet, C., Imbert, V., Hofman, V., Zangari, J., Bille, K., Robert, C., Bressac-de Paillerets, B., Hofman, P., et al. (2011) Senescent cells develop a parg-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev.* **25**, 1245–1261.
- 129 Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S. Ç., Khanna, K. K., Dittmar, G. and Scheidereit, C. (2010) A cytoplasmic ATM-TRAF6-clAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF- κ B activation. *Mol. Cell*, Elsevier **40**, 63–74.
- 130 Malaquin, N., Carrier-Leclerc, A., Dessureault, M. and Rodier, F. (2015) DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front. Genet.*, Frontiers **6**, 94.

- 131 Freund, A., Patil, C. K. and Campisi, J. (2011) P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* **30**, 1536–1548.
- 132 Bray, S. J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **7**, 678–689.
- 133 Borggrefe, T. and Oswald, F. (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell. Mol. life Sci.*, Springer **66**, 1631–1646.
- 134 Liu, Z.-J., Tan, Y., Beecham, G. W., Seo, D. M., Tian, R., Li, Y., Vazquez-Padron, R. I., Pericak-Vance, M., Vance, J. M. and Goldschmidt-Clermont, P. J. (2012) Notch activation induces endothelial cell senescence and pro-inflammatory response: implication of Notch signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, Elsevier **225**, 296–303.
- 135 Venkatesh, D., Fredette, N., Rostama, B., Tang, Y., Vary, C. P. H., Liaw, L. and Urs, S. (2011) RhoA-mediated signaling in Notch-induced senescence-like growth arrest and endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, Am Heart Assoc **31**, 876–882.
- 136 Kagawa, S., Natsuizaka, M., Whelan, K. A., Facompre, N., Naganuma, S., Ohashi, S., Kinugasa, H., Egloff, A. M., Basu, D. and Gimotty, P. A. (2015) Cellular senescence checkpoint function determines differential Notch1-dependent oncogenic and tumor-suppressor activities. *Oncogene*, Nature Publishing Group **34**, 2347–2359.
- 137 Cui, H., Kong, Y., Xu, M. and Zhang, H. (2013) Notch3 functions as a tumor suppressor by controlling cellular senescence. *Cancer Res.*, AACR **73**, 3451–3459.
- 138 Sörensen-Zender, I., Rong, S., Susnik, N., Zender, S., Pennekamp, P., Melk, A., Haller, H. and Schmitt, R. (2014) Renal tubular Notch signaling triggers a prosenescent state after acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Physiol.*, American Physiological Society Bethesda, MD **306**, F907–F915.
- 139 Tagami, S., Okochi, M., Yanagida, K., Ikuta, A., Fukumori, A., Matsumoto, N., Ishizuka-Katsura, Y., Nakayama, T., Itoh, N. and Jiang, J. (2008) Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Mol. Cell. Biol.*, Am Soc Microbiol **28**, 165–176.
- 140 Schroeter, E. H., Kisslinger, J. A. and Kopan, R. (1998) Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, Nature Publishing Group **393**, 382–386.
- 141 Fiúza, U.-M. and Arias, A. M. (2007) Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.*, BioScientifica **194**, 459–474.
- 142 Kopan, R. and Ilagan, M. X. G. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, Elsevier **137**, 216–233.
- 143 Bray, S. J. (2016) Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **17**, 722.
- 144 Palomero, T., Lim, W. K., Odom, D. T., Sulis, M. L., Real, P. J., Margolin, A., Barnes, K. C., O’Neil, J., Neuberg, D. and Weng, A. P. (2006) NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, National Acad Sciences **103**, 18261–18266.
- 145 Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., del Bianco, C., Rodriguez, C. G., Sai, H. and Tobias, J. (2006) c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.*, Cold Spring Harbor Lab **20**, 2096–2109.
- 146 Minter, L. M. and Osborne, B. A. (2012) Canonical and non-canonical Notch signaling in CD4+ T cells. In *Notch regulation of the immune system*, pp 99–114, Springer.
- 147 Ayaz, F. and Osborne, B. A. (2014) Non-canonical notch signaling in cancer and immunity. *Front. Oncol.*, Frontiers **4**, 345.
- 148 Malaquin, N., Martinez, A. and Rodier, F. (2016) Keeping the senescence secretome under control: molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp. Gerontol.*, Elsevier **82**, 39–49.
- 149 Sheppard, K. E. and McArthur, G. A. (2013) The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in

melanoma, AACR.

- 150 Goel, V. K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F. S., Hinds, P. W. and Haluska, F. G. (2009) Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene*, Nature Publishing Group **28**, 2289–2298.
- 151 Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Van Der Horst, C. M. A. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J. and Peeper, D. S. (2005) BRAF E600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, Nature Publishing Group **436**, 720–724.
- 152 Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A. and Mosieniak, G. (2019) Targeting normal and cancer senescent cells as a strategy of senotherapy. *Ageing Res. Rev.*, Elsevier **55**, 100941.
- 153 Collado, M. and Serrano, M. (2010) Senescence in tumours: Evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer*, Nature Publishing Group **10**, 51–57.
- 154 Milanovic, M., Fan, D. N. Y., Belenki, D., Däbritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J. R., Dimitrova, L., Lenze, D. and Barbosa, I. A. M. (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*, Nature Publishing Group **553**, 96–100.
- 155 Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y. and Campisi, J. (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **98**, 12072–12077.
- 156 Kuilman, T. and Peeper, D. S. (2009) Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 81–94.
- 157 Di Mitri, D. and Alimonti, A. (2016) Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends Cell Biol.*, Elsevier Ltd **26**, 215–226.
- 158 Yang, G., Rosen, D. G., Zhang, Z., Bast, R. C., Mills, G. B., Colacino, J. A., Mercado-Urbe, I. and Liu, J. (2006) The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 16472–16477.
- 159 Mhaidat, N. M., Zhang, X. D., Allen, J., Avery-Kiejda, K. A., Scott, R. J. and Hersey, P. (2007) Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *Br. J. Cancer* **97**, 1225–1233.
- 160 Haferkamp, S., Borst, A., Adam, C., Becker, T. M., Motschenbacher, S., Windhövel, S., Hufnagel, A. L., Houben, R. and Meierjohann, S. (2013) Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1601–1609.
- 161 Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G. J. J. E., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J., Blank, C., Wesseling, J., Willems, S. M., et al. (2014) Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*, Nature Publishing Group **508**, 118–122.
- 162 Schick, U., Kyula, J., Barker, H., Patel, R., Zaidi, S., Gregory, C., Hafsi, H., Roulstone, V., Deutsch, E., McLaughlin, M., et al. (2015) Trametinib radiosensitises RAS- and BRAF-mutated melanoma by perturbing cell cycle and inducing senescence. *Radiother. Oncol.*, Elsevier **117**, 364–375.
- 163 Obenauf, A. C., Zou, Y., Ji, A. L., Vanharanta, S., Shu, W., Shi, H., Kong, X., Bosenberg, M. C., Wiesner, T. and Rosen, N. (2015) Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature*, Nature Publishing Group **520**, 368–372.
- 164 Ohanna, M., Bonet, C., Bille, K., Allegra, M., Davidson, I., Bahadoran, P., Lacour, J.-P., Ballotti, R. and Bertolotto, C. (2015) SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Oncotarget* **5**.
- 165 Colombini, M., Blachly-Dyson, E. and Forte, M. (1996) VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. In *Ion channels*, pp 169–202, Springer.
- 166 Nunnari, J. and Suomalainen, A. (2012) Review Mitochondria : In *Sickness and in Health*. Cell, Elsevier Inc. **148**,

1145–1159.

- 167 Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F. and Neupert, W. (2011) The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J., John Wiley & Sons, Ltd* **30**, 4356–4370.
- 168 Cogliati, S., Enriquez, J. A. and Scorrano, L. (2016) Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality. *Trends Biochem. Sci., Elsevier* **41**, 261–273.
- 169 Spinelli, J. B. and Haigis, M. C. (2018) The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat. Cell Biol., Nature Publishing Group* **20**, 745–754.
- 170 Neupane, P., Bhujju, S., Thapa, N. and Bhattarai, H. K. (2019) ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition. *Biomol. Concepts, De Gruyter* **10**, 1–10.
- 171 Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W. and Walker, J. E. (2010) Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **107**, 16823–16827.
- 172 Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewicz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V. and Kühlbrandt, W. (2011) Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **108**, 14121–14126.
- 173 Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A. and Enriquez, J. A. (2008) Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol. Cell* **32**, 529–539.
- 174 Letts, J. A. and Sazanov, L. A. (2017) Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat. Struct. Mol. Biol., Nature Publishing Group* **24**, 800.
- 175 Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M. E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A. and Gomes, L. C. (2013) Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell, Elsevier* **155**, 160–171.
- 176 Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L. and Trostchansky, A. (2016) Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol., Elsevier* **8**, 28–42.
- 177 Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol., Wiley Online Library* **552**, 335–344.
- 178 Radi, R. (2018) Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **115**, 5839–5848.
- 179 Cox, A. G., Winterbourn, C. C. and Hampton, M. B. (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J., Portland Press Ltd.* **425**, 313–325.
- 180 Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem., ASBMB* **264**, 7761–7764.
- 181 Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature, Nature Publishing Group* **408**, 239.
- 182 Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C. and Castro, L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med., Elsevier* **33**, 1451–1464.
- 183 Nelson, G., Kucheryavenko, O., Wordsworth, J. and von Zglinicki, T. (2018) The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. *Mech. Ageing Dev., Elsevier* **170**, 30–36.
- 184 Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al. (2010) Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 1–14.
- 185 Rodier, F., Muñoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour,

- C. M. and Kim, S.-H. (2011) DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci., The Company of Biologists Ltd* **124**, 68–81.
- 186 Brown, G. C., Murphy, M. P., Jornayvaz, F. R. and Shulman, G. I. (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem., Portland Press* **47**, 69–84.
- 187 Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr. Rev., Oxford University Press* **24**, 78–90.
- 188 Liang, H. and Ward, W. F. (2006) PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ., American Physiological Society* **30**, 145–151.
- 189 St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J. M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J. and Yang, W. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell, Elsevier* **127**, 397–408.
- 190 Virbasius, J. V and Scarpulla, R. C. (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **91**, 1309–1313.
- 191 Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., et al. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell, Elsevier* **98**, 115–124.
- 192 Fernandez-Marcos, P. J. and Auwerx, J. (2011) Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Clin. Nutr., Oxford University Press* **93**, 884S–890S.
- 193 Gureev, A. P., Shaforostova, E. A. and Popov, V. N. (2019) Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways. *Front. Genet., Frontiers* **10**, 435.
- 194 Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell, Elsevier* **92**, 829–839.
- 195 Boss, O., Bachman, E., Vidal-Puig, A., Zhang, C.-Y., Peroni, O. and Lowell, B. B. (1999) Role of the β 3-adrenergic receptor and/or a putative β 4-adrenergic receptor on the expression of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun., Academic Press* **261**, 870–876.
- 196 Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C. and Puigserver, P. (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature, Nature Publishing Group* **413**, 179–183.
- 197 Jäger, S., Handschin, C., Pierre, J. S.- and Spiegelman, B. M. (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **104**, 12017–12022.
- 198 Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P. and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature, Nature Publishing Group* **458**, 1056–1060.
- 199 Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J. C., Zhang, C.-Y., Krauss, S., Mootha, V. K., Lowell, B. B. and Spiegelman, B. M. (2001) Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1. *Mol. Cell, Elsevier* **8**, 971–982.
- 200 Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M. and Puigserver, P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature, Nature Publishing Group* **434**, 113–118.
- 201 Glick, D., Barth, S. and Macleod, K. F. (2010) Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol., Wiley Online Library* **221**, 3–12.
- 202 Rabinowitz, J. D. and White, E. (2010) Autophagy and metabolism. *Science (80-.), American Association for the*

- 203 Dikic, I. and Elazar, Z. (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **19**, 349–364.
- 204 Gamerdinger, M., Hajieva, P., Kaya, A. M., Wolfrum, U., Hartl, F. U. and Behl, C. (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J.*, John Wiley & Sons, Ltd **28**, 889–901.
- 205 Seno, K., Tanikawa, N., Takahashi, H., Ohkuchi, A., Suzuki, H., Matsubara, S., Iwata, H., Kuwayama, T. and Shirasuna, K. (2018) Oxygen concentration modulates cellular senescence and autophagy in human trophoblast cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, Wiley Online Library **79**, e12826.
- 206 Adams, P. D. (2009) Healing and Hurting: Molecular Mechanisms, Functions, and Pathologies of Cellular Senescence. *Mol. Cell*, Elsevier Inc. **36**, 2–14.
- 207 Carroll, B., Nelson, G., Rabanal-Ruiz, Y., Kucheryavenko, O., Dunhill-Turner, N. A., Chesterman, C. C., Zahari, Q., Zhang, T., Conduit, S. E. and Mitchell, C. A. (2017) Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *J. Cell Biol.*, The Rockefeller University Press **216**, 1949–1957.
- 208 Nacarelli, T., Azar, A. and Sell, C. (2016) Mitochondrial stress induces cellular senescence in an mTORC1-dependent manner. *Free Radic. Biol. Med.*, Elsevier **95**, 133–154.
- 209 Summer, R., Shaghaghi, H., Schriener, D., Roque, W., Sales, D., Cuevas-Mora, K., Desai, V., Bhushan, A., Ramirez, M. I. and Romero, F. (2019) Activation of the mTORC1/PGC-1 axis promotes mitochondrial biogenesis and induces cellular senescence in the lung epithelium. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.*, American Physiological Society Bethesda, MD **316**, L1049–L1060.
- 210 Narita, M., Young, A. R. J., Arakawa, S., Samarajiwa, S. A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L. S., Reichelt, S. and Ferreira, M. (2011) Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science (80-.)*, American Association for the Advancement of Science **332**, 966–970.
- 211 Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J. and Harper, J. W. (2015) The PINK1-PARKIN mitochondrial ubiquitylation pathway drives a program of OPTN/NDP52 recruitment and TBK1 activation to promote mitophagy. *Mol. Cell*, Elsevier **60**, 7–20.
- 212 Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I. and Youle, R. J. (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, Nature Publishing Group **524**, 309–314.
- 213 Zaffagnini, G. and Martens, S. (2016) Mechanisms of selective autophagy. *J. Mol. Biol.*, Elsevier **428**, 1714–1724.
- 214 García-Prat, L., Martínez-Vicente, M., Perdiguero, E., Ortet, L., Rodríguez-Ubreva, J., Rebollo, E., Ruiz-Bonilla, V., Gutarra, S., Ballestar, E. and Serrano, A. L. (2016) Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*, Nature Publishing Group **529**, 37–42.
- 215 Dalle Pezze, P., Nelson, G., Otten, E. G., Korolchuk, V. I., Kirkwood, T. B. L., von Zglinicki, T. and Shanley, D. P. (2014) Dynamic Modelling of Pathways to Cellular Senescence Reveals Strategies for Targeted Interventions. *PLoS Comput. Biol.* **10**.
- 216 Ahmad, T., Sundar, I. K., Lerner, C. A., Gerloff, J., Tormos, A. M., Yao, H. and Rahman, I. (2015) Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease. *FASEB J.*, Wiley Online Library **29**, 2912–2929.
- 217 Manzella, N., Santin, Y., Maggiorani, D., Martini, H., Douin-Echinard, V., Passos, J. F., Lezoualc'h, F., Binda, C., Parini, A. and Mialet-Perez, J. (2018) Monoamine oxidase-A is a novel driver of stress-induced premature senescence through inhibition of parkin-mediated mitophagy. *Aging Cell*, Wiley Online Library **17**, e12811.
- 218 Youle, R. J. and Van Der Bliek, A. M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (80-.)*, American

Association for the Advancement of Science **337**, 1062–1065.

- 219 Chen, H. and Chan, D. C. (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford University Press **14**, R283–R289.
- 220 Lee, H., Smith, S. B. and Yoon, Y. (2017) The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure. *J. Biol. Chem., ASBMB* **292**, 7115–7130.
- 221 Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M. and Chan, D. C. (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science (80-.)*, American Association for the Advancement of Science **305**, 858–862.
- 222 Ishihara, N., Eura, Y. and Mihara, K. (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci., The Company of Biologists Ltd* **117**, 6535–6546.
- 223 De Brito, O. M. and Scorrano, L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature, Nature Publishing Group* **456**, 605.
- 224 Otera, H., Wang, C., Cleland, M. M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R. J. and Mihara, K. (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol., Rockefeller University Press* **191**, 1141–1158.
- 225 Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., Chan, D. C., Loson, O. C., Song, Z., Chen, H. and Chan, D. C. (2013) Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell, Am Soc Cell Biol* **24**, 659–667.
- 226 Tieu, Q. and Nunnari, J. (2000) Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol., The Rockefeller University Press* **151**, 353–366.
- 227 Yu, R., Jin, S., Lendahl, U., Nistér, M. and Zhao, J. (2019) Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *EMBO J., John Wiley & Sons, Ltd* **38**.
- 228 Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L. and Van Der Bliek, A. M. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell, Am Soc Cell Biol* **12**, 2245–2256.
- 229 Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J. and Voeltz, G. K. (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (80-.)*, American Association for the Advancement of Science **334**, 358–362.
- 230 De Vos, K. J., Allan, V. J., Grierson, A. J. and Sheetz, M. P. (2005) Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr. Biol., Elsevier* **15**, 678–683.
- 231 Korobova, F., Gauvin, T. J. and Higgs, H. N. (2014) A role for myosin II in mammalian mitochondrial fission. *Curr. Biol., Elsevier* **24**, 409–414.
- 232 Manor, U., Bartholomew, S., Golani, G., Christenson, E., Kozlov, M., Higgs, H., Spudich, J. and Lippincott-Schwartz, J. (2015) A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife, eLife Sciences Publications Limited* **4**, e08828.
- 233 Pagliuso, A., Tham, T. N., Stevens, J. K., Lagache, T., Persson, R., Salles, A., Olivo-Marin, J., Oddos, S., Spang, A. and Cossart, P. (2016) A role for septin 2 in Drp1-mediated mitochondrial fission. *EMBO Rep., John Wiley & Sons, Ltd* **17**, 858–873.
- 234 Kar, U. P., Dey, H. and Rahaman, A. (2017) Regulation of dynamin family proteins by post-translational modifications. *J. Biosci., Springer* **42**, 333–344.
- 235 Chiong, M., Cartes-Saavedra, B., Norambuena-Soto, I., Mondaca-Ruff, D., Morales, P. E., García-a-Miguel, M. and Mellado, R. (2014) Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2**, 1–9.
- 236 Sebastián, D., Palacín, M. and Zorzano, A. (2017) Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends Mol. Med., Elsevier Ltd* **23**, 201–215.

- 237 Dolman, N. J., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Voronina, S. G., Petersen, O. H. and Tepikin, A. V. (2005) Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca²⁺ gradients in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem., ASBMB* **280**, 15794–15799.
- 238 Moltedo, O., Remondelli, P. and Amodio, G. (2019) The Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contacts and their critical role in ageing and age-associated diseases. *Front. cell Dev. Biol., Frontiers* **7**, 172.
- 239 Xia, M., Zhang, Y., Jin, K., Lu, Z., Zeng, Z. and Xiong, W. (2019) Communication between mitochondria and other organelles: a brand-new perspective on mitochondria in cancer. *Cell Biosci., BioMed Central* **9**, 27.
- 240 Prachar, J. (2003) Intimate contacts of mitochondria with nuclear envelope as a potential energy gateway for nucleo-cytoplasmic mRNA transport. *Gen. Physiol. Biophys., RAND D PRINT* **22**, 525–534.
- 241 Westermann, B. (2015) The mitochondria–plasma membrane contact site. *Curr. Opin. Cell Biol., Elsevier* **35**, 1–6.
- 242 Depaoli, M. R., Hay, J. C., Graier, W. F. and Malli, R. (2019) The enigmatic ATP supply of the endoplasmic reticulum. *Biol. Rev., Wiley Online Library* **94**, 610–628.
- 243 Elbaz, Y. and Schuldiner, M. (2011) Staying in touch: the molecular era of organelle contact sites. *Trends Biochem. Sci., Elsevier* **36**, 616–623.
- 244 Cosson, P., Marchetti, A., Ravazzola, M. and Orci, L. (2012) Mitofusin-2 independent juxtaposition of endoplasmic reticulum and mitochondria: an ultrastructural study. *PLoS One, Public Library of Science* **7**.
- 245 Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T. and Pizzo, P. (2015) Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **112**, E2174–E2181.
- 246 Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., Serafini, A., Semenzato, M., Herkenne, S., Hernández-Alvarez, M. I., et al. (2016) Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum–mitochondria tether. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 11249–11254.
- 247 Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T. and Pizzo, P. (2016) Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum-mitochondria coupling by tuning the antagonistic effect of mitofusin 2. *Cell Rep., Elsevier* **15**, 2226–2238.
- 248 Sugiura, A., Nagashima, S., Tokuyama, T., Amo, T., Matsuki, Y., Ishido, S., Kudo, Y., McBride, H. M., Fukuda, T. and Matsushita, N. (2013) MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol. Cell, Elsevier* **51**, 20–34.
- 249 Cerqua, C., Anesti, V., Pyakurel, A., Liu, D., Naon, D., Wiche, G., Baffa, R., Dimmer, K. S. and Scorrano, L. (2010) Trichoplein/mitostatin regulates endoplasmic reticulum–mitochondria juxtaposition. *EMBO Rep., John Wiley & Sons, Ltd* **11**, 854–860.
- 250 De Vos, K. J., Morotz, G. M., Stoica, R., Tudor, E. L., Lau, K.-F., Ackerley, S., Warley, A., Shaw, C. E. and Miller, C. C. J. (2012) VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet., Oxford University Press* **21**, 1299–1311.
- 251 Gomez-Suaga, P., Paillusson, S., Stoica, R., Noble, W., Hanger, D. P. and Miller, C. C. J. (2017) The ER-mitochondria tethering complex VAPB-PTPIP51 regulates autophagy. *Curr. Biol., Elsevier* **27**, 371–385.
- 252 Gómez-Suaga, P., Pérez-Nievas, B. G., Glennon, E. B., Lau, D. H. W., Paillusson, S., Mórotz, G. M., Cali, T., Pizzo, P., Noble, W. and Miller, C. C. J. (2019) The VAPB-PTPIP51 endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins are present in neuronal synapses and regulate synaptic activity. *Acta Neuropathol. Commun., BioMed Central* **7**, 35.
- 253 Raturi, A. and Simmen, T. (2013) Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res., Elsevier* **1833**, 213–224.

- 254 Lynes, E. M., Raturi, A., Shenkman, M., Sandoval, C. O., Yap, M. C., Wu, J., Janowicz, A., Myhill, N., Benson, M. D. and Campbell, R. E. (2013) Palmitoylation is the switch that assigns calnexin to quality control or ER Ca²⁺ signaling. *J Cell Sci*, The Company of Biologists Ltd **126**, 3893–3903.
- 255 Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. and Mammucari, C. (2012) Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **13**, 566–578.
- 256 De Stefani, D., Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2016) Enjoy the trip: calcium in mitochondria back and forth. *Annu. Rev. Biochem.*, Annual Reviews **85**, 161–192.
- 257 López-Crisosto, C., Bravo-Sagua, R., Rodríguez-Peña, M., Mera, C., Castro, P. F., Quest, A. F. G., Rothermel, B. A., Cifuentes, M. and Lavandero, S. (2015) ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.*, Elsevier **1852**, 2096–2105.
- 258 Bulthuis, E. P., Adjobo-Hermans, M. J. W., Willems, P. H. G. M. and Koopman, W. J. H. (2019) Mitochondrial morphofunction in mammalian cells. *Antioxid. Redox Signal.*, Mary Ann Liebert, Inc., publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New ... **30**, 2066–2109.
- 259 Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P. and Rojo, M. (2010) Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. In *Seminars in cell & developmental biology*, pp 558–565, Elsevier.
- 260 Mishra, P. and Chan, D. C. (2016) Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.*, Rockefeller University Press **212**, 379–387.
- 261 Chan, D. C. (2006) Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 79–99.
- 262 Gomes, L. C., Benedetto, G. Di and Scorrano, L. (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* **13**, 589–598.
- 263 Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R. and Kühlbrandt, W. (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.*, John Wiley & Sons, Ltd **27**, 1154–1160.
- 264 Patten, D. A., Wong, J., Khacho, M., Soubannier, V., Mailloux, R. J., Pilon-Larose, K., MacLaurin, J. G., Park, D. S., McBride, H. M. and Trinkle-Mulcahy, L. (2014) OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *EMBO J.*, John Wiley & Sons, Ltd **33**, 2676–2691.
- 265 Rambold, A. S., Kostecky, B., Elia, N. and Lippincott-Schwartz, J. (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10190–10195.
- 266 Gegg, M. E., Cooper, J. M., Chau, K.-Y., Rojo, M., Schapira, A. H. V and Taanman, J.-W. (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford University Press **19**, 4861–4870.
- 267 Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K. and Moore, D. J. (2011) Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J. Neurochem.*, Wiley Online Library **118**, 636–645.
- 268 Rakovic, A., Grünwald, A., Kottwitz, J., Brüggemann, N., Pramstaller, P. P., Lohmann, K. and Klein, C. (2011) Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS One*, Public Library of Science **6**.
- 269 Garcia, I., Innis-Whitehouse, W., Lopez, A., Keniry, M. and Gilkerson, R. (2018) Oxidative insults disrupt OPA1-mediated mitochondrial dynamics in cultured mammalian cells. *Redox Rep.*, Taylor & Francis **23**, 160–167.
- 270 Iqbal, S. and Hood, D. A. (2014) Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *Am. J. Physiol. Physiol.*, American Physiological Society Bethesda, MD **306**, C1176–C1183.
- 271 Willems, P. H. G. M., Rossignol, R., Dieteren, C. E. J., Murphy, M. P. and Koopman, W. J. H. (2015) Redox homeostasis and mitochondrial dynamics. *Cell Metab.*, Elsevier **22**, 207–218.
- 272 Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Losón, O. C., Hellberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux,

- F. and Chan, D. C. (2016) AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* (80-.), American Association for the Advancement of Science **351**, 275–281.
- 273 Herzig, S. and Shaw, R. J. (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, Nature Publishing Group **19**, 121.
- 274 Dai, W. and Jiang, L. (2019) Dysregulated Mitochondrial Dynamics and Metabolism in Obesity, Diabetes and Cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, *Frontiers* **10**, 570.
- 275 Schrepfer, E. and Scorrano, L. (2016) Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Mol. Cell*, Elsevier **61**, 683–694.
- 276 Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J. R., Lloberas, J., Camps, M. and Zierath, J. R. (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem., ASBMB* **278**, 17190–17197.
- 277 Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacín, M. and Zorzano, A. (2005) The Charcot–Marie–Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford University Press **14**, 1405–1415.
- 278 Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D. C. (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem., ASBMB* **280**, 26185–26192.
- 279 Brown, G. C. (1992) Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.*, Portland Press Ltd. **284**, 1–13.
- 280 Denton, R. M. (2009) Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics*, Elsevier **1787**, 1309–1316.
- 281 Son, J. M., Sarsour, E. H., Kakkerla Balaraju, A., Fussell, J., Kalen, A. L., Wagner, B. A., Buettner, G. R. and Goswami, P. C. (2017) Mitofusin 1 and optic atrophy 1 shift metabolism to mitochondrial respiration during aging. *Aging Cell*, Wiley Online Library **16**, 1136–1145.
- 282 Liesa, M. and Shirihai, O. S. (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.*, Elsevier Inc. **17**, 491–506.
- 283 Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. and Lippincott-Schwartz, J. (2009) A hyperfused mitochondrial state achieved at G1–S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **106**, 11960–11965.
- 284 Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., et al. (2009) SIP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* **28**, 1589–1600.
- 285 Yao, C.-H., Wang, R., Wang, Y., Kung, C.-P., Weber, J. D. and Patti, G. J. (2019) Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *Elife*, eLife Sciences Publications Limited **8**, e41351.
- 286 Marmisolle, I., Martínez, J., Liu, J., Mastrogiovanni, M., Fergusson, M. M., Rovira, I. I., Castro, L., Trostchansky, A., Moreno, M. and Cao, L. (2017) Reciprocal regulation of acetyl-CoA carboxylase 1 and senescence in human fibroblasts involves oxidant mediated p38 MAPK activation. *Arch. Biochem. Biophys.*, Elsevier **613**, 12–22.
- 287 Aird, K. M., Zhang, G., Li, H., Tu, Z., Bitler, B. G., Garipov, A., Wu, H., Wei, Z., Wagner, S. N. and Herlyn, M. (2013) Suppression of nucleotide metabolism underlies the establishment and maintenance of oncogene-induced senescence. *Cell Rep.*, Elsevier **3**, 1252–1265.
- 288 Quijano, C., Cao, L., Fergusson, M. M., Romero, H., Liu, J., Gutkind, S., Rovira, I. I., Mohny, R. P., Karoly, E. D. and Finkel, T. (2012) Oncogene-induced senescence results in marked metabolic and bioenergetic alterations. *Cell Cycle* **11**, 1383–1392.
- 289 Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X. and Ferbeyre, G. (2009) Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4495–4507.

- 290 Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. A., Mackay, G. and Der, S. H. Van. (2013) A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature*, Nature Publishing Group **498**, 109–112.
- 291 Lee, A. C., Fenster, B. E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N. S., Hirai, T., Yu, Z.-X., Ferrans, V. J., Howard, B. H. and Finkel, T. (1999) Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, ASBMB **274**, 7936–7940.
- 292 Dörr, J. R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J. H. M., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al. (2013) Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **501**, 421–425.
- 293 Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stöckl, P., Jansen-Duerr, P. and Gnaiger, E. (2004) Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem. J.*, Portland Press Limited **380**, 919–928.
- 294 Kamogashira, T., Hayashi, K., Fujimoto, C., Iwasaki, S. and Yamasoba, T. (2017) Functionally and morphologically damaged mitochondria observed in auditory cells under senescence-inducing stress. *NPJ aging Mech. Dis.*, Nature Publishing Group **3**, 2.
- 295 Zwerschke, W., Mazurek, S., Ockl, P. S. T., Utter, E. H., Eigenbrodt, E., Stöckl, P., HütTER, E., Eigenbrodt, E. and Jansen-Dürr, P. (2003) Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem. J.*, Portland Press Limited **376**, 403–411.
- 296 Yoon, Y., Yoon, D., Lim, I. K., Yoon, S., Chung, H., Rojo, M., Malka, F., Jou, M., Martinou, J. and Yoon, G. (2006) Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J. Cell. Physiol.*, Wiley Online Library **209**, 468–480.
- 297 Baraibar, M. A., Hyzewicz, J., Rogowska-Wrzesinska, A., Bulteau, A.-L. L., Prip-Buus, C., Butler-Browne, G. and Friguet, B. (2016) Impaired energy metabolism of senescent muscle satellite cells is associated with oxidative modifications of glycolytic enzymes. *Aging (Albany NY)*, Impact Journals, LLC **8**, 3375.
- 298 Saleem, A., Adhihetty, P. J. and Hood, D. A. (2008) Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol. Genomics* **37**, 58–66.
- 299 Lago, C. U., Sung, H. J., Ma, W., Wang, P. and Hwang, P. M. (2011) p53, aerobic metabolism, and cancer. *Antioxid. Redox Signal.*, Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA **15**, 1739–1748.
- 300 Hwang, P. M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T. A., Murphy, M. P., Kelso, G. F., Smith, R. A. J., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2001) Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat. Med.*, Nature Publishing Group **7**, 1111–1117.
- 301 Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilo, O., Hurley, P. J., Bunz, F. and Hwang, P. M. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science (80-)*, American Association for the Advancement of Science **312**, 1650–1653.
- 302 Park, J.-Y., Wang, P., Matsumoto, T., Sung, H. J., Ma, W., Choi, J. W., Anderson, S. A., Leary, S. C., Balaban, R. S. and Kang, J.-G. (2009) p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ. Res.*, Am Heart Assoc **105**, 705–712.
- 303 Park, J., Zhuang, J., Li, J. and Hwang, P. M. (2016) p53 as guardian of the mitochondrial genome. *FEBS Lett.*, Wiley Online Library **590**, 924–934.
- 304 DONAHUE, R. J., RAZMARA, M., HOEK, J. A. N. B. and KNUDSEN, T. B. (2001) Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function. *FASEB J.*, Wiley Online Library **15**, 635–644.
- 305 Saleem, A. and Hood, D. A. (2013) Acute exercise induces tumour suppressor protein p53 translocation to the mitochondria and promotes a p53–Tfam–mitochondrial DNA complex in skeletal muscle. *J. Physiol.*, Wiley Online Library **591**, 3625–3636.

- 306 Lee, S., Jeong, S.-Y. Y., Lim, W.-C. C., Kim, S., Park, Y.-Y. Y., Sun, X., Youle, R. J. and Cho, H. (2007) Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J. Biol. Chem., ASBMB* **282**, 22977–22983.
- 307 Park, Y. Y., Lee, S., Karbowski, M., Neutznern, A., Youle, R. J. and Cho, H. (2010) Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J. Cell Sci.* **123**, 619–626.
- 308 Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S. and Ramanathan, A. (2016) Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metab., Elsevier* **23**, 303–314.
- 309 Pérez-mancera, P. A., Young, A. R. J. and Narita, M. (2014) Inside and out : the activities of senescence in cancer. *Nat. Publ. Gr., Nature Publishing Group* 1–12.
- 310 Scott, D. A., Richardson, A. D., Filipp, F. V., Knutzen, C. A., Chiang, G. G., Ze'ev, A. R., Osterman, A. L. and Smith, J. W. (2011) Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines beyond the warburg effect. *J. Biol. Chem., ASBMB* **286**, 42626–42634.
- 311 Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science (80-)*, JSTOR **123**, 309–314.
- 312 Semenza, G. L., Artemov, D., Bedi, A., Bhujwala, Z., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Ravi, R., Simons, J. and Taghavi, P. (2001) The metabolism of tumours': 70 years later. In *Novartis Foundation symposium*, pp 251–259, Wiley Online Library.
- 313 Vazquez, F., Lim, J. H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C. B., Granter, S. R., Widlund, H. R., Spiegelman, B. M., et al. (2013) PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell, Elsevier Inc.* **23**, 287–301.
- 314 Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G. C., Frederick, D. T., Hurley, A. D., Nellore, A. and Kung, A. L. (2013) Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell, Elsevier* **23**, 302–315.
- 315 Zhang, G., Frederick, D. T., Wu, L., Wei, Z., Krepler, C., Srinivasan, S., Chae, Y. C., Xu, X., Choi, H., Dimwamwa, E., et al. (2016) Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J. Clin. Invest., Am Soc Clin Investig* **126**, 1834–1856.
- 316 Corazao-Rozas, P., Guerreschi, P., Jendoubi, M., André, F., Jonneaux, A., Scalbert, C., Garçon, G., Mallet-Martino, M., Balayssac, S., Rocchi, S., et al. (2015) Mitochondrial oxidative stress is the achilles heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* **4**.
- 317 Serasinghe, M. N., Wieder, S. Y., Renault, T. T., Elkholi, R., Asciolla, J. J., Yao, J. L., Jabado, O., Hoehn, K., Kageyama, Y., Sesaki, H., et al. (2015) Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol. Cell, Elsevier Inc.* **57**, 521–536.
- 318 Oliva, C. R., Moellering, D. R., Gillespie, G. Y. and Griguer, C. E. (2011) Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS One, Public Library of Science* **6**.
- 319 Oliva, C. R., Nozell, S. E., Diers, A., Iii, S. G. M., Sarkaria, J. N., Markert, J. M., Darley-usmar, V. M., Bailey, S. M., Gillespie, G. Y., Landar, A., et al. (2010) Acquisition of Temozolomide Chemoresistance in Gliomas Leads to Remodeling of Mitochondrial Electron Transport **285**, 39759–39767.
- 320 Shin, M.-K. and Cheong, J.-H. (2019) Mitochondria-centric bioenergetic characteristics in cancer stem-like cells. *Arch. Pharm. Res., Springer* **42**, 113–127.
- 321 Senft, D. and Ze'ev, A. R. (2016) Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol., Elsevier* **39**, 43–52.
- 322 Kashatus, J. A., Nascimento, A., Myers, L. J., Sher, A., Byrne, F. L., Hoehn, K. L., Counter, C. M. and Kashatus, D. F. (2015) Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol.*

Cell, Elsevier Inc. **57**, 537–551.

- 323 Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., et al. (2017) Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov.* **7**, 165–176.
- 324 Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., Saltness, R. A., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C. and Pezeshki, A. (2016) Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, Nature Publishing Group **530**, 184–189.
- 325 Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., Van De Sluis, B., Kirkland, J. L. and van Deursen, J. M. (2011) Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, Nature Publishing Group **479**, 232–236.
- 326 Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J. and Van Deursen, J. M. (2016) Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science (80-.)*, American Association for the Advancement of Science **354**, 472–477.
- 327 Robbins, P. D. and Niedernhofer, L. J. (2017) Advances in therapeutic approaches to extend healthspan: a perspective from the 2nd Scripps symposium on the biology of aging. *Aging Cell, Wiley Online Library* **16**, 610–614.
- 328 Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M. and Alimonti, A. (2019) Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiol. Rev.*, American Physiological Society Bethesda, MD **99**, 1047–1078.
- 329 Baker, D. J. and Petersen, R. C. (2018) Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J. Clin. Invest.*, Am Soc Clin Investig **128**, 1208–1216.
- 330 Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S. and Feng, W. (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.*, Nature Publishing Group **22**, 78–83.
- 331 Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E. and Condiotti, R. (2016) Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.*, Nature Publishing Group **7**, 1–11.
- 332 Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. and Andrews, D. W. (2013) Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, Cold Spring Harbor Lab **5**, a008714.
- 333 Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J. and Nimmer, P. (2008) ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.*, AACR **68**, 3421–3428.
- 334 Zhu, Y. I., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K. O. and Giles, C. B. (2016) Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell, Wiley Online Library* **15**, 428–435.
- 335 Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., Chung, J. W., Kim, D. H., Poon, Y. and David, N. (2017) Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.*, Nature Publishing Group **23**, 775.
- 336 Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B., Lenburg, M., et al. (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell, Wiley Online Library* **14**, 644–658.
- 337 Kucheryavenko, O., Nelson, G., von Zglinicki, T., Korolchuk, V. I. and Carroll, B. (2019) The mTORC1-autophagy pathway is a target for senescent cell elimination. *Biogerontology, Springer* **20**, 331–335.
- 338 Wang, L., de Oliveira, R. L., Wang, C., Neto, J. M. F., Mainardi, S., Evers, B., Liefink, C., Morris, B., Jochems, F. and Willemsen, L. (2017) High-throughput functional genetic and compound screens identify targets for senescence induction in cancer. *Cell Rep.*, Elsevier **21**, 773–783.

- 339 Nacarelli, T., Lau, L., Fukumoto, T., Zundell, J., Fatkhutdinov, N., Wu, S., Aird, K. M., Iwasaki, O., Kossenkova, A. V., Schultz, D., et al. (2019) NAD + metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome. *Nat. Cell Biol.*, Springer US **21**, 397–407.
- 340 Correia-Melo, C., Marques, F. D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B. M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., et al. (2016) Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J.* **35**, 724–742.
- 341 Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G. and Lockett, S. (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.*, Elsevier **86**, 3993–4003.
- 342 Dunn, K. W., Kamocka, M. M. and McDonald, J. H. (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am. J. Physiol. Physiol.*, American Physiological Society Bethesda, MD **300**, C723–C742.
- 343 Tanaka, R., Tainaka, M., Ota, T., Mizuguchi, N., Kato, H., Urabe, S., Chen, Y., Fustin, J.-M., Yamaguchi, Y. and Doi, M. (2011) Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA **59**, 791–798.
- 344 Strober, W. (2015) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.*, Wiley Online Library **111**, A3-B.
- 345 Bank, H. L. (1987) Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia*, Springer **30**, 812–816.
- 346 Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, Academic Press **25**, 402–408.
- 347 Lamanna, J. C., Salem, N., Puchowicz, M., Erokwu, B., Flask, C. and Lee, Z. (2009) Replication of murine mitochondrial DNA following irradiation. *Adv Exp Med Biol.* **645**, 301–306.
- 348 Zhang, H., Maguire, D., Swarts, S., Sun, W., Yang, S., Wang, W., Liu, C., Zhang, M., Zhang, D. and Zhang, L. (2009) Replication of murine mitochondrial DNA following irradiation. In *Oxygen Transport to Tissue XXX*, pp 43–48, Springer.
- 349 Brand, M. D. and Nicholls, D. G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.*, Portland Press Ltd. **435**, 297–312.
- 350 Salabei, J. K., Gibb, A. A. and Hill, B. G. (2014) Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. *Nat. Protoc.*, Nature Publishing Group **9**, 421–438.
- 351 Nicholls, D. G. (2013) *Bioenergetics*, Academic Press.
- 352 Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J. and Teich, J. (2007) Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. Physiol.*, American Physiological Society **292**, C125–C136.
- 353 Quijano, C., Castro, L., Peluffo, G., Valez, V. and Radi, R. (2007) Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **293**, H3404–H3414.
- 354 Puleston, D. (2015) Detection of mitochondrial mass, damage, and reactive oxygen species by flow cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press **2015**, pdb-prot086298.
- 355 Merkus, H. G. (2009) *Particle size measurements: fundamentals, practice, quality*, Springer Science & Business Media.
- 356 Song, W., Bossy, B., Martin, O. J., Hicks, A., Lubitz, S., Knott, A. B. and Bossy-Wetzel, E. (2008) Assessing mitochondrial morphology and dynamics using fluorescence wide-field microscopy and 3D image processing. *Methods*, Elsevier **46**, 295–303.
- 357 Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J.*

Cell Biol., The Rockefeller University Press **17**, 208.

- 358 Eigentler, A., Draxl, A., Wiethüchter, A., Kuznetsov, A. V., Lassing, B. and Gnaiger, E. (2012) Laboratory protocol: citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. *Mitochondrial Physiol. Netw.* **17**, 1–11.
- 359 Rice, J. E. and Lindsay, J. G. (1997) Subcellular fractionation of mitochondria. *Subcell. Fractionation A Pract. approach*, IRL Press, Oxford 107–142.
- 360 Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (80-.)*, American Association for the Advancement of Science **307**, 1098–1101.
- 361 Stewart, S. A., Dykxhoorn, D. M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E. Y., An, D. S., Sabatini, D. M., Chen, I. S. Y., Hahn, W. C. and Sharp, P. A. (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *Rna, Cold Spring Harbor Lab* **9**, 493–501.
- 362 Broad Institute. RNA interference (RNAi) Platform.
- 363 Carvalho, P. C., Lima, D. B., Leprevost, F. V., Santos, M. D. M., Fischer, J. S. G., Aquino, P. F., Moresco, J. J., Yates III, J. R. and Barbosa, V. C. (2016) Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.*, Nature Publishing Group **11**, 102.
- 364 Carvalho, P. C., Yates III, J. R. and Barbosa, V. C. (2012) Improving the TFCold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics*, Oxford University Press **28**, 1652–1654.
- 365 Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z. and Galon, J. (2009) ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics*, Oxford University Press **25**, 1091–1093.
- 366 Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S. and Eppig, J. T. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.*, Nature Publishing Group **25**, 25–29.
- 367 Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M. and Haw, R. (2020) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, Oxford University Press **48**, D498–D503.
- 368 Ontology, G. (2019) The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* **47**, D330–D338.
- 369 Ruiz, L. M., Jensen, E. L., Rossel, Y., Puas, G. I., Gonzalez-Ibanez, A. M., Bustos, R. I., Ferrick, D. A. and Elorza, A. A. (2016) Non-cytotoxic copper overload boosts mitochondrial energy metabolism to modulate cell proliferation and differentiation in the human erythroleukemic cell line K562. *Mitochondrion*, Elsevier **29**, 18–30.
- 370 Melnikova, V. O., Bolshakov, S. V., Walker, C. and Ananthaswamy, H. N. (2004) Genomic alterations in spontaneous and carcinogen-induced murine melanoma cell lines. *Oncogene* **23**, 2347–2356.
- 371 Gilant, E., Kaza, M., Szlagowska, A., Serafin-Byczak, K. and Rudzki, P. J. (2012) Validated HPLC method for determination of temozolomide in human plasma. *Acta Pol. Pharm.* **69**, 1347–1355.
- 372 Patel, M., McCully, C., Godwin, K. and Balis, F. M. (2003) Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. *J. Neurooncol.*, Springer **61**, 203–207.
- 373 Hernandez-Segura, A., Nehme, J. and Demaria, M. (2018) Hallmarks of cellular senescence. *Trends Cell Biol.*, Elsevier **28**, 436–453.
- 374 Chang, B. D., Xuan, Y., Broude, E. V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J. and Roninson, I. B. (1999) Role of p53 and p21(waf1/cip1) in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **18**, 4808–4818.
- 375 Meng, Y., Efimova, E. V., Hamzeh, K. W., Darga, T. E., Mauceri, H. J., Fu, Y. X., Kron, S. J. and Weichselbaum, R. R. (2012) Radiation-inducible immunotherapy for cancer: Senescent tumor cells as a cancer vaccine. *Mol.*

Ther., Nature Publishing Group **20**, 1046–1055.

- 376 Ohanna, M., Cheli, Y., Bonet, C., Bonazzi, V. F., Allegra, M., Giuliano, S., Bille, K., Bahadoran, P., Giacchero, D., Lacour, J. P., et al. (2015) Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget* **4**.
- 377 Fischer, G. M., Vashisht Gopal, Y. N., McQuade, J. L., Peng, W., DeBerardinis, R. J. and Davies, M. A. (2018) Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. *Pigment Cell Melanoma Res.*, Wiley Online Library **31**, 11–30.
- 378 Mookerjee, S. A., Goncalves, R. L. S., Gerencser, A. A., Nicholls, D. G. and Brand, M. D. (2015) The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics*, Elsevier **1847**, 171–181.
- 379 Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2015) *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, USA.
- 380 Fidler, I. J. (1973) Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat. New Biol.*, Nature Publishing Group **242**, 148–149.
- 381 Poste, G., Doll, J. and Fidler, I. J. (1981) Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **78**, 6226–6230.
- 382 Raz, A., McLellan, W. L., Hart, I. R., Bucana, C. D., Hoyer, L. C., Sela, B. A., Dragsten, P., Fidler, I. J., McLellan, W. L., Hart, I. R., et al. (1980) Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential. *Cancer Res.*, AACR **40**, 1645–1651.
- 383 Irimura, T. and Nicolson, G. L. (1984) Carbohydrate chain analysis by lectin binding to electrophoretically separated glycoproteins from murine B16 melanoma sublines of various metastatic properties. *Cancer Res.*, AACR **44**, 791–798.
- 384 Krayem, M., Najem, A., Journe, F., Morandini, R., Sales, F., Awada, A. and Ghanem, G. E. (2018) Acquired resistance to BRAFi reverses senescence-like phenotype in mutant BRAF melanoma. *Oncotarget, Impact Journals, LLC* **9**, 31888.
- 385 Beck, D., Niessner, H., Smalley, K. S. M., Flaherty, K., Paraiso, K. H. T., Busch, C., Sinnberg, T., Vasseur, S., Iovanna, J. L. and Drießen, S. (2013) Vemurafenib Potently Induces Endoplasmic Reticulum Stress–Mediated Apoptosis in BRAFV600E Melanoma Cells. *Sci. Signal.*, American Association for the Advancement of Science **6**, ra7–ra7.
- 386 Johnson, I. (1998) Fluorescent probes for living cells. *Histochem. J.*, Springer **30**, 123–140.
- 387 Robin, E. D. and Wong, R. (1988) Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.*, Wiley Online Library **136**, 507–513.
- 388 Reisch, A. S. and Elpeleg, O. (2007) Biochemical assays for mitochondrial activity: assays of TCA cycle enzymes and PDHc. *Methods Cell Biol.*, Elsevier **80**, 199–222.
- 389 Li, Y., Park, J.-S. S., Deng, J.-H. H. and Bai, Y. (2006) Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J. Bioenerg. Biomembr.*, Springer **38**, 283–291.
- 390 Ohsumi, Y. (2006) Protein turnover. *IUBMB Life*, Wiley Online Library **58**, 363–369.
- 391 Kanki, T., Ohgaki, K., Gaspari, M., Gustafsson, C. M., Fukuoh, A., Sasaki, N., Hamasaki, N. and Kang, D. (2004) Architectural role of mitochondrial transcription factor A in maintenance of human mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.*, Am Soc Microbiol **24**, 9823–9834.
- 392 Scarpulla, R. C. (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. acta (BBA)-gene Struct. Expr.*, Elsevier **1576**, 1–14.
- 393 Kelly, D. P. and Scarpulla, R. C. (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.*, Cold Spring Harbor Lab **18**, 357–368.

- 394 Calvo, S. E., Clauser, K. R. and Mootha, V. K. (2016) MitoCarta2. 0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.*, Oxford University Press **44**, D1251–D1257.
- 395 Pemberton, T. A. and Tanner, J. J. (2013) Structural basis of substrate selectivity of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (ALDH4A1): Semialdehyde chain length. *Arch. Biochem. Biophys.*, Elsevier **538**, 34–40.
- 396 Adeva-Andany, M. M., López-Maside, L., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C. and Sixto-Leal, C. (2017) Enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism in humans. *Amino Acids*, Springer **49**, 1005–1028.
- 397 Marcadier, J. L., Smith, A. M., Pohl, D., Schwartzentruber, J., Al-Dirbashi, O. Y., Majewski, J., Ferdinandusse, S., Wanders, R. J. A., Bulman, D. E. and Boycott, K. M. (2013) Mutations in ALDH6A1 encoding methylmalonate semialdehyde dehydrogenase are associated with dysmyelination and transient methylmalonic aciduria. *Orphanet J. Rare Dis.*, Springer **8**, 98.
- 398 Chen, Z., Kastaniotis, A. J., Miinalainen, I. J., Rajaram, V., Wierenga, R. K. and Hiltunen, J. K. (2009) 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 8 and carbonyl reductase type 4 assemble as a ketoacyl reductase of human mitochondrial FAS. *FASEB J.*, Federation of American Societies for Experimental Biology **23**, 3682–3691.
- 399 Galat, A. (2003) Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity-targets-functions. *Curr. Top. Med. Chem.*, Bentham Science Publishers **3**, 1315–1347.
- 400 Suzuki, R., Nagata, K., Yumoto, F., Kawakami, M., Nemoto, N., Furutani, M., Adachi, K., Maruyama, T. and Tanokura, M. (2003) Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl cis–trans isomerase and chaperone-like activities. *J. Mol. Biol.*, Elsevier **328**, 1149–1160.
- 401 König, T., Tröder, S. E., Bakka, K., Korwitz, A., Richter-Dennerlein, R., Lampe, P. A., Patron, M., Mühlmeister, M., Guerrero-Castillo, S. and Brandt, U. (2016) The m-AAA protease associated with neurodegeneration limits MCU activity in mitochondria. *Mol. Cell*, Elsevier **64**, 148–162.
- 402 Cherok, E., Xu, S., Li, S., Das, S., Meltzer, W. A., Zalzman, M., Wang, C. and Karbowski, M. (2016) Novel regulatory roles of Mff and Drp1 in E3 ubiquitin ligase MARCH5–dependent degradation of MiD49 and Mcl1 and control of mitochondrial dynamics. *Mol. Biol. Cell* **28**, 396–410.
- 403 Ducommun, S., Deak, M., Sumpton, D., Ford, R. J., Galindo, A. N., Kussmann, M., Viollet, B., Steinberg, G. R., Foretz, M. and Dayon, L. (2015) Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. *Cell. Signal.*, Elsevier **27**, 978–988.
- 404 Gandre-Babbe, S. and van der Bliek, A. M. (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, Am Soc Cell Biol **19**, 2402–2412.
- 405 Consortium, U. (2018) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.*, Oxford University Press **47**, D506–D515.
- 406 Puzio-Kuter, A. M. (2011) The role of p53 in metabolic regulation. *Genes Cancer*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA **2**, 385–391.
- 407 Murphy, P. J. M., Galigniana, M. D., Morishima, Y., Harrell, J. M., Kwok, R. P. S., Ljungman, M. and Pratt, W. B. (2004) Pifithrin- α inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J. Biol. Chem.*, ASBMB **279**, 30195–30201.
- 408 Cairns, R. A., Harris, I. S. and Mak, T. W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95.
- 409 Deberardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. and Thompson, C. B. (2008) Review The Biology of Cancer : Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation 11–20.
- 410 Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N. and Burova, E. (2014) Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging*

(Albany NY), Impact Journals, LLC **6**, 481.

- 411 Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M. J., Harold, G., Schaeuble, K., et al. (2007) Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* **5**, 1138–1151.
- 412 Sakai, Y., Yamamori, T., Yoshikawa, Y., Bo, T., Suzuki, M., Yamamoto, K., Ago, T. and Inanami, O. (2018) NADPH oxidase 4 mediates ROS production in radiation-induced senescent cells and promotes migration of inflammatory cells. *Free Radic. Res., Taylor & Francis* **52**, 92–102.
- 413 Weyemi, U., Lagente-Chevallier, O., Boufragech, M., Preno, F., Courtin, F., Caillou, B., Talbot, M., Dardalhon, M., Al Ghuzlan, A. and Bidart, J. M. (2012) ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene, Nature Publishing Group* **31**, 1117.
- 414 Short, S., Fielder, E., Miwa, S. and von Zglinicki, T. (2019) Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine, Elsevier*.
- 415 Lee, S. and Schmitt, C. A. (2019) The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell Biol., Nature Publishing Group* **21**, 94–101.
- 416 Stram, A. R. and Payne, R. M. (2016) Post-translational modifications in mitochondria: protein signaling in the powerhouse. *Cell. Mol. life Sci., Springer* **73**, 4063–4073.
- 417 Clayton, D. A. (1992) Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. In *International review of cytology*, pp 217–232, Elsevier.
- 418 Lebleu, V. S., Connell, J. T. O., Herrera, K. N. G., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., Carvalho, F. M. De, Damascena, A., Thome, L., Chinen, D., et al. (2014) PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis **16**.
- 419 Flor, A. C., Wolfgeher, D., Wu, D. and Kron, S. J. (2017) A signature of enhanced lipid metabolism, lipid peroxidation and aldehyde stress in therapy-induced senescence. *Cell death Discov., Nature Publishing Group* **3**, 1–12.
- 420 Carroll, B. and Korolchuk, V. I. (2018) Nutrient sensing, growth and senescence. *FEBS J., Wiley Online Library* **285**, 1948–1958.
- 421 Besse, A., Wu, P., Bruni, F., Donti, T., Graham, B. H., Craigen, W. J., McFarland, R., Moretti, P., Lalani, S. and Scott, K. L. (2015) The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell Metab., Elsevier* **21**, 417–427.
- 422 Zhao, Y., Tian, J., Sui, S., Yuan, X., Chen, H., Qu, C., Du, Y., Guo, L. and Du, H. (2017) Loss of succinyl-CoA synthase ADP-forming β subunit disrupts mtDNA stability and mitochondrial dynamics in neurons. *Sci. Rep., Nature Publishing Group* **7**, 1–10.
- 423 Lemons, J. M. S., Feng, X.-J., Bennett, B. D., Legesse-Miller, A., Johnson, E. L., Raitman, I., Pollina, E. A., Rabitz, H. A., Rabinowitz, J. D. and Collier, H. A. (2010) Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biol., Public Library of Science* **8**, e1000514.
- 424 Delfarah, A., Parrish, S., Junge, J. A., Yang, J., Seo, F., Li, S., Mac, J., Wang, P., Fraser, S. E. and Graham, N. A. (2019) Inhibition of nucleotide synthesis promotes replicative senescence of human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem., ASBMB* **294**, 10564–10578.
- 425 Soriano, F. X., Liesa, M., Bach, D., Chan, D. C., Palacín, M. and Zorzano, A. (2006) Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , estrogen-related receptor- α , and mitofusin 2. *Diabetes, Am Diabetes Assoc* **55**, 1783–1791.
- 426 Mai, S., Klivenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J. and Jendrach, M. (2010) Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J. Cell Sci.* **123**, 917–926.

- 427 Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C. L. and Youle, R. J. (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell, Am Soc Cell Biol* **15**, 5001–5011.
- 428 Bennett G Childs¹, Matej Durik², Darren J Baker^{1,2}, and Jan M van Deursen^{1, 2}. (2017) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy *Bennett* **389**, 1–12.
- 429 Nacarelli, T. and Sell, C. (2017) Targeting metabolism in cellular senescence, a role for intervention. *Mol. Cell. Endocrinol., Elsevier Ireland Ltd* **455**, 83–92.
- 430 Roesch, A., Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K. M., Speicher, D., Körbel, C., Laschke, M. W., Gimotty, P. A. and Philipp, S. E. (2013) Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1Bhigh cells. *Cancer Cell, Elsevier* **23**, 811–825.
- 431 Freyer, J. P. (1998) Decreased mitochondrial function in quiescent cells isolated from multicellular tumor spheroids. *J. Cell. Physiol., Wiley Online Library* **176**, 138–149.
- 432 Aulestia, F. J., Néant, I., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., Moreau, M. and Leclerc, C. (2018) Quiescence status of glioblastoma stem-like cells involves remodelling of Ca²⁺ signalling and mitochondrial shape. *Sci. Rep., Nature Publishing Group* **8**, 1–12.
- 433 Martínez, J., Marmisolle, I., Tarallo, D. and Quijano, C. (2020) Mitochondrial bioenergetics and dynamics in secretion processes. *Front. Endocrinol. (Lausanne), Frontiers* **11**, 319.
- 434 Filadi, R., Pendin, D. and Pizzo, P. (2018) Mitofusin 2: from functions to disease. *Cell Death Dis., Nature Publishing Group* **9**, 1–13.
- 435 Klein, M.-C., Zimmermann, K., Schorr, S., Landini, M., Klemens, P. A. W., Altensell, J., Jung, M., Krause, E., Nguyen, D. and Helms, V. (2018) AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum. *Nat. Commun., Nature Publishing Group* **9**, 1–14.
- 436 Saleem, A., Iqbal, S., Zhang, Y. and Hood, D. A. (2015) Effect of p53 on mitochondrial morphology, import, and assembly in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Physiol., American Physiological Society Bethesda, MD* **308**, C319–C329.
- 437 Wang, W., Cheng, X., Lu, J., Wei, J., Fu, G., Zhu, F., Jia, C., Zhou, L., Xie, H. and Zheng, S. (2010) Mitofusin-2 is a novel direct target of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun., Elsevier* **400**, 587–592.
- 438 Xu, J., Chi, F., Guo, T., Punj, V., Lee, W. N. P., French, S. W. and Tsukamoto, H. (2015) NOTCH reprograms mitochondrial metabolism for proinflammatory macrophage activation. *J. Clin. Invest., Am Soc Clin Investig* **125**, 1579–1590.
- 439 Hossain, F., Sorrentino, C., Ucar, D. A., Peng, Y., Matossian, M., Wyczechowska, D., Crabtree, J., Zabaleta, J., Morello, S. and Del Valle, L. (2018) Notch signaling regulates mitochondrial metabolism and NF-κB Activity in triple-negative breast cancer cells via IKKα-dependent non-canonical pathways. *Front. Oncol., Frontiers* **8**, 575.
- 440 Kondo, T., Ando, M., Nagai, N., Tomisato, W., Srirat, T., Liu, B., Mise-Omata, S., Ikeda, M., Chikuma, S. and Nishimasu, H. (2020) The NOTCH–FOXO1 axis plays a key role in mitochondrial biogenesis in the induction of human stem cell memory-like CAR-T cells. *Cancer Res., AACR* **80**, 471–483.
- 441 Perumalsamy, L. R., Nagala, M. and Sarin, A. (2010) Notch-activated signaling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci., National Acad Sciences* **107**, 6882–6887.
- 442 Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P.-Y., Campisi, J. and Wiley, C. (2016) Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br. J. Cancer, Nature Publishing Group* **114**, 1180–1184.
- 443 Faget, D. V., Ren, Q. and Stewart, S. A. (2019) Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat. Rev. Cancer, Nature Publishing Group* **19**, 439–453.
- 444 Samaraweera, L., Adomako, A., Rodriguez-Gabin, A. and McDaid, H. M. (2017) A novel indication for panobinostat as a senolytic drug in NSCLC and HNSCC. *Sci. Rep., Nature Publishing Group* **7**, 1–11.

- 445 Correia-Melo, C. and Passos, J. F. (2016) Demystifying the role of mitochondria in senescence. Mol. Cell. Oncol. 3.

Anexo

Tabla 1. Anticuerpos para Westen blot.

Blanco	Dilución	Marca
ATM fosforilada (Ser1981)	1:1000	Millipore #05-740
Tubulina- α	1:1000	Millipore #05-829
ATM	1:1000	Cell Signaling Technology #2873
p53-fosforilada (Ser15)	1:1000	Cell Signaling Technology #9284
GAPDH	1:1000	Cell Signaling Technology #2118
P65/RelA	1:1000	Cell Signaling Technology #8242
IKB-fosforilada (Ser32/36)	1:1000	Cell Signaling Technology #9246
Cleaved NOTCH1 (Val1744) (NICD)	1:1000	Cell Signaling Technology #4147
NOTCH1	1:1000	Cell Signaling Technology #3608
P53	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #sc-6243
p21	1:1000	Santa Cruz Biotechnology #sc-397
OPA1	1:1000	Abcam #ab42364
DRP1	1:1000	Abcam #ab54038
MFN1	1:4000	Abcam #ab104274
MFN2	1:5000	Abcam #ab124773
FIS1 (anti-TTC1)	1:1000	Abcam #ab71498
Complex I subunit 8 kDa	1:1000	Abcam #ab110245
ATP5A	1:1000	Abcam #ab14748
SDHA	1:1000	Abcam #ab14715
COX IV	1:1000	Abcam #ab33985
MFF	1:1000	Abcam #ab129075
TFAM	1:1000	Abcam #ab131607

Tabla 2. Anticuerpos para inmunofluorescencia.

Blanco	Dilución	Marca
DRP1	1:200	Abcam #ab54038
SDHA	1:200	Abcam #ab14715
MFN1	1:100	Abcam #ab104274
BrdU	1:50	Becton Dickinson #347580
γ -H2AX (Ser139)	1:200	Millipore #05-636

Tabla 3. Cebadores utilizados para RT-qPCR.

Gen (ratón)	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
β -actin	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	CGTCATCCATGGCGAACTG
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGAA	AAGTGCATCATCGTTGTTATACA
IL-18	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA	TCTGACATGGCAGCCATTGT
Ccl2	ATTGGGATCATCTTGCTGGT	CCTGCTGTTACAGTTGCC
Ccl5	CCACTTCTTCTCTGGGTTGG	GTGCCCACGTCAAGGAGTAT
Cxcl1	CTTGGTTTCAGAAATGTCCAAA	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT
Cxcl2	CCCTCAACGGAAGAACAAA	CACATCAGGTACGATCCAGGC
Cxcl9	TGGAGCAGTGTGGAGTTCGA	CCTCGGCTGGTGCTGATG
Cxcl10	GCCGTCATTTTCTGCCTCAT	GCTTCCCTATGGCCCTCATT
Cxcl11	CAAAATGGCAGAGATCGAGAAA	TGAGCCTTCATAGTAACAATCACTCA
Tgf- β	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT	GAGTTTGTATCTTTGCTGTCAAGA
Tnf- α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
Pgc1- α	TGGAGTGACATAGAGTGTGCTGC	CTCAAAATATGTTCCGAGGCTCA
Mfn1	CCAGGTACAGATGTCACCACAG	TTGGAGAGCCGCTCATTCACCT
Mfn2	TCCAAGGTCAGGGGTATCAG	GCAGAACTTTGTCCAGAGC
Fis1	GCTGGTTCTGTGTCCAAGAGCA	GACATAGTCCCCTGTTCTCTCT
Mff	TCAAAGCGAAGAGAGCCGAG	CCACGGCAGAGGAAAGATT
p21	TCCAGACATTCAGAGCCACAGG	ACTTTGCTCTGTGCGGAAC

Tabla 4. Proteínas identificadas exclusivamente en las células control. Se resaltan las proteínas mitocondriales identificadas con la base de datos MitoCarta 2.0.

Gen	Proteína	Intensidad	Función (Uniprot)
Plscr1	Fosfolípido escramblasa 1	3.88x10 ⁻⁴	Migración bidireccional de fosfolípidos.

Psat1	Fosfoserina aminotransferasa	3.78x10 ⁻⁴	Biosíntesis de aminoácidos.
Cdk1	Quinasa dependiente de ciclina 1	3.64x10 ⁻⁴	Ciclo celular.
Arl3	Proteína 3 similar al factor de ribosilación de ADP	2.89x10 ⁻⁴	Ensamblaje de la cilias. Transporte entre el Golgi y el RE.
Paics	Proteína multifuncional ADE2	2.10x10 ⁻⁴	Metabolismo de purinas.
Galk1	Galactoquinasa	1.85x10 ⁻⁴	Metabolismo de carbohidratos.
Mapk1	Proteína quinasa activada por mitógeno 1	1.56x10 ⁻⁴	Transducción de señales.
Slc6a6	Transportador de taurine dependiente de sodio y cloro	1.44x10 ⁻⁴	Transportador de taurina y alanina.
Srm	Espermidina sintasa	1.38x10 ⁻⁴	Biosíntesis de espermidina.
Oxsr1	Proteína serina/treonina quinasa OSR1	1.32x10 ⁻⁴	Transducción de señales.
Sugt1	Proteína homóloga a SGT1	9.97x10 ⁻⁵	Ubiquitinación y degradación de proteínas.
Slc1a4	Transportador de aminoácidos neutros A	9.18x10 ⁻⁵	Transportador de aminoácidos neutros (Alanina/serina/cisteína/treonina).
Daam1	Activador de la morfogénesis disheveled-associated 1	7.49x10 ⁻⁵	Organización del citoesqueleto.
Csk	Proteína tirosina quinasa	7.16x10 ⁻⁵	Transducción de señales.
Cpne1	Copina 1	6.78x10 ⁻⁵	Procesos dependientes de calcio.
Abcb6	Miembro 6 de la sub-familia B de las ATP-binding	4.07x10 ⁻⁵	Biosíntesis del grupo hemo. Captación de hemo y porfirinas dependiente de ATP en la mitocondria.

Tabla 5. Proteínas identificadas exclusivamente en las células tratadas con TMZ. Se resaltan las proteínas mitocondriales identificadas con la base de datos MitoCarta 2.0.

Gen	Proteína	Intensidad	Función (Uniprot)
Ass1	Arginino succinato sintasa	8.98x10 ⁻³	Biosíntesis de aminoácidos.
St3gal4	CMP-N-acetilneuraminato-beta-galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa 4	7.15x10 ⁻³	Glicosilación de proteínas.
Hmox1	Hemo oxigenasa 1	2.21x10 ⁻³	Catabolismo del hemo.
St3gal1	CMP-N-acetilneuraminato-beta-galactosamida-alfa-2,3-sialiltransferasa 1	7.90x10 ⁻⁴	Glicosilación de proteínas.
Smim20	Pequeña proteína integral de membrana 20	7.17x10 ⁻⁴	Componente del complejo MITRAC (del inglés: <i>mitochondrial translation regulation assembly intermediate of cytochrome c oxidase complex</i>) que regula el ensamblaje de la citocromo c oxidasa (CIV).
Rps15	Proteína ribosomal S15 (40S)	6.06x10 ⁻⁴	Componente ribosomal.
Mrps36	Proteína ribosomal S36 (28S)	4.90x10 ⁻⁴	Componente ribosomal mitocondrial.
Tmem160	Proteína transmembrana 160	4.75x10 ⁻⁴	Proteína transmembrana.
Mrpl41	Proteína ribosomal L41 (39S)	4.32x10 ⁻⁴	Componente ribosomal mitocondrial.
Hsd12	Hidroxi-esteroide deshidrogenasa-like protein 2	3.87x10 ⁻⁴	Metabolismo de los ácidos grasos (peroxisomas).
Hpgds	Prostaglandina D hematopoyética sintasa	3.33x10 ⁻⁴	Biosíntesis de prostaglandinas.
Cpe	Carboxipeptidasa E	2.90x10 ⁻⁴	Metabolismo de péptidos.
Mrpl27	Proteína ribosomal L27 (39S)	2.69x10 ⁻⁴	Componente ribosomal mitocondrial.
Mrpl50	Proteína ribosomal L50 (39S)	2.67x10 ⁻⁴	Componente ribosomal mitocondrial.
Rab24	Proteína Ras-related Rab-24	2.53x10 ⁻⁴	Autofagia.
Abhd10	Esterasa del ácido micofenólico acil-glucuronida	2.38x10 ⁻⁴	Cataliza la deglucuronidación del ácido micofenólico acil-glucuronida.
Ldhd	D-lactato deshidrogenasa	2.20x10 ⁻⁴	Catabolismo de D-lactato.
Cpt1a	Carnitina O-palmitoiltransferasa 1	1.99x10 ⁻⁴	Cataliza la transferencia del grupo acilo de los acil-graso-CoA a la carnitina, paso esencial para la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria y su oxidación.
Exog	Nucleasa EXOG	1.84x10 ⁻⁴	Endo/exonucleasa con preferencia por ADN simple hebra y actividad exonucleasa 5'-3'.
Lmna	Prelamina A/C	1.42x10 ⁻⁴	Componente de la lámina nuclear.
Mrpl32	Proteína ribosomal L32 (39S)	1.44x10 ⁻⁴	Componente ribosomal mitocondrial.
Mrps25	Proteína ribosomal S25 (28S)	1.44x10 ⁻⁴	Componente ribosomal mitocondrial.
Gla	Alfa-galactosidasa A	1.37x10 ⁻⁴	Degradación de glicosfingolípidos.
C4b	Componente C4b	1.34x10 ⁻⁴	Componente del complemento.
Rmdn1	Proteína reguladora de la dinámica de los microtúbulos 1	1.24x10 ⁻⁴	Interacciona con los microtúbulos
Enpp5	Ectonucleótido pirofosfatasa/miembro 5 de la familia de las fosfodiesterasas	1.23x10 ⁻⁴	Catabolismo de nucleótidos
Cbr2	Carbonil reductasa [NADPH] 2	1.21x10 ⁻⁴	Metabolismo de compuestos carbolinos endógenos como aldehídos alifáticos y cetonas derivados de peroxidación lipídica.
Slc25a40	Transportador de solutos familia 25 miembro 40	1.05x10 ⁻⁴	Transportador de solutos mitocondriales.
Adhfe1	Hidroxi-ácido-oxo ácido transhidrogenasa	1.04x10 ⁻⁴	Cataliza la oxidación reversible independiente de cofactor del gamma-hidroxi-butarato a semialdehído succínico acoplado a la reducción de 2-cetoglutarato a D-2-hidroxi-glutarato.

Mcl1	Homólogo de la proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida	9.92x10 ⁻⁵	Apoptosis.
C1ptm1l	Proteína transmembrana tipo 1 de labio leporino y paladar hendido	9.77x10 ⁻⁵	Apoptosis.
Nt5dc3	Dominio 5'-nucleotidasa-containing protein 3	9.27x10 ⁻⁵	Pertenece a la familia de las 5'(3')-deoxiribonucleotidasas.
Iba57	Transferasa putativa CAF17	9.09x10 ⁻⁵	Maduración de las proteínas mitocondriales 4Fe-4S.
Coq6	Monooxigenasa de la síntesis de ubiquinona (COQ6)	8.61x10 ⁻⁵	Biosíntesis de ubiquinona.
Tor1aip2	Proteína que interacciona con Torsin 1A 2	8.51x10 ⁻⁵	Necesaria para la integridad del RE.
Mfn1	Mitofusina 1	8.27x10 ⁻⁵	GTPasa de fusión mitocondrial.
Mfn2	Mitofusina 2	8.06x10 ⁻⁵	GTPasa de fusión mitocondrial. Metabolismo mitocondrial. Mitofagia. Contactos mitocondria-ER.
Abhd16a	Fosfatidilserina lipasa	8.02x10 ⁻⁵	Catabolismo de fosfatidilserina.
Fahd2	Fumarilacetoacetato hidrolasa domain-containing protein 2A	7.82x10 ⁻⁵	Proteína multifuncionalidad, que implica principalmente mecanismos de hidrolasa y descarboxilasa
Miga2	Mitoguardina 2	7.74x10 ⁻⁵	Fusión mitocondrial.
Slc25a32	Transportador mitocondrial de folato	7.53x10 ⁻⁵	Transportar de ácido fólico a través de la membrana mitocondrial interna.
Guf1	Factor de traducción Guf1	7.10x10 ⁻⁵	Traducción mitocondrial.
Tmlhe	Trimetilisina dioxigenasa	6.77x10 ⁻⁵	Biosíntesis de carnitina.
Vps18	Homólogo de la proteína 18 asociada a la clasificación de proteínas vacuolares	6.38x10 ⁻⁵	Tráfico de vesículas.
Vps41	Homólogo de la proteína 41 asociada a la clasificación de proteínas vacuolares	6.22x10 ⁻⁵	Tráfico de vesículas.
Vps33a	Homólogo de la proteína 33a asociada a la clasificación de proteínas vacuolares	4.99x10 ⁻⁵	Tráfico de vesículas.
G6pc3	Glucosa 6 fosfatasa 3	4.80x10 ⁻⁵	Hidrólisis de glucosa 6 fosfato en el RE.
Mlycd	Malonil-CoA descarboxilasa	4.77x10 ⁻⁵	Biosíntesis de Acetil-CoA
Erlc1	Lectina del RE 1	4.64x10 ⁻⁵	Degradación de proteínas asociad al RE (ERAD).
Eif4b	Factor de iniciación de la traducción 4B	4.50x10 ⁻⁵	Traducción de proteínas.
Tfcp2	Factor de transcripción alfa-globina CP2	3.77x10 ⁻⁵	Regulación de la transcripción.
Slc12a9	Miembro 9 de la familia 12 de transportadores de soluto	3.65x10 ⁻⁵	Inhibidor del transportador de solutos SLC12A1.
Ptprs	Receptor tipo proteína tirosina fosfatasa S	3.03x10 ⁻⁵	Transducción de señales.

Tabla 6. Proteínas expresadas diferencialmente entre las células control y las células tratadas con TMZ. Se resaltan las proteínas mitocondriales identificadas con la base de datos MitoCarta 2.0.

Gen	Proteína	TMZ/Control	P valor	Función (Uniprot)
Abat	4-aminobutirato aminotransferasa	23.57	0.020	Conversión de GABA en ácido succínico.
Rab3d	Proteína relacionada a Ras Rab-3D	9.71	0.0064	Tráfico de vesículas.
Aldh4a1	Delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	9.45	0.00001	Catabolismo de prolina.
Acad8	Isobutiril-CoA deshidrogenasa	8.04	0.00001	Catabolismo de valina.
Cbr4	Carbonil reductasa 4	6.99	0.0015	Síntesis mitocondrial de ácidos grasos.
Gm2a	Activador de gangliósidos GM2	6.87	0.0034	Catabolismo de gangliósidos.
Ppif	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa F	6.66	0.0014	Plegamiento de proteínas. Regulación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). Modulación de la actividad de F ₁ F ₀ ATP sintasa y niveles de nucleótido de adenina en la matriz mitocondria. Actividad anti-apoptótica.
Pura	Activador transcripcional Pur-alfa	6.29	0.0058	Duplicación y replicación del ADN
Aldh6a1	Metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa	6.14	0.00006	Metabolismo de valina y pirimidina. Une acil-graso-CoA
Rab13	Proteína relacionada a Ras Rab-13	5.29	0.029	Tráfico de vesículas.
Dtymk	Timidilato quinasa	5.17	0.0013	Metabolismo de pirimidina. Biosíntesis de dTTP.
Ephx1	Epóxido hidrolasa	4.93	0.00001	Metabolismo de lípidos y ácidos grasos que contienen epóxidos.
Cyb5r1	NADH-citocromo b5 reductasa 1	4.85	0.0001	Desaturación y elongación de ácidos grasos. Biosíntesis de colesterol. Metabolismo de drogas. Reducción de metahemoglobina.
Sfxn3	Sideroflexina 3	4.66	0.00011	Transporte de serina a la mitocondria.
Rida	Deaminasa 2-iminobutanoato/2-iminopropanoato	4.43	0.0049	Catabolismo de treonina. Metabolismo de ARNm.
Cox6b1	Citocromo c oxidasa subunidad 6B1	4.34	0.00033	Componente del complejo IV.
Poglut1	Proteína O-glucosiltransferasa 1	4.26	0.00014	Glicosilación de proteínas.

Pycr2	Pirrolina-5-carboxilato reductasa 2	4.18	0.00049	Biosíntesis de prolina.
Isoc2a	Isocorismatasa domain-containing protein 2A	4.15	0.00006	Desestabilización de proteínas.
ApoE	Apolipoproteína E (Apo-E)	4.07	0.0033	Transporte de lípidos.
Nucb1	Nucleobindina 1	3.88	0.010	Homeostasis del calcio.
Pcyox1	Prenil-cisteína oxidase	3.76	0.00001	Degradación de proteínas preniladas.
Coq9	Proteína de biosíntesis de ubiquinona COQ9	3.62	0.0014	Biosíntesis de coenzima Q.
Crip2	Cysteine-rich protein 2 (CRP-2)	3.53	0.0009	Componente del complejo ATAC (acetilación de histonas)
Smpd1	Esfingomielina fosfodiesterasa	3.52	0.00001	Biosíntesis de ceramidas.
Ptgds	Prostaglandina-H2 D-isomerasa	3.50	0.0047	Biosíntesis de prostaglandinas.
Bcl2l13	Bcl-2-like protein 13	3.39	0.0021	Podría activar la caspasa 3 y la apoptosis.
Acadvl	Acil-CoA deshidrogenasa específica de ácidos grasos de cadena muy larga	3.35	0.00004	Oxidación de ácidos grasos.
Aldh1b1	Aldehído deshidrogenasa X	3.31	0.032	Detoxificación de acetaldehído derivados de alcoholes.
Abhd12	Lisofosfatidilseína lipasa ABHD12	3.30	0.0005	Catabolismo de lípidos.
Erlin1	Erlina 1 (Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 1)	3.27	0.00001	Degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD)
Afg3l2	AFG3-like protein 2	3.21	0.00002	Proteasa mitocondrial.
Dnaja3	DnaJ homólogo subfamilia A 3	3.12	0.029	Apoptosis dependiente de citocromo c y activación de la caspasa 3.
Mavs	Proteína de señalización anti-viral mitocondrial	3.09	0.007	Inmunidad innata contra virus.
Rpl32	Proteína ribosomal L32 (60S)	3.09	0.019	Componente del ribosoma.
Gpx8	Probable glutatión peroxidasa 8 (GPx-8)	3.07	0.0009	Metabolismo redox.
Mrpl15	Proteína ribosomal L15 (39S)	3.06	0.00062	Componente del ribosoma mitocondrial.
Gba	Glucosilceramidasa ácida lisosomal	2.97	0.00001	Metabolismo de esteroides.
Rpl35	Proteína ribosomal L35 (60S)	2.96	0.0011	Componente del ribosoma.
Slc25a20	Transportador mitocondrial de carnitina/acilcarnitina	2.89	0.0006	Transporte de carnitina a través de la membrana mitocondrial interna.
Tmem43	Proteína transmembrana 43	2.87	0.00001	Mantenimiento de la envoltura nuclear
Mrpl11	Proteína ribosomal L11 (39S)	2.85	0.0007	Componente del ribosoma mitocondrial.
Rab8b	Ras-related protein Rab-8B	2.84	0.022	Tráfico de vesículas.
Etfldh	Flavoproteína transferidora de electrones-ubiquinona oxidoreductasa	2.83	0.00020	Acepta electrones de ETF y reduce la ubiquinona
Stx8	Syntaxina 8	2.83	0.0022	Transporte de vesículas.
Cox5b	Subunidad 5B de la citocromo c oxidasa	2.81	0.00033	Componente del complejo IV.
Glg1	Proteína del aparato de Golgi 1	2.80	0.00025	Migración celular.
Dbt	Lipoamida aciltransferasa componente del complejo de la deshidrogenasa de alfa-ceto ácidos ramificados	2.77	0.00075	Oxidación de alfa-ceto ácidos a acetil-CoA y CO ₂
Atp6v1e1	Subunidad E1 de la V-ATPasa	2.68	0.008	Acidificación de compartimentos intracelulares.
Bcap31	Proteína asociada a receptor de células B 31	2.67	0.02	Chaperona del retículo endoplásmico.
Ociad1	OCIA domain-containing protein 1	2.67	0.00009	Transducción de señales.
Idh3g	Isocitrato deshidrogenasa [NAD] subunidad gamma 1	2.64	0.021	Regulación alostérica de la isocitrato deshidrogenasa.
Sccpdh	Sacaropina tipo deshidrogenasa oxidoreductasa	2.64	0.0004	Biosíntesis de glicolípidos.
Atp5f1d	ATP sintasa subunidad delta	2.61	0.006	Componente de la F1F0 ATP sintasa.
Lgals3bp	Galectina 3 binding protein	2.58	0.00008	Proteína de adhesión celular.
Aga	N(4)-(beta-N-acetilglucosaminil)-L-asparaginasa	2.58	0.0015	Deglicosilación de proteínas.
Aldh1a1	Retinaldehído deshidrogenasa 1	2.57	0.0008	Metabolismo del retinol.
Nceh1	Éster hidrolasa de colesterol neutral 1	2.56	0.0003	Metabolismo de lípidos.
Dnab11	DnaJ homólogo subfamilia B 11	2.56	0.0002	Plegamiento, tráfico y degradación de proteínas.
Rpl18a	Proteína ribosomal L18a (60S)	2.55	0.0002	Componente del ribosoma.
Pdhx	Proteína X componente de la Piruvato deshidrogenasa	2.54	0.006	Ensamblaje del complejo de la PDH.
Ndufa5	Subunidad 5 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa 1	2.53	0.00008	Subunidad accesoria del complejo I.
Rpl14	Proteína ribosomal L14 (60S)	2.53	0.0008	Componente del ribosoma.
Erlin2	Erlina 2 (Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2)	2.50	0.00002	Degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD)
Ndufa12	Subunidad 12 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa 1	2.50	0.034	Subunidad accesoria del complejo I.

Hs2st1 Hs2st	Heparan sulfato 2-O-sulfotransferasa 1	2.50	0.000106	Metabolismo de heparina.
Acot13	Acil-CoA tioesterasa 13	2.47	0.0008	Hidrólisis de acil-CoAs a ácidos grasos y CoA.
Aldh1a2	Retinaldehído deshidrogenasa 2	2.45	0.0008	Metabolismo del retinol.
Acsf2	Acil-CoA ligasa de ácidos grasos de cadena media	2.43	0.00002	Oxidación de ácidos grasos.
Mlec	Malectina	2.40	0.00009	Glicosilación de proteínas.
Mtdh Lyric	Proteína LYRIC	2.40	0.022683	Activador de NF-κB. Modulador de la proliferación y apoptosis.
Lactb	Serina beta-lactamasa-like protein	2.40	0.0054	Regulación del metabolismo lipídico.
Naxe	NAD(P)H-hidrato epimerasa	2.37	0.016	Sistema de reparación de nucleótidos de nicotinamida hidratados
Rcn1	Reticulocalbin-1	2.37	0.0011	Homeostasis del calcio.
Crelid2	Proteína disulfuro isomerasa Crelid2	2.37	0.009	Plegamiento de proteínas.
Hint2	Histidina tríada nucleótido-binding protein 2	2.34	0.00018	Biosíntesis de esteroides. Apoptosis.
Ak3	GTP:AMP fosfotransferasa AK3	2.33	0.00017	Interconversión de nucleósidos fosfatos. Actividad nucleósido di-fosfato quinasa. Fosforilación y activación de AMPK.
Rpl28	Proteína ribosomal L28 (60S)	2.32	0.0096	Componente del ribosoma.
Cd63	CD63 antigen (CD antigen CD63)	2.31	0.029	Cascadas de señalización celular.
Ivd	Isovaleril-CoA deshidrogenasa	2.27	0.014	Catabolismo de leucina.
Ndufb4	NADH deshidrogenasa [ubiquinone] 1 subcomplejo beta subunidad 4	2.27	0.0074	Subunidad accesoria del complejo I.
Cpox	Oxidasa coproporfirinógeno-III oxígeno-dependiente	2.24	0.0014	Biosíntesis del hemo.
Rab6b	Ras-related protein Rab-6B	2.24	0.0032	Tráfico de vesículas.
Acot9	Acil-coenzima A tioesterasa 9	2.23	0.0004	Cataliza la hidrólisis de acil-CoAs a ácidos grasos y coenzima A.
Glod4	Glioxalasa domain-containing protein 4	2.22	0.0036	Inhibición del crecimiento de células de carcinoma hepático.
Der1	Derlina 1	2.21	0.023	Degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD)
Decr1	2,4-dienoil-CoA reductasa	2.20	0.0016	Oxidación de ácidos grasos.
Acadsb	Acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos cortos ramificados	2.20	0.0004	Oxidación de ácidos grasos..
Crelid1	Proteína disulfuro isomerasa Crelid1	2.19	0.004	Plegamiento de proteínas.
Arl1	Proteína 1 similar al factor de ribosilación de ADP	2.19	0.010	Funcionamiento del aparato de Golgi.
Rpl35a	Proteína ribosomal L35a (60S)	2.18	0.0001	Componente del ribosoma.
Hmgcl	Hidroimetilglutaril-CoA liasa	2.18	0.00033	Cetogénesis.
Rpl6	Proteína ribosomal L6 (60S)	2.18	0.00009	Componente del ribosoma.
Alg2	Alfa-1,3/1,6-manosiltransferasa	2.18	0.0052	Glicosilación de proteínas.
Rab6a	Ras-related protein Rab-6A	2.17	0.0021	Transporte de proteínas.
Cpt2	Carnitina O-palmitoiltransferasa 2	2.16	0.0009	Oxidación de ácidos grasos.
Maoa	Amine oxidasa [flavin-containing] A	2.15	0.00003	Metabolismo de aminas biogénicas y xenogénicas.
Rps7	Proteína ribosomal S7 (40S)	2.15	0.011731	Componente del ribosoma.
Rexo2	Oligo-ribonucleasa	2.14	0.0039	3'-5' exo-ribonucleasa específica de oligo-ribonucleótidos.
Gpnmb	Glicoproteína transmembrana NMB	2.14	0.00092	Melanogénica.
Oxct1	Succinil-CoA 3-ceto ácido-CoA transferasa 1	2.13	0.00001	Catabolismo de cuerpos cetónicos.
Ccdc58	Coiled-coil domain-containing protein 58	2.12	0.030	
Atp5f1e	ATP sintasa subunidad epsilon	2.09	0.013	Componente de la F1F0 ATP sintasa.
Hexa	Beta-hexosaminidasa subunidad alfa	2.09	0.00007	Degradación de gangliósidos.
Emc2	Complejo de proteínas de membrana de retículo endoplásmico subunidad 2	2.08	0.00617	Componente del complejo de proteínas de la membrana del RE (EMC).
Hadha	Subunidad alfa de la enzima trifuncional	2.08	0.00006	Oxidación de ácidos grasos.
Fkbp3	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	2.07	0.00111	Transducción de señales.
Mrps28	Proteína ribosomal S28 (28S)	2.07	0.00373	Componente del ribosoma mitocondrial.
Aldh2	Aldehído deshidrogenasa	2.06	0.00023	Síntesis de acetato a partir de etanol.
Glb1	Beta-galactosidasa	2.06	0.00002	Metabolismo de carbohidratos.
Ckap4	Proteína asociada al citoesqueleto 4	2.06	0.00227	Anclaje del RE a microtúbulos.
Apoo	Subunidad Mic26 del complejo MICOS	2.03	0.00100	Componente del complejo MICOS.
Acad9	Factor de ensamblaje del complejo I	2.02	0.00180	Parte del complejo MCIA. Ensamblaje del complejo I.
Clpp	Subunidad proteolítica de la proteasa dependiente de ATP Clp	2.02	0.00019	Proteasa componente del complejo Clp que cliva proteínas, proceso dependiente de ATP. Cliva PINK1 en la mitocondria.

Fdxr	NADPH:adenodoxina oxidorreductasa	2.01	0.00095	Metabolismo esteroideo.
Hadhb	Subunidad beta de la enzima trifuncional	2.00	0.00003	Oxidación de ácidos grasos.
Coa3	Factor 3 de ensamblaje de la citocromo c oxidase	2.00	0.00719	Componente del complejo MITRAC (mitochondrial translation regulation assembly intermediate of cytochrome c oxidase complex).
Rplp2	Proteína ribosomal ácida P2 (60S)	2.00	0.00797	Síntesis de proteínas.
Ppa2	Pirofosfatasa inorgánica 2	1.993	0.03314	Hidroliza pirofosfato inorgánico. Es esencial para la regulación del potencial de membrana, organización y función mitocondrial.
Atp6v1a	Subunidad catalítica A de la ATPasa de protones tipo V	1.98	0.00025	Acidificación de compartimientos celulares.
Man2b2	Manosidasa alfa específica del epidídimo	1.98	0.00001	Espermatogénesis.
Ndufb3	Subunidad 3 del complejo beta de la NADH deshidrogenasa 1	1.97	0.00103	Subunidad accesoria del complejo I.
Rpl7	Proteína ribosomal L7 (60S)	1.97	0.00038	Componente del ribosoma.
Sec22b	Proteína de tráfico de vesículas SEC22b	1.96	0.00149	Transporte de vesículas.
Ndufc2	Subunidad C2 de la NADH deshidrogenasa 1	1.93	0.00113	Subunidad accesoria del complejo I.
Rpl18	Proteína ribosomal L18 (60S)	1.92	0.00004	Componente del ribosoma.
St3gal6	Lactosamina alfa-2,3-sialiltransferasa tipo 2	1.92	0.00523	Modificación de proteínas.
Rabac1	Proteína aceptora de prenil-Rab 1	1.90	0.00369	Formación de vesículas.
Letm1	Proteína mitocondrial intercambiadora de protones/calcio	1.89	0.01195	Eflujo mitocondrial de protones dependiente de iones calcio.
Cox6c	Subunidad 6C de la citocromo c oxidasa	1.89	0.00221	Componente del complejo IV.
Acads	Acil-CoA deshidrogenasa de ácidos grasos de cadena corta	1.88	0.00017	Oxidación de ácidos grasos.
Prdx5	Peroxirredoxina 5	1.87	0.0343	Metabolismo redox.
Glud1	Glutamato deshidrogenasa 1	1.87	0.00014	Convierte glutamato en alfa-cetoglutarato.
Mmp14	Metaloproteína de matriz 14	1.87	0.01994	Endopeptidasa de la matriz extracelular.
Rpl8	Proteína ribosomal L8 (60S)	1.87	0.00667	Componente del ribosoma.
Prodh	Prolina deshidrogenasa 1	1.86	0.0017	Catabolismo de prolina.
Nnt	NAD(P) transhidrogenasa	1.86	0.00048	La transhidrogenación entre NADH y NADP se acopla a la respiración y la hidrólisis de ATP y funciona como una bomba de protones a través de la membrana.
Purb	Activador transcripcional Pur-beta	1.86	0.01652	Regulación de la transcripción y traducción.
Ndufa4	Subunidad NDUFA4 de la citocromo c oxidasa	1.85	0.02243	Componente del complejo IV.
Eogt	N-acetilglucosamina transferasa unida a O específica del dominio EGF	1.85	0.00002	Glicosilación de proteínas.
Tpp1	Tripeptidil-peptidasa 1	1.84	0.00338	Serina proteasa.
Cnpy2	Protein canopy homolog 2	1.83	0.00003	Regulador negativo de la expresión génica.
Acaa2	3-ketoacil-CoA tiolasa	1.83	0.00046	Oxidación de ácidos grasos.
Hibadh	3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa	1.81	0.00129	Catabolismo de valina.
Atp5me	Subunidad e de la ATP sintasa	1.80	0.00021	Componente de la F1F0 ATP sintasa.
Ppt1	Palmitoil-proteína tiesterasa 1	1.80	0.00032	Degradación de proteínas.
Rpl10	Proteína ribosomal L10 (60S)	1.79	0.00012	Componente del ribosoma.
Rpl24	Proteína ribosomal L24 (60S)	1.79	0.00532	Componente del ribosoma.
Arl8a	Proteína 8A similar al factor de ribosilación de ADP	1.78	0.02151	Movilidad de lisosomas.
Tecr	Very-long-chain enoil-CoA reductasa	1.75	0.00046	Biosíntesis de lípidos.
Hspe1	Proteína de shock térmico (10 kDa)	1.74	0.00007	Co-chaperonina implicada en la importación y ensamblaje de proteínas mitocondriales.
Mmut	Metilmalonil-CoA mutasa	1.73	0.00043	Catabolismo de aminoácidos.
Slc25a11	Transportador mitocondrial 2-oxoglutarato/malato	1.73	0.00591	Transporte de 2-oxoglutarato a través de la membrana mitocondrial.
Mrpl13	Proteína ribosomal L13 (39S)	1.72	0.00015	Componente del ribosoma mitocondrial.
Cox7a2	Subunidad 7A2 de la citocromo c oxidasa	1.72	0.00019	Componente del complejo IV.
Atp6v1c1	Subunidad C de la ATPasa de protones tipo V	1.72	0.00183	Acidificación de compartimientos celulares.
Ndufa10	Subunidad 10 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa 1	1.72	0.00125	Subunidad accesoria del complejo I.
Spcs2	Subunidad 2 del complejo de peptidasa señal	1.715	0.00163	Peptidasa que corta la secuencia señal de proteínas nascentes translocadas al RE.
Tm9sf2	Miembro 2 de la superfamilia transmembrana 9	1.71	0.000388	Proteína transportadora.
Cyct	Citocromo c	1.70	0.00094	Proteína transportadora de electrones. Apoptosis.

Ndufb11	Subunidad 11 del subcomplejo beta de la NADH deshidrogenasa 1	1.70	0.01587	Subunidad accesoria del complejo I.
Vps29	Proteína asociada proteínas vacuolares 29	1.70	0.01493	Tráfico de vesículas.
Echs1	Enoil-CoA hidratasa	1.70	0.01140	Oxidación de ácidos grasos.
Ehd4	EH domain-containing protein 4	1.70	0.00926	Transporte de endosomas.
Rpl4	Proteína ribosomal L4 (60S)	1.69	0.00055	Componente del ribosoma.
Slc25a1	Proteína transportadora de tricarboxilato	1.68	0.00009	Intercambio de citrato mitocondrial por malato citosólico.
Mmgt1	Transportador de membrana de magnesio 1	1.681	0.03489	Transportador de magnesio.
Sdha	Subunidad A de la succinato deshidrogenasa	1.68	0.00033	Subunidad de la succinato deshidrogenasa (Complejo II).
Sdf2l1	Stromal cell-derived factor 2-like protein 1	1.68	0.00265	Degradación de proteínas asociad al RE (ERAD).
Etfb	Subunidad beta de la proteína transferidora de electrones	1.68	0.00023	Oxidación de aminoácidos y ácidos grasos.
Iars2	Isoleucina-tRNA ligasa	1.68	0.00073	Pertenece a la familia de las aminoacil-tRNA sintetasas de clase I.
Pmpca	Subunidad alfa de la peptidasa de procesamiento mitocondrial	1.66	0.00133	Subunidad de la proteasa de procesamiento mitocondrial (MPP).
Rpl19	Proteína ribosomal L19 (60S)	1.66	0.04048	Componente del ribosoma.
Micos13	Subunidad MIC13 del complejo MICOS	1.66	0.00026	Componente del complejo MICOS.
Glrx5	Glutaredoxina-related protein 5	1.66	0.01272	Biogénesis de clusters Fe-S.
Nipsnap1	Proteína homóloga NipSnap 1	1.65	0.00176	Pertenece a la familia de las NipSnap.
Tomm7	Subunidad TOM7 del receptor mitocondrial importador TOM	1.65	0.02594	Ensamblaje del complejo TOM. Regulador positivo de la translocación de PRKN a mitocondrias dañadas.
Slc25a3	Proteína transportadora de fosfato	1.65	0.00060	Transporte de grupos fosfato del citosol a la mitocondria.
Pmpcb	Subunidad beta de la peptidasa de procesamiento mitocondrial	1.64	0.02587	Subunidad de la proteasa de procesamiento mitocondrial (MPP). Corta la secuencia mitocondrial de precursores importados a la mitocondria
Dlsl	Dihidrolipoil-lisina succiniltransferasa componente del complejo de la 2-oxoglutarate deshidrogenasa	1.64	0.02100	Componente del complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa
Mrpl19	Proteína ribosomal L19 (39S)	1.64	0.01025	Componente del ribosoma mitocondrial.
Sucla2	Subunidad beta de la succinato-CoA ligasa [forma ADP]	1.64	0.00068	Componente de la succinil-CoA sintetasa ATP específica.
Rpl7a	Proteína ribosomal L7a (60S)	1.64	0.00160	Componente del ribosoma.
Tm9sf4	Miembro 4 de la superfamilia transmembrana 9	1.64	0.00088	Proteína transportadora.
Mrpl39	Proteína ribosomal L39 (39S)	1.63	0.03526	Componente del ribosoma mitocondrial.
EtfA	Subunidad alfa de la proteína transferidora de electrones	1.63	0.00001	Oxidación de aminoácidos y ácidos grasos.
Sacm1l	Fosfatidilinositol-3-fosfatasa	1.62	0.02061	Actividad fosfatasa.
Sod2	Superóxido dismutasa (MnSOD)	1.62	0.00163	Metabolismo redox.
Ak2	Adenilato quinasa 2	1.62	0.00006	Transferencia de grupo fosfato entre ATP y AMP.
Rtn4	Reticulona 4	1.62	0.00001	Necesaria para la formación de os túbulos del RE.
Stx7	Sintaxina 7	1.62	0.00239	Tráfico de proteínas.
Rpl27	Proteína ribosomal L27 (60S)	1.62	0.00542	Componente del ribosoma.
Dlat	Dihidrolipoil-lisina-residuo acetiltransferasa componente del complejo PDH	1.61	0.00235	Componente del complejo de la Piruvato deshidrogenasa
Rps23	Proteína ribosomal S23 (40S)	1.60	0.01545	Componente del ribosoma.
Ndufa6	Subunidad 6 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa 1	1.60	0.01470	Subunidad accesoria del complejo I.
Dad1	Dolcil-difosfo-oligosacrido--protein glicosiltransferasa subunidad DAD1	1.60	0.00283	Glicosilación de proteínas
Hadh	Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	1.59	0.00068	Oxidación de ácidos grasos.
Amacr	Alfa-metilacil-CoA racemasa	1.59	0.01944	Metabolismo de lípidos.
Gstm2	Glutatión S-transferasa Mu 2	1.59	0.00461	Metabolismo redox.
Ncald	Neurocalcina delta	1.59	0.00991	Señalización mediada por calcio.
Rps11	40S ribosomal protein S11	1.59	0.01176	Componente del ribosoma.
Atp6v1h	Subunidad H de la ATPasa de protones tipo V	1.58	0.00549	Acidificación de compartimientos celulares.
Tufm	Factor de elongación Tu	1.58	0.00023	Traducción de proteínas.

Npc2	NPC transportador de colesterol intracelular 2	1.57	0.03479	Transportador de colesterol.
Rpl3	Proteína ribosomal L3 (60S)	1.57	0.00267	Componente del ribosoma.
Slc25a12	Transportador mitocondrial dependiente de calcio Aralar1	1.57	0.00461	Intercambiador mitocondrial de glutamato citosólico por aspartato mitocondrial dependiente de calcio.
Tmx3	Proteína disulfuro isomerasa TMX3	1.57	0.00030	Plegamiento de proteínas.
Tmed2	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	1.57	0.01228	Tráfico de vesículas.
Suc1g2	Subunidad beta de la succinato-CoA ligasa [Forma GDP]	1.56	0.00417	Componente de la succinil-CoA sintetasa GTP específica. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.
Ctsd	Catepsina D	1.56	0.00041	Proteasa.
Rps14	Proteína ribosomal S14 (40S)	1.55	0.02690	Componente del ribosoma.
Plbd2	Fosfolipasa putativa 2	1.55	0.02347	Fosfolipasa.
Creg1	Proteína CREG1	1.55	0.00139	Control transcripcional del crecimiento celular.
Htra2	Serina proteasa HTRA2	1.54	0.00292	Serina proteasa con actividad proteolítica contra sustrato no específica beta-caseína. Apoptosis.
Gns	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	1.54	0.00374	Metabolismo de glucosaminoglicanos.
Atp6v1b2	Subunidad B de la ATPasa de protones tipo V	1.53	0.00103	Acidificación de compartimientos celulares.
Tomm70	Subunidad del receptor del importador mitocondrial TOM70	1.53	0.00084	Importación proteínas precursoras mitocondriales.
Dld	Dihidrolipoil deshidrogenasa	1.52	0.00007	Componente de las alfa-ceto ácidos deshidrogenasas
Rps4x	Proteína ribosomal S4 (40S)	1.52	0.00003	Componente del ribosoma.
Agk	Acil-glicerol quinasa	1.52	0.00417	Fosforila tanto monoacilglicerol como diacilglicerol para formar ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido fosfatídico (PA) respectivamente.
Uqcrb	Subunidad 7 del complejo del citocromo b-c1	1.52	0.00058	Componente de complejo ubiquinol-complejo IV.
Aco2	Aconitato hidratasa	1.52	0.00303	Cataliza la isomerización de citrato a isocitrato vía cis-aconitato.
Mdh2	Malato deshidrogenasa	1.51	0.00492	Cataliza la oxidación de malato a oxalacetato reduciendo NAD a NADH.
Sgpl1	Esfingosina-1-fosfato liasa 1	1.51	0.01343	Metabolismo de lípidos.
Rcn2	Reticulocalbina 2	1.51	0.02006	Proteína del ER. Une calcio
Mic19	Subunidad Mic19 del complejo MICOS	1.51	0.01338	Componente del complejo MICOS.
Gls	Glutaminasa	1.50	0.01652	Catabolismo de glutamina.
Acadm	Acil-CoA deshidrogenasa específica de ácidos grasos de cadena media	1.50	0.01622	Oxidación de ácidos grasos.
Atp5pd Atp5h	Subunidad d de a ATP sintasa	1.40	0.01769	Componente de la F1F0 ATP sintasa.
Rpl23a	Proteína ribosomal L23a (60S)	1.49	0.00137	Componente del ribosoma.
Rps8	Proteína ribosomal S8 (40S)	1.49	0.00082	Componente del ribosoma.
Faf2	Factor 2 asociado a FAS	1.49	0.01037	Degradación de proteínas asociad al RE (ERAD).
Suc1g1	Subunidad alfa de la Succinato-CoA ligasa	1.49	0.00081	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos.
Sdhb	Subunidad b de la succinato deshidrogenasa	1.49	0.00022	Componente de la succinato deshidrogenasa.
Pdha1	Subunidad alfa del componente E1 de la piruvato deshidrogenasa	1.48	0.00312	Componente de la piruvato deshidrogenasa.
Bcat2	Aminotransferasa de aminoácidos ramificados	1.48	0.00447	Catabolismo de leucina, isoleucina y valina.
Emc8	Proteína de membrane del ER subunidad 8	1.48	0.01039	Proteína del ER.
Rpl31	Proteína ribosomal L31 (60S)	1.48	0.01729	Componente del ribosoma.
Ctsz	Catepsina Z	1.48	0.03793	Proteasa.
Got2	Aspartato aminotransferasa	1.48	0.00534	Catabolismo de aminoácidos.
Pitrm1	Proteasa pre-secuencia	1.47	0.01066	Metaló endopeptidasa de la matriz mitocondrial.
Uggt1	UDP-glucosa:glucoproteína glucosiltransferasa 1	1.47	0.00004	Glicosilación de proteínas.
Slc25a13	Proteína mitocondrial transportadora de unión a calcio Aralar2	1.47	0.01034	Intercambio a través de la membrana mitocondrial interna dependiente de calcio de glutamato citosólico con aspartato mitocondrial.
Ctsb	Catepsina B	1.46	0.00935	Proteasa.
Mtco2	Subunidad 2 de la citocromo c oxidasa	1.46	0.01564	Componente del complejo IV.
G3bp1	Proteína 1 de unión a proteínas activadora de Ras GTPasa	1.45	0.01594	Se une a ATP, ADN. Respuesta inmune.
Pa2g4	Proteína asociada a proliferación 2G4	1.45	0.00622	Transducción de señales.

Gusb	Beta-glucuronidasa	1.45	0.00553	Metabolismo de carbohidratos.
Gaa	Glucosidasa alfa lisosomal	1.44	0.00730	Degradación de glucógeno en lisosomas.
Slc25a4	ADP/ATP translocasa 1	1.44	0.00006	Cataliza el intercambio de ADP citosólico con ATP mitocondrial a través de la membrana mitocondrial interna.
Atp5po	Subunidad O de la ATP sintasa	1.43	0.00356	Componente de la ATP sintasa.
Tyrp1	Ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico oxidasa	1.43	0.01078	Biosíntesis de melanina
Rps9	Proteína ribosomal S9 (40S)	1.42	0.00630	Componente del ribosoma.
Sfxn1	Sideroflexina 1	1.42	0.00097	Transporte de serina a la mitocondria.
Ndufa9	Subunidad 9 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa	1.42	0.01729	Subunidad accesoria del complejo I.
Cycs	Citocromo c	1.41	0.00961	
Ech1	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA isomerasa	1.41	0.03992	Oxidación de ácidos grasos.
Uqcrrf1	Subunidad Rieske del complejo citocromo b-c1	1.41	0.01906	Componente del complejo IV.
Pgrmc1	Componente 1 del receptor de progesterona asociado a membrana	1.40	0.00058	Homeostasis del hemo.
Arl6ip5	PRA1 family protein 3	1.40	0.03798	Regulación de concentraciones intracelulares de taurina y glutamato.
Lonp1	Lon proteasa homóloga	1.40	0.00005	Degradación de proteínas dañadas, mal plegadas u oxidadas de la matriz mitocondrial de manera ATP-dependiente.
Ogdh	2-oxoglutarato deshidrogenasa	1.39	0.00263	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Atp5pb	Subunidad B1 de la ATP sintasa	1.39	0.00775	Componente de la ATP sintasa.
Ehd3	EH domain-containing protein 3	1.39	0.01004	Organización de la membrana.
Hyou1	Proteína regulada por hypoxia 1	1.38	0.01323	Rol cito-protectivo durante la hipoxia.
Mtarc2	Componente 2 de la amidoxima reductora mitocondrial	1.38	0.00798	Cataliza la reducción de moléculas N-oxigenadas.
Mic60	Subunidad Mic60 del complejo MICOS	1.38	0.02372	Componente del complejo MICOS.
Cox4i1	Isoforma 1 de la subunidad 4 de la citocromo c oxidasa	1.38	0.00122	Componente del complejo IV.
Calr	Calreticulina	1.38	0.00686	Proteína que une calcio del RE. Plegamiento, ensamblaje y control de calidad de proteínas.
Aifm1	Factor inductor de la apoptosis 1	1.37	0.00190	Regulador de la apoptosis.
Hspd1	Proteína de choque térmico de 60 kDa	1.37	0.00422	Chaperona mitocondrial.
Ndufa13	Subunidad 13 del subcomplejo alfa de la NADH deshidrogenasa	1.37	0.01473	Subunidad accesoria del complejo I.
Rplp0	Proteína ácida ribosomal P0 (60S)	1.36	0.00272	Componente del ribosoma.
Txndc12	Tiorredoxina domain-containing proteína 12	1.36	0.01383	Actividad tiol-disulfuro oxidasa.
Atp5f1a	Subunidad alfa de la ATP sintasa	1.36	0.00043	Componente de la ATP sintasa.
Asah1	Ceramidasa ácida	1.35	0.00795	Metabolismo de lípidos.
Pdia4	Proteína disulfuro isomerasa A4	1.35	0.01446	Plegamiento de proteínas.
Cyb5r3	NADH-citocromo b5 reductasa 3	1.35	0.00961	Desaturación y elongación de ácidos grasos.
Rps2	Proteína ribosomal S2 (40S)	1.34	0.01036	Componente del ribosoma.
Scp2	Proteína transferidora de lípidos no específica	1.34	0.00052	Transferencia de fosfolípidos, colesterol y gangliósidos entre membranas.
Rpl13	Proteína ribosomal L13 (60S)	1.33	0.01079	Componente del ribosoma.
Rpl5	Proteína ribosomal L5(60S)	1.33	0.02554	Componente del ribosoma.
Cs	Citrato sintasa	1.32	0.00454	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Mtx2	Metaxina 2	1.32	0.01981	Transporte de proteínas hacia la mitocondria.
Gdpd1	Lisofosfolipasa D	1.32	0.01135	Catabolismo de lípidos.
Surf4	Surfeit locus protein 4	1.30	0.03309	Mantenimiento de ERGIC.
Tmco1	Calcium load-activated calcium channel	1.30	0.01364	Canal de calcio.
Dpm1	Dolicol-fosfato manosiltransferasa subunidad 1	1.30	0.01008	Glicosilación de proteínas.
Gstm1	Glutatión S-transferasa Mu 1	1.29	0.02041	Metabolismo redox.
Rpl9	Proteína ribosomal L9 (60S)	1.29	0.01598	Componente del ribosoma.
Hspa9	Proteína de estrés 70	1.28	0.01726	Chaperona mitocondrial.
P4hb	Proteína disulfuro isomerasa	1.28	0.00050	Cataliza la formación, degradación y re-arreglo de puentes disulfuro.
Dct	L-dopacromo tautomerasa	1.28	0.01989	Biosíntesis de melanina.
Pdia3	Proteína disulfuro isomerasa A3	1.27	0.00366	Plegamiento de proteínas.
Fh	Fumarato hidratasa	1.27	0.00255	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
Samm50	Componente 50 homóloga de la maquinaria de <i>sorting</i> y ensamblado	1.27	0.01717	Mantenimiento de las crestas mitocondriales y ensamblaje de los complejos respiratorios.
Phb	Prohibitina	1.27	0.00167	Inhibe la síntesis de ADN. Regulación de la proliferación.

Slc25a5 Ant2	ADP/ATP translocasa 2	1.26	0.00316	Cataliza el intercambio de ADP citosólico con ATP mitocondrial a través de la membrana mitocondrial interna.
Rps15a	Proteína ribosomal S15a (40S)	1.26	0.01776	Componente del ribosoma.
Rps3	Proteína ribosomal S3 (40S)	1.24	0.00848	Componente del ribosoma.
Pgrmc2	Componente 2 del receptor de progesterona asociado a membrana	1.23	0.00012	Receptor de progesterona.
Pthr2	Peptidil-ARNt hidrolasa 2	1.22	0.00225	Síntesis de proteínas.
Phb2	Prohibitina 2	1.22	0.00553	Regula el ensamblaje del complejo IV. Represión de la transcripción.
Canx	Calnexina	1.21	0.03956	Control de calidad de proteínas.
Bak1	Homólogo antagonista de Bcl-2	1.21	0.01449	Promueve la permeabilización de la MME.
Eef1b	Factor de elongación 1-beta	1.20	0.02969	Traducción.
Rpn2	Subunidad 2 de la dolícil-difosfo-oligosacárido glicosiltransferasa	1.19	0.01635	Glicosilación de proteínas.
Septin6	Septina 6	0.84	0.01873	Organización del citoesqueleto de actina.
Rab7a	Proteína relacionada a Ras Rab-7a	0.84	0.01303	Formación de endosomas.
Mogs	Manosil-oligosacárido glucosidasa	0.82	0.01254	Degradación de glicanos.
Rab5c	Proteína relacionada a Ras Rab-5C	0.80	0.00637	Tráfico de vesículas.
Cacybp	Proteína de unión a calciclina	0.80	0.02618	Ubiquitinación de proteínas dependiente de calcio.
Mrpl4	Proteína ribosomal L4 (39S)	0.80	0.01516	Componente del ribosoma mitocondrial.
Rab5a	Proteína relacionada a Ras Rab-5A	0.80	0.00941	Tráfico de vesículas.
Prdx2	Peroxisredoxina 2	0.79	0.03562	Metabolismo redox.
Prdx1	Peroxisredoxina 1	0.78	0.00202	Metabolismo redox.
Prxl2a	Peroxisredoxina <i>like</i> 2A	0.76	0.02154	Metabolismo redox.
Mthfd1l	Monofuncional C1-tetrahidrofolato sintasa	0.76	0.02525	Metabolismo del folato.
Tmx1	Proteína transmembrana 1 relacionada a la tiorredoxina	0.74	0.00026	Metabolismo redox.
Ddx3x	ARN helicasa dependiente de ATP	0.74	0.00648	Helicasa.
Mcam	Glicoproteína de superficie MUC18	0.74	0.00970	Adhesión celular.
Serpinh1	Serpina H1	0.73	0.00521	Biosíntesis de colágeno.
Rps27a	Proteína ribosomal ubiquitinada S27a (40S)	0.72	0.00229	Componente del ribosoma.
H4c1	Histona H4	0.72	0.01412	Histona.
Arpc4	Subunidad 4 del complejo relacionado a la actina 2/3	0.72	0.00402	Polimerización de actina.
Anxa2	Anexina A2	0.72	0.00778	Proteína de membrana regulada por calcio.
Eif4a1	Factor de iniciación eucariota 4A-I	0.71	0.00422	Traducción.
Eef1a1	Factor de elongación 1-alpha 1	0.70	0.00026	Traducción.
Cltc	Cadena pesada de la clatrina 1	0.69	0.00005	Proteína de vesículas.
Eef2	Factor de elongación 2	0.69	0.00293	Traducción.
Nme1	Nucleósido difosfato quinasa A	0.68	0.00267	Síntesis de nucleósidos trifosfatos.
Eef1a2	Factor de elongación 1-alpha 2	0.67	0.00027	Traducción.
Acaa1a	3-cetoacil-CoA tiasa A	0.67	0.01231	Oxidación de ácidos grasos.
Rhog	Proteína de unión a GTP relacionada a Rho	0.67	0.03253	Organización del citoesqueleto de actina.
Anxa1	Anexina A1	0.67	0.01337	Actividad anti-inflamatoria.
Marcks	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	0.66	0.00930	Organización citoesqueleto de actina.
Ero1a	ERO1-like protein alpha	0.66	0.00068	Formación de puentes disulfuro en el RE.
Pcbp1	Proteína 1 de unión a Poly(rC)	0.66	0.00123	Procesamiento del ARNm.
Ncl	Nucleolina	0.66	0.01487	Proteína nucleolar.
Hk2	Hexoquinasa 2	0.65	0.00074	Glucólisis. Integridad de la MME.
Sprb	Subunidad beta de la partícula de reconocimiento de señal	0.64	0.01553	Componente de la partícula de reconocimiento de señal.
Atp1a2	ATPasa de sodio/potasio subunidad alfa 2	0.63	0.00324	Bomba de sodio/potasio.
Ybx3	Y-box-binding protein 3	0.63	0.01126	Represión de la traducción.
Msn	Moesina	0.63	0.00019	Componente del citoesqueleto.
Atp1a4	ATPasa de sodio/potasio subunidad alfa 4	0.63	0.00544	Bomba de sodio/potasio.
Acsf3	Acetil-CoA ligase 3 de ácidos grasos de cadena larga	0.62	0.00750	Biosíntesis de ácidos grasos.
Gfm1	Factor G de elongación	0.62	0.01695	Síntesis mitocondrial de proteínas.
Ckb	Creatina quinasa de tipo B	0.62	0.00252	Transferencia de fosfato.
Gars1	Glicina-ARNt ligasa	0.61	0.00419	Síntesis de proteínas.
Itgb1	Integrina beta-1	0.61	0.00018	Receptor de colágeno.
Ppia	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa A	0.61	0.00057	Plegamiento de proteínas.
Cttn	Src substrate cortactin	0.60	0.02337	Componente del citoesqueleto
Ap1b1	Subunidad beta 1 del complejo AP-1	0.60	0.007018	Tráfico de vesículas.

Hsd17b4	Enzima tipo 2 multifuncional peroxisomal	0.58	0.00003	Oxidación peroxisomal de ácidos grasos.
Ppp2ca	Serina/treonina-fosfatasa 2A	0.58	0.00319	Fosfatasa de proteínas asociadas a microtúbulos.
Rdx	Radixina	0.58	0.00006	Componente del citoesqueleto
Wdr1	WD repeat-containing protein 1	0.58	0.00084	Componente del citoesqueleto
Sptan1	Cadena alfa de la espectrina no eritrocítica 1	0.57	0.00108	Componente del citoesqueleto
Atp1a1	ATPasa de sodio/potasio subunidad alfa 1	0.57	0.00011	Bomba de sodio/potasio.
Sars1	Serina-tRNA ligasa	0.56	0.00064	Traducción.
Rab18	Ras-related protein Rab-18	0.56	0.00008	Vesículas.
Prdx4	Peroxisredoxina 4	0.56	0.00066	Metabolismo redox.
Iap	Proteína de unión a IgE	0.55	0.00535	
Atp6v0a1	ATPasa tipo V subunidad 116 kDa a1	0.55	0.00628	Bomba ATPasa de vacuolas.
Pebp1	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1	0.55	0.01852	Transducción de señales.
Cyp51a1	Lanosterol 14-alfa demetilasa	0.55	0.00030	Biosíntesis de esteroides.
Pls3	Plastina 3	0.55	0.00568	Organización del citoesqueleto.
Tpi1	Triosefosfato isomerasa	0.54	0.00389	Glucólisis y gluconeogénesis.
Ezr	Ezrina	0.54	0.00003	Componente del citoesqueleto.
Arpc1b	Subunidad 1B del complejo de la proteína relacionada a actina 2/3	0.54	0.01355	Componente del citoesqueleto.
Krt1	Queratina tipo II	0.54	0.02218	Transducción de señales.
Eif5a	Factor de iniciación de la traducción de eucariotas 5A-1	0.54	0.00934	Traducción.
Hsp90aa1	Proteína de choque térmico HSP 90	0.54	0.00086	Chaperona.
Etf1	Subunidad 1 del factor de liberación de la cadena peptídica eucariota	0.53	0.00011	Traducción.
Ldhd	Lactato deshidrogenasa cadena B	0.52	0.02544	Fermentación de piruvato a lactato.
H2az1	Histona H2A.Z	0.52	0.01095	Histona.
Slc12a7	Miembro 7 de la familia 12 de transportadores de solutos	0.52	0.00015	Cotransporte de Cl y K.
Txn	Tioredoxina	0.52	0.02173	Metabolismo redox.
Arf4	Factor 4 de ADP-ribosilación	0.51	0.00062	Tráfico de proteínas.
Capza2	Subunidad alfa de proteína capsula de actina	0.51	0.00574	Componente del citoesqueleto.
Abcd3	Miembro 3 de la subfamilia D de la ATP-binding cassette	0.51	0.00044	Transporte de ácidos grasos a los peroxisomas.
Atp1b3	Subunidad beta-3 de ATPasa transportadora de sodio/potasio	0.51	0.00018	Hidrólisis de ATP acoplado al intercambio de iones Na y K.
Got1	Aspartato aminotransferasa	0.51	0.01164	Biosíntesis de glutamato.
H2ac20	Histona H2A tipo 2C	0.50	0.01208	Histona.
Cct5	Subunidad epsilon del complejo T	0.50	0.00106	Plegamiento de proteínas.
Fv4	Retrovirus-related Env polyprotein from Fv-4 locus	0.49	0.00032	
Srpra	Subunidad alfa del receptor de reconocimiento de señales	0.49	0.00293	Translocación de proteínas al RE.
Mthfd2	Enzima bifuncional metilenotetrahidrofolato deshidrogenasa/ciclohidrolasa	0.48	0.00846	Actividades metilenotetrahidrofolato deshidrogenasa y metilenotetrahidrofolato ciclohidrolasa.
Lin7c	Protein lin-7 homolog C	0.48	0.00322	Distribución de canales y receptores en la membrana plasmática.
H2bc4	Histona H2B tipo 1-C/E/G	0.47	0.00559	Histona.
Hsp90ab1	Proteína de choque térmico HSP 90-beta	0.47	0.00012	Chaperona.
Cct3	Subunidad gamma del complejo T	0.47	0.00142	Plegamiento de proteínas.
Arf1	Factor 1 de ADP-ribosilación	0.47	0.00038	Tráfico de proteínas.
Eps8	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	0.47	0.00025	Regulación de protrusiones.
Pkm	Piruvato kinasa M	0.47	0.00064	Glicólisis.
Ldhd	Lactato deshidrogenasa cadena C	0.47	0.00468	Fermentación de piruvato a lactato.
H2bc1	Histona H2B tipo 1-A	0.46	0.00648	Histona.
H2bc21	Histona H2B tipo 2-E	0.46	0.00446	Histona.
Plod2	Procolágeno-lisina,2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2	0.46	0.01863	Mantenimiento de colágeno.
Rala	Proteína Ral-A relacionada a Ras	0.46	0.00024	Organización del citoesqueleto.
Rap1a	Proteína Rap-1A relacionada a Ras	0.46	0.00005	Contrarresta la función mitogénica de Ras
Rac1	Proteína toxina botulínica C3 relacionada a	0.45	0.00017	Organización del citoesqueleto.
Rap1b	Proteína Rap-1b relacionada a Ras	0.45	0.00006	Organización del citoesqueleto.
Pgd	6-fosfogluconato deshidrogenasa	0.45	0.00002	Ruta de las pentosas fosfato.

Ap2b1	AP-2 complex subunit beta (AP105B)	0.44	0.00032	Tráfico de vesículas.
Cct6a	Subunidad zeta del complejo T 1	0.44	0.00001	Chaperona de actina y tubulina.
Cd81	CD81 antígeno	0.44	0.00123	Agrupación y señalización de receptores.
Arf5	Factor 5 de ADP-ribosilación	0.44	0.00009	Tráfico de proteínas.
Pgk1	Fosfoglicerato quinasa 1	0.44	0.00014	Glucólisis.
Cyfp2	Proteína citoplásmica 2 que interactúa con FMR1	0.43	0.00009	Organización del citoesqueleto.
Ywhag	14-3-3 proteína gamma	0.43	0.01267	Transducción de señales.
Ralb	Proteína Ral-B relacionada a Ras	0.43	0.00004	Organización del citoesqueleto.
Ywhaz	14-3-3 proteína zeta/delta	0.42	0.00416	Transducción de señales.
Gnb1	Proteína de unión a nucleótidos de guanina	0.42	0.00038	Transducción de señales.
Coro1b	Coronina-1B	0.42	0.00013	Transducción de señales y citoquinesis.
Ap2a1	Subunidad alfa 1 del complejo AP-2	0.41	0.00005	Tráfico de vesículas.
Ywhah	14-3-3 proteína eta	0.41	0.01284	Transducción de señales.
Pgam1	Fosfoglicerato mutasa 1	0.41	0.00053	Glucólisis.
Cot1	Coactosina-like protein	0.41	0.00015	Actividad chaperona.
Ywhab	14-3-3 proteína beta/alfa	0.41	0.01288	Transducción de señales.
Kpnb1	Importina subunidad beta-1	0.41	0.02150	Importina nuclear.
Coro1c	Coronina-1C	0.40	0.00001	Transducción de señales y citoquinesis.
Gnb4	Proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad 4	0.40	0.00073	Transducción de señales.
Actg1	Actina	0.40	0.00001	Citoesqueleto
Arhgdia	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	0.40	0.00029	Homeostasis de proteínas Rho.
Acta2	Actina 2	0.40	0.00001	Citoesqueleto
Ppp1ca	Subunidad catalítica alfa de fosfatasa serina/treonina PP1	0.40	0.00002	Transducción de señales.
Cat	Catalasa	0.39	0.00032	Metabolismo redox
Glo1	Lactoilglutación liasa	0.38	0.00852	Metabolismo de carbohidratos.
Cct4	Subunidad delta del complejo T 1	0.38	0.00436	Plegamiento de proteínas.
Arf6	Factor 6 de ADP-ribosilación	0.38	0.00019	Tráfico de proteínas.
Ywhae	14-3-3 proteína epsilon	0.38	0.00308	Transducción de señales.
Gnao1	Proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad alfa	0.38	0.00051	Transducción de señales.
Actbl2	Beta-actin-like protein 2	0.38	0.00080	Citoesqueleto.
Ppp1cb	Subunidad catalítica beta de fosfatasa serina/treonina PP1	0.38	0.00001	Transducción de señales.
Hras	GTPasa HRas	0.37	0.00009	Transducción de señales.
Tubb4b	Tubulina cadena beta 4-B	0.37	0.00007	Citoesqueleto.
Cyfp1	Proteína citoplásmica que interactúa con FMR1	0.37	0.00007	Represión de la traducción.
Fabp5	Proteína 5 de unión a ácidos grasos	0.37	0.00075	Transporte intracelular de ácidos grasos.
Eno1	Alfa-enolasa	0.37	0.00001	Glucólisis.
Cct8	Subunidad theta del complejo T 1	0.36	0.00057	Plegamiento de proteínas.
Tubb2a	Tubulina beta-2A	0.36	0.00008	Citoesqueleto.
Cct7	Subunidad eta del complejo T de la proteína 1	0.36	0.00049	Plegamiento de proteínas.
Tubb4a	Tubulina beta-4A	0.36	0.00006	Citoesqueleto.
Gdi2	Inhibidor beta de la disociación del GDP de Rab	0.36	0.00011	Transducción de señales.
Kras	GTPasa KRas	0.36	0.00017	Transducción de señales.
Tubb5	Tubulina beta-5	0.36	0.00004	Citoesqueleto.
Gpi	Glucosa-6-fosfato isomerasa	0.35	0.00033	Glucólisis.
Cfl2	Cofilina 2	0.35	0.00137	Organización del citoesqueleto.
Actn4	Actinina alfa	0.35	0.00027	Citoesqueleto.
Ppp1cc	Subunidad catalítica gamma de fosfatasa serina/treonina PP1	0.35	0.00001	Transducción de señales.
Anxa4	Anexina A4	0.35	0.00004	
Tubb6	Tubulin beta-6 chain	0.35	0.00003	Citoesqueleto.
P4ha1	Subunidad alfa 1 de la prolil-4-hidroxilasa	0.35	0.00003	Síntesis de colágeno.
Ldha	Lactato deshidrogenasa a	0.35	0.00123	Fermentación de piruvato a lactato.
Ptges3	Prostaglandina E sintasa 3	0.35	0.00049	Biosíntesis de prostaglandinas.
Ppp2r1a	Subunidad reguladora alfa de fosfatasa serina/treonina 2A	0.34	0.00053	Transducción de señales.
Tubb1	Tubulina beta-1	0.34	0.00001	Citoesqueleto.
Lima1	LIM domain and actin-binding protein 1	0.34	0.00208	Citoesqueleto.
Tuba1c	Tubulina alfa-1C	0.34	0.00001	Citoesqueleto.
Tuba1a	Tubulina alfa-1A	0.34	0.00001	Citoesqueleto.

Gnai2	Proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad alfa 2	0.34	0.00007	Transducción de señales.
Tubb3	Cadena tubulina beta 3	0.34	0.00003	Citoesqueleto.
Snap23	Proteína 23 asociada a sinaptosomas	0.33	0.00992	Exocitosis.
Ap2m1	Subunidad mu del complejo AP-2	0.33	0.00017	Tráfico de vesículas.
Tuba4a	Tubulina alfa-4A	0.33	0.00001	Citoesqueleto.
Actn2	Alfa-actinina-2	0.33	0.00001	Citoesqueleto.
Eno3	Beta-enolasa	0.33	0.00029	Glucólisis.
Rap2b	Proteína Rap-2b relacionada a Ras	0.32	0.00003	Organización del citoesqueleto.
Actn1	Alfa-actinina-1	0.31	0.00015	Citoesqueleto.
Uap111	UDP-N-acetilhexosamina pirofosforilasa-like protein 1	0.30	0.00126	
Tcp1	Subunidad alfa del complejo T de la proteína 1	0.29	0.00017	Plegamiento de proteínas.
Arhgdib	Inhibidor de la disociación del GDP de Rab 2	0.29	0.02167	Transducción de señales.
Slc3a2	4F2 cell-surface antigen heavy chain	0.28	0.00006	Transporte de aminoácidos.
Rap2c	Proteína Rap-2c relacionada a Ras	0.28	0.00002	Organización del citoesqueleto.
Ca14	Anhidrasa carbónica 14	0.27	0.00004	
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	0.27	0.00207	Organización del citoesqueleto.
Gnas	Proteína G de unión a nucleótidos de guanina	0.27	0.00001	Transducción de señales.
Epb41l2	Band 4.1-like protein 2	0.26	0.00027	Organización del citoesqueleto.
Gnai3	Proteína G de unión a nucleótidos de guanina subunidad alfa	0.25	0.00014	Transducción de señales.
Dpysl2	Proteína 2 relacionasa a dihidropirimidinasa	0.25	0.00081	Organización del citoesqueleto.
Tfrc	Receptor de transferrina 1	0.25	0.00001	Homeostasis del hierro.
Lrrc57	Leucine-rich repeat-containing protein 57	0.24	0.00041	Proteína de membrana.
Ctnna1	Catenina alfa-1	0.23	0.00004	Organización del citoesqueleto.
Calm3	Calmodulina -3	0.23	0.00347	Señalización mediada por calcio.
Ctnnb1	Catenina beta-1	0.22	0.00001	Organización del citoesqueleto.
Uba1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	0.22	0.00015	Ubiquitinación de proteínas.
Gna13	Proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad alfa 13	0.22	0.00049	Transducción de señales.
Hnrnpa2b1	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares A2/B1	0.21	0.00015	Metabolismo del ARNm.
Scd3	Acil-CoA desaturasa 3	0.21	0.00002	Síntesis de ácidos grasos.
Fkbp4	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	0.20	0.00007	Plegamiento de proteínas.
Atic	Proteína bifuncional de la síntesis de purinas PURH	0.20	0.00039	Biosíntesis de purinas.
Ran	Proteína Ran de unión a GTP	0.20	0.00001	Transporte nuclear de proteínas y ARNs.
Rasa3	Proteína 3 activadora GTPasa	0.19	0.00001	Transducción de señales.
Slc7a5	Subunidad pequeña 1 del transportador de aminoácidos neutros grandes	0.19	0.00004	Transporte de aminoácidos.
Pfn1	Profilina 1	0.19	0.00003	Organización el citoesqueleto.
Rhoc	Rho-related GTP-binding protein RhoC	0.19	0.00021	Transducción de señales.
Gna11	Proteína de unión a nucleótidos de guanina subunidad alfa 11	0.18	0.00001	Transducción de señales.
Iqgap1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	0.18	0.00001	Organización el citoesqueleto.
Flna	Filamina A	0.18	0.00001	Organización el citoesqueleto.
Fdps	Farnesil pirofosfato sintasa	0.17	0.00916	Biosíntesis de isoprenoides.
Phgdh	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa	0.17	0.00001	Biosíntesis de aminoácidos.
Fads2	Acil-CoA 6-desaturasa	0.16	0.00001	Biosíntesis de lípidos.
Tln1	Talina 1	0.16	0.00001	Organización el citoesqueleto.
Rhoa	Transforming protein RhoA	0.16	0.00049	Transducción de señales.
Gnaq	Proteína G (q) de unión a nucleótidos de guanina subunidad alfa	0.15	0.00001	Transducción de señales.
Cdk2	Quinasa dependiente de ciclinas 2	0.15	0.00369	Control del ciclo celular.
Slc16a1	Transportador de monocarboxilatos 1	0.15	0.00048	Transportador de monocarboxilatos.
Myi9	Myosin regulatory light polypeptide 9	0.14	0.00155	Movimiento del citoesqueleto.
Mpp6	MAGUK p55 subfamily member 6	0.13	0.00002	Transducción de señales.
Cnn3	Calponina 3	0.09	0.01866	Movimiento del citoesqueleto.
Afn	Afadina	0.09	0.00001	Adhesión celular.
Snca	Alfa sinucleína	0.06	0.00001	Tráfico de vesículas.
Tagln2	Transgelina 2	0.06	0.00087	Deferenciación celular.
Glut1	Miembro 1 de la familia 2 de transporte facilitado de glucosa	0.05	0.00001	Transporte de glucosa.

Flnb	Filamina B	0.05	0.01709	Organización del citoesqueleto.
------	------------	------	---------	---------------------------------

Tabla 7. Análisis diferencial de enriquecimiento de Procesos biológicos. Enriquecimiento de los Procesos biológicos de la base de datos de *GeneOntology* con las proteínas totales identificadas únicas y las proteínas aumentadas de cada condición. Las tablas muestran los genes de las proteínas identificadas en células Control y tratadas con TMZ, pertenecientes a cada término y grupo.

Grupo	p-valor (Grupo)	Término	p-valor (Término)	Genes TMZ	Genes Control
Catabolismo de pequeñas moléculas	6.01x10 ⁻⁷	Catabolismo de pequeñas moléculas	5.6x10 ⁻⁶	Abhd16a, Acadm, Acadvl, Aldh4a1, Apoe, Bcat2, Etfb, Glis, Got2, Gusb, Hadha, Oxct1, Pcyox1	Galk1, Got1, Hsd17b4, Ldha
		Catabolismo de lípidos	2.3x10 ⁻⁴	Abhd12, Abhd16a, Acadm, Acadvl, Apoe, Asah1, Etfb, Gba, Gla, Gm2a, Hadha, Hexa, Hint2, Smpd1	Hsd17b4
		Catabolismo de ácidos orgánicos	1.2x10 ⁻⁵	Abhd16a, Acadm, Acadvl, Aldh4a1, Bcat2, Etfb, Glis, Got2, Gusb, Hadha, Pcyox1	Got1, Hsd17b4
		Catabolismo de derivados de carbohidratos	5.0x10 ⁻²	Gba, Gla, Gm2a, Gusb, Hexa, Mlycd	
		Catabolismo de lípidos	2.4x10 ⁻⁴	Abhd12, Abhd16a, Acadm, Acadvl, Asah1, Etfb, Gba, Gla, Gm2a, Hadha, Hexa, Smpd1	Hsd17b4
		Oxidación de lípidos	5.0x10 ⁻²	Acadm, Acadvl, Etfb, Hadha, Mlycd	Hsd17b4
		Catabolismo de α-aminoácidos	1.8x10 ⁻²	Aldh4a1, Bcat2, Dct, Glis, Glud1, Got2	Got1, Phgdh
		Catabolismo de aminoácidos	3.8x10 ⁻³	Aldh4a1, Bcat2, Glis, Got2, Pcyox1	Got1
		Catabolismo de ácidos carboxílicos	1.2x10 ⁻⁵	Abhd16a, Acadm, Acadvl, Aldh4a1, Bcat2, Etfb, Glis, Got2, Gusb, Hadha, Pcyox1	Got1, Hsd17b4
		Catabolismo de lípidos de membrana	1.8x10 ⁻³	Asah1, Gba, Gla, Gm2a, Hexa, Smpd1	
		Catabolismo de ceramidas	5.0x10 ⁻²	Agk, Asah1, Gba, Gla, Gm2a, Hexa, Smpd1	
		Catabolismo de esfingolípidos	7.4x10 ⁻⁴	Asah1, Gba, Gla, Gm2a, Hexa, Smpd1	
		Catabolismo de ácidos grasos	2.6x10 ⁻²	Abhd16a, Acadm, Acadvl, Etfb, Hadha	Hsd17b4
		Catabolismo de ácidos monocarboxílicos	1.2x10 ⁻²	Abhd16a, Acadm, Acadvl, Aldh4a1, Etfb, Hadha	Hsd17b4
		Catabolismo de ceramidas	3.4x10 ⁻³	Asah1, Gba, Gla, Gm2a, Hexa	
Fusión mitocondrial	4.5x10 ⁻⁴	Fusión mitocondrial	1.6x10 ⁻³	Afg3l2, Bak1, Mfn1, Mfn2, Miga2	
Catabolismo de carbohidratos	5.1x10 ⁻⁴	Catabolismo de carbohidratos	3.9x10 ⁻³	Gaa, Gm2a, Gusb	Eno1b, Galk1, Gpi1, Ldha, Pkg1, Pkm
		Catabolismo de piruvato	4.7x10 ⁻²	Pdha1	Eno1b, Galk1, Gpi1, Ldha, Pkg1, Pkm
		Metabolismo de nucleósidos de purina difosfato	2.3x10 ⁻²		Eno1b, Galk1, Gpi1, Pkg1, Pkm
		Metabolismo de ribonucleósidos difosfato	2.3x10 ⁻²		Eno1b, Galk1, Gpi1, Pkg1, Pkm
		Metabolismo de ribonucleósidos de purina difosfato	2.3x10 ⁻²		Eno1b, Galk1, Gpi1, Pkg1, Pkm
Cadena de transporte de electrones	1.3x10 ⁻³	Cadena de transporte de electrones	1.6x10 ⁻⁴	Coq9, Dld, Ndufa10, Ndufa5, Phb2, Slc25a12, Slc25a13, Sod2	Snca
		Respiración celulares	6.9x10 ⁻³	Coq9, Dld, Ndufa10, Ndufa5, Slc25a12, Slc25a13, Sod2	Cat, Snca
		Cadena respiratoria	1.2x10 ⁻⁴	Coq9, Dld, Ndufa10, Ndufa5, Slc25a12, Slc25a13, Sod2	Snca

Vía de señalización intracelular del receptor de la hormona esteroidea	1.4x10 ⁻³	Señalización por la hormona esteroidea	1.2x10 ⁻²	Ckap4, Phb2	Fkbp4, Pebp1, Ptges3, Rhoa, Tcp1
		Respuesta a esteroides	1.1x10 ⁻²	Ckap4, Phb2	Anxa1, Atp1a2, Fkbp4, Pebp1, Ptges3, Rhoa, Tcp1
		Señalización del receptor de la hormona esteroidea	7.3x10 ⁻³	Ckap4, Phb2	[Fkbp4, Pebp1, Ptges3, Rhoa, Tcp1]
		Morfogénesis	4.6x10 ⁻²	Ckap4	Ctnnb1, Gnas, Oxsr1, Pebp1, Tcp1
Organización de las uniones célula-célula	5.7x10 ⁻³	Organización de las uniones célula-célula	2.2x10 ⁻²		Actn4, Afdn, Cdc42, Ctnna1, Ctnnb1, Flna, Rac1, Rhoa, Rhoc, Wdr1
		Uniones apicales	1.2x10 ⁻²		Actn4, Ctnna1, Rhoa, Rhoc, Wdr1
Actividad oxidorreductasa	6.8x10 ⁻³	Actividad oxidorreductasa (dadores aldehído grupos oxo)	2.3x10 ⁻²	Aldh1a1, Aldh1a2, Aldh4a1, Ogdh, Pdha1	
		Actividad oxidorreductasa (dadores aldehído grupos oxo) aceptor NAD o NADP	1.4x10 ⁻²	Aldh1a1, Aldh1a2, Aldh4a1, Ogdh, Pdha1	
Transporte transmembrana de protones	8.5x10 ⁻³	Transporte transmembrana de protones	4.6x10 ⁻²	Atp5a1, Atp6v1c1, Atp6v1e1, Letm1, Phb2, Ppif	
Transporte mitocondrial transmembrana	9.2x10 ⁻³	Transporte mitocondrial	3.9x10 ⁻²	Aifm1, Letm1, Ppif, Slc25a12, Slc25a13, Slc25a32	Hk2
		Transporte mitocondrial transmembrana	4.4x10 ⁻³	Aifm1, Letm1, Slc25a12, Slc25a13, Slc25a32	
Transporte de toxinas	1.0x10 ⁻²	Transporte de toxinas	1.5x10 ⁻³		Atp6v0a1, Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Tcp1
		Reconocimiento espermatozoide-óvulo	2.1x10 ⁻²		Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Tcp1
		Unión del espermatozoide a la zona pelúcida	1.2x10 ⁻²		Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Tcp1
Ensamblaje de miofibrillas	2.2x10 ⁻²	Ensamblaje de miofibrillas	4.3x10 ⁻²		Actg1, Cfil2, Cotl1, Itgb1, Wdr1

Tabla 8. Análisis diferencial de enriquecimiento de Componentes Celulares. Enriquecimiento de los Componentes celulares de la base de datos de *GeneOntology* con las proteínas totales identificadas únicas y las proteínas aumentadas de cada condición. Las tablas muestran los genes de las proteínas identificadas en células Control y tratadas con TMZ, pertenecientes a cada término y grupo.

Grupo	p-valor (Grupo)	Término	p-valor (Término)	Genes TMZ	Genes Control
Mitocondria	2.3x10 ⁻²⁵	Mitocondria	4.3x10 ⁻²⁵	Acadm, Aco2, Acot13, Acot9, Adhfe1, Afg3l2, Aifm1, Ak3, Aldh4a1, Apoo, Atp5a1, Atp5h, Bak1, Bcat2, COX2, Chchd3, Clpp, Cox4i1, Cox5b, Cpox, Cs, Ccys, Dld, Dnaja3, Glrx5, Glud1, Got2, Hadh, Hadhb, Hint2, Hmgcl, Hspa9, Hspd1, Htra2, Immt, Ldhd, Letm1, Lonp1, Marc2, Mavs, Mcl1, Mfn2, Mlycd, Mrpl13, Mrps36, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa4, Ndufa9, Nipsnap1, Ogdh, Pdha1, Pgrmc1, Phb, Phb2, Prodh, Sdha, Sdhb, Sfxn1, Slc25a1, Slc25a12, Slc25a13, Slc25a32, Slc25a5, Sod2, Tmlhe, Tomm70a, Uqcrb, Uqcrls1	Cdk1, Galk1, Mapk1, Mthfd1l, Ppp1ccb
Complejo T que contiene chaperonina	6.9x10 ⁻⁸	Complejo T que contiene chaperonina	1.4x10 ⁻⁷		Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Tcp1
Vacuola lítica	6.6x10 ⁻⁵	Vacuola	1.4x10 ⁻⁴	Aga, Cd63, Ctsb, Cttd, Dld, Gaa, Gba, Gla, Glib1, Gns, Gusb, Hexa, Npc2, Pcyox1, Plbd2, Ppt1, Rab24, Tpp1, Vps33a	Cdc42, Rab7
		Vacuola lítica	2.0x10 ⁻⁴	Aga, Cd63, Ctsb, Cttd, Gaa, Gba, Gla, Glib1, Gns, Gusb, Hexa, Npc2, Pcyox1, Plbd2, Ppt1, Tpp1, Vps33a	Rab7

		Lisosoma	2.0x10 ⁻⁴	Aga, Cd63, Ctsb, Ctsd, Gaa, Gba, Gla, Glib1, Gns, Gusb, Hexa, Npc2, Pcyox1, Plbd2, Ppt1, Tpp1, Vps33a	Rab7
Ribosoma	9.0x10 ⁻⁴	Ribosoma	1.8x10 ⁻³	Mrpl13, Rpl19, Rpl32, Rpl7, Rpl7a, Rpl9	
Citoesqueleto de actina	1.9x10 ⁻³	Filamento de actina	6.6x10 ⁻³		Actn1, Actn4, Daam1, Flna, Flnb, Marcks, Myl9
		Acto-miosina	2.1x10 ⁻²		Actn1, Actn4, Daam1, Flnb, Myl9, Wdr1
		Filamento de actina contractil	3.2x10 ⁻²		Actn1, Actn4, Daam1, Flnb, Myl9
		Fibras de estrés	3.2x10 ⁻²		Actn1, Actn4, Daam1, Flnb, Myl9
Membrana mitocondrial interna	2.1x10 ⁻³	Membrana interna	2.4x10 ⁻³	Afg3l2, Chchd3, Cox4i1, Letm1, Ndufa4, Ndufa9, Phb, Phb2, Sdhb, Slc25a5, Tmem43	
		Envoltura mitocondrial	2.5x10 ⁻³	Afg3l2, Bak1, Chchd3, Cox4i1, Immt, Letm1, Ndufa4, Ndufa9, Pgrmc1, Phb, Phb2, Sdhb, Slc25a5	Ppp1ccb
		Membrana mitocondrial	2.4x10 ⁻³	Afg3l2, Bak1, Chchd3, Cox4i1, Letm1, Ndufa4, Ndufa9, Pgrmc1, Phb, Phb2, Sdhb, Slc25a5	Ppp1ccb
		Membrana mitocondrial interna	1.1x10 ⁻³	Afg3l2, Chchd3, Cox4i1, Letm1, Ndufa4, Ndufa9, Phb, Phb2, Sdhb, Slc25a5	
Ruffle	2.1x10 ⁻³	Ruffle	1.3x10 ⁻²	Atp6v1b2	Actn1, Ctnn, Eps8, Lima1, Rab5a, Rac1, Rdx, Rhoa
Invaginaciones recubiertas de clatrina	3.4x10 ⁻³	Invaginaciones recubiertas de clatrina	9.2x10 ⁻³		Ap2a1, Ap2b1, Ap2m1, Calm1, Cltc, Tfr
		Componente extrínseco de la membrana plasmática	1.2x10 ⁻²	Dnaja3	Anxa2, Ctnnb1, Eno1b, Gnb1, Hist1h2ba, Rac1
Matriz mitocondrial	4.4x10 ⁻³	Matriz mitocondrial	9.8x10 ⁻³	Ak3, Cs, Glud1, Hspa9, Mlycd, Mrpl13	Cdk1

Tabla 9. Análisis diferencial de enriquecimiento de Funciones Moleculares. Enriquecimiento de las Funciones moleculares de la base de datos de *GeneOntology* con las proteínas totales identificadas únicas y las proteínas aumentadas de cada condición. Las tablas muestran los genes de las proteínas identificadas en células Control y tratadas con TMZ, pertenecientes a cada término y grupo.

Grupo	p-valor (Grupo)	Término	p-valor (Término)	Genes TMZ	Genes Control
Unión de nucleótidos de guanilo	2.5x10 ⁻³	Unión de nucleósidos	7.0x10 ⁻³		Arf1, Arhgdia, Arl3, Fkbp4, Gnao1, Hras, Rac1
		Unión de nucleósidos de purina	7.0x10 ⁻³		Arf1, Arhgdia, Arl3, Fkbp4, Gnao1, Hras, Rac1
		Unión de ribonucleósidos	7.0x10 ⁻³		Arf1, Arhgdia, Arl3, Fkbp4, Gnao1, Hras, Rac1
		Unión de ribonucleósidos de purina	7.0x10 ⁻³		Arf1, Arhgdia, Arl3, Fkbp4, Gnao1, Hras, Rac1
		Unión de guanil-nucleósidos	5.0x10 ⁻³		Arf1, Arhgdia, Arl3, Fkbp4, Gnao1, Hras, Rab5a, Rac1
		Unión de guanil-ribonucleósidos	8.7x10 ⁻³		Arf1, Arhgdia, Arl3, Fkbp4, Gnao1, Hras, Rac1
		Unión de GTP	9.4x10 ⁻³		Arf1, Arl3, Fkbp4, Gnao1, Hras, Rac1
Actividad oxidoreductasa	1.0x10 ⁻²	Actividad oxidoreductasa (dadores aldehído grupos oxo)	1.3x10 ⁻²	Aldh1a1, Aldh1a2, Aldh4a1, Ogdh, Pdha1	
		Actividad oxidoreductasa (dadores aldehído grupos oxo) aceptor NAD o NADP	1.0x10 ⁻²	Aldh1a1, Aldh1a2, Aldh4a1, Ogdh, Pdha1	
Actividad hidrolasa de compuestos O-glicosil	1.3x10 ⁻²	Actividad hidrolasa de compuestos glicosil	1.3x10 ⁻²	Gaa, Gba, Gla, Glib1, Gm2a, Gusb, Hexa	
		Actividad hidrolasa de compuestos O-glicosil	1.3x10 ⁻²	Gaa, Gba, Gla, Glib1, Gm2a, Gusb, Hexa	

Actividad transportadora transmembrana de protones	1.4x10 ⁻²	Actividad transportadora transmembrana de protones	1.4x10 ⁻²	Atp5a1, Atp6v1c1, Atp6v1e1, Letm1, Phb2, Ppif	
Unión a filamentos de actina	2.1x10 ⁻²	Unión a filamentos de actina	2.1x10 ⁻²		Actn1, Actn2, Actn4, Cfl2, Ctnna1, Lima1, Marcks

Tabla 10. Análisis diferencial de enriquecimiento de vías con la base de datos de Reactome. Enriquecimiento con la base de datos *Reactome* con las proteínas totales identificadas únicas y las proteínas aumentadas de cada condición. Las tablas muestran los genes de las proteínas identificadas en células Control y tratadas con TMZ, pertenecientes a cada término y grupo.

Grupo	p-valor (Grupo)	Término	p-valor (Término)	Genes TMZ	Genes Control
Ciclo de Krebs y cadena respiratoria	1.2x10 ⁻²¹	Ciclo de Krebs y cadena respiratoria	2.8x10 ⁻²¹	Acad9, Aco2, Adhfe1, Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Cs, Dlat, Dld, Dlst, Etfa, Etfb, Etfdh, Fh1, Idh3g, Mdh2, Ndufa10, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa9, Ndubf11, Ndubf3, Ndubf4, Ndufc2, Ogdh, Pdha1, Pdhx, Sdha, Sdhb, Sucla2, Suclg1, Suclg2	Glo1, Ldha, Ldha, Ldhc, Slc16a1
		Biogénesis mitocondrial	2.8x10 ⁻⁴	Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Glud1, Sod2	
		Cadena respiratoria	9.4x10 ⁻⁸	Acad9, Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Etfa, Etfb, Etfdh, Ndufa10, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa9, Ndubf11, Ndubf3, Ndubf4, Ndufc2	
		Formación de ATP	1.3x10 ⁻³	Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o	
		Biogénesis y mantenimiento mitocondrial	2.5x10 ⁻⁵	Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Glud1, Sod2	Arf4, Arl3, Cct3, Cct4, Cct5, Cct8, Cdk1, Hsp90aa1, Ppp2r1a, Tcpi, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
		Cadena respiratoria	1.3x10 ⁻⁴	Acad9, Etfa, Etfb, Etfdh, Ndufa10, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa9, Ndubf11, Ndubf3, Ndubf4, Ndufc2	
		Biogénesis del complejo I	6.1x10 ⁻³	Acad9, Ndufa10, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa9, Ndubf11, Ndubf3, Ndubf4, Ndufc2	
		Formación de crestas	1.3x10 ⁻³	Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o	
Metabolismo del piruvato y ciclo de Krebs	3.8x10 ⁻²¹	Ciclo de Krebs y cadena respiratoria	2.8x10 ⁻²¹	Acad9, Aco2, Adhfe1, Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Cs, Dlat, Dld, Dlst, Etfa, Etfb, Etfdh, Fh1, Idh3g, Mdh2, Ndufa10, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa9, Ndubf11, Ndubf3, Ndubf4, Ndufc2, Ogdh, Pdha1, Pdhx, Sdha, Sdhb, Sucla2, Suclg1, Suclg2	Glo1, Ldha, Ldhb, Ldhc, Slc16a1
		Cadena respiratoria	9.3x10 ⁻⁸	Acad9, Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Etfa, Etfb, Etfdh, Ndufa10, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa9, Ndubf11, Ndubf3, Ndubf4, Ndufc2	
		Degradación de glicina	7.2x10 ⁻⁴	Aldh4a1, Dbt, Dlat, Dld, Dlst, Got2, Ogdh, Pdha1, Pdhx	

		Señalización por ácido renitoico	4.9×10^{-2}	Aldh1a1, Aldh1a2, Cpt1a, Dlat, Dld, Pdha1, Pdhx	Fabp5
		Cadena respiratoria	1.3×10^{-4}	Acad9, Etfa, Etfb, Etfdh, Ndufa10, Ndufa12, Ndufa13, Ndufa5, Ndufa6, Ndufa9, Ndubf11, Ndubf3, Ndubf4, Ndubf2	
		Metabolismo del piruvato	5.5×10^{-4}	Dlat, Dld, Pdha1, Pdhx	Glo1, Ldha, Ldha, Ldhc, Slc16a1
		Catabolismo de aminoácidos ramificados	7.8×10^{-6}	Acad8, Acadsb, Aldh6a1, Bcat2, Dbt, Dld, Ech1, Hibadh, Ivd	
		Metabolismo de aminoácidos y derivados	1.0×10^{-4}	Acad8, Acadsb, Aldh4a1, Aldh6a1, Bcat2, Dbt, Dct, Dlat, Dld, Dlst, Ech1, Glc, Glud1, Got2, Hibadh, Ivd, Ogdh, Pdha1, Pdhx, Prodh, Pycr2, Rida, Slc25a12, Slc25a13, Tyrp1	Ckb, Got1, Phgdh, Psat1, Slc3a2, Slc7a5, Srm
		Ciclo de Krebs	2.3×10^{-10}	Aco2, Cs, Dld, Dlst, Fh1, Idh3g, Mdh2, Ogdh, Sdha, Sdhb, Suc2a2, Suc1g1, Suc1g2	
		Metabolismo del piruvato y ciclo de Krebs	1.2×10^{-13}	Aco2, Adhfe1, Cs, Dlat, Dld, Dlst, Fh1, Idh3g, Mdh2, Ogdh, Pdha1, Pdhx, Sdha, Sdhb, Suc2a2, Suc1g1, Suc1g2	Glo1, Ldha, Ldhb, Ldhc, Slc16a1
Traducción	2.2×10^{-16}	Silenciamiento traduccional de ceruloplasmina mediado por L13a	2.1×10^{-19}	Eif4b, Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eif4a1, Rps27a
		Proteína cotranslacional dependiente de SRP dirigida a la membrana	1.3×10^{-20}	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Rps27a
		Procesamiento de rRNA en el nucleolo y el citosol	3.2×10^{-11}	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Ncl, Rps27a
		Procesamiento de rRNA	3.2×10^{-11}	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Ncl, Rps27a
		Inicio de la traducción	3.4×10^{-18}	Eif4b, Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eif4a1, Rps27a
		Formación del complejo de inicio de la traducción	8.7×10^{-5}	Eif4b, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eif4a1, Rps27a

		Activación del ARNm, unión del complejo de unión de la tapa, eIF y 43S	1.1×10^{-4}	Eif4b, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eif4a1, Rps27a
		Formación de un grupo de subunidades 40S	5.4×10^{-19}	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Rps27a
		Formación del complejo ternario y el complejo 43S	6.0×10^{-4}	Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Rps27a
		Escaneo ribosómico y reconocimiento de codones de inicio	8.7×10^{-5}	Eif4b, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eif4a1, Rps27a
		Hidrólisis de GTP y unión de la subunidad ribosómica 60S	3.0×10^{-19}	Eif4b, Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eif4a1, Rps27a
		Iniciación de traducción dependiente de Cap	3.4×10^{-18}	Eif4b, Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eif4a1, Rps27a
		Traducción	1.6×10^{-22}	Eef1b2, Eif4b, Mrpl11, Mrpl13, Mrpl15, Mrpl19, Mrpl27, Mrpl32, Mrpl39, Mrpl41, Mrpl50, Mrps25, Mrps28, Mrps36, Ppa2, Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Eef1a1, Eef2, Eif4a1, Etf1, Gfm1, Mrpl4, Rps27a
		Procesamiento de ARNr en el núcleo y el citosol	3.2×10^{-11}	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Ncl, Rps27a
		Degradación sin sentido (NMD)	4.2×10^{-20}	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Etf1, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rps27a
		Degradación sin sentido (NMD) independiente	2.4×10^{-21}	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6,	Etf1, Rps27a

		del complejo de unión a exón		Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	
		Degradación sin sentido (NMD) potenciada por el complejo de unión a exón	4.2x10 ⁻²⁰	Rpl10, Rpl13, Rpl14, Rpl18, Rpl18a, Rpl19, Rpl23a, Rpl24, Rpl27, Rpl28, Rpl3, Rpl31, Rpl32, Rpl35, Rpl35a, Rpl4, Rpl5, Rpl6, Rpl7, Rpl8, Rpl9, Rplp0, Rplp2, Rps11, Rps14, Rps15, Rps15a, Rps2, Rps23, Rps3, Rps4x, Rps7, Rps8, Rps9	Etf1, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rps27a
β-oxidación mitocondrial	7.8x10 ⁻⁸	β-oxidación de ácidos grasos saturados	3.2x10 ⁻⁶	Acadm, Acads, Acadvl, Echs1, Hadh, Hadha, Hadhb	
		β-oxidación mitocondrial	1.2x10 ⁻⁶	Acaa2, Acadm, Acads, Acadvl, Acot13, Acot9, Acsf2, Decr1, Echs1, Hadh, Hadha, Hadhb, Mmut	
		β-oxidación de decanoil-CoA a octanoil-CoA	1.8x10 ⁻⁴	Acadm, Echs1, Hadh, Hadha, Hadhb	
		β-oxidación de octanoil-CoA a hexanoil-CoA	3.6x10 ⁻⁵	Acadm, Echs1, Hadh, Hadha, Hadhb	
		β-oxidación de hexanoil-CoA a butanoil-CoA	3.6x10 ⁻⁵	Acads, Echs1, Hadh, Hadha, Hadhb	
		Metabolismo de ácidos grasos	5.2x10 ⁻⁷	Acaa2, Acadm, Acads, Acadvl, Acot13, Acot9, Acsf2, Cbr4, Cpt1a, Cpt2, Decr1, Echs1, Hadh, Hadha, Hadhb, Hpgds, Mlycd, Mmut, Ppt1, Ptgsd, Scp2, Slc25a1, Slc25a20, Tscr	Acaa1a, Acsi3, Fads2, Hsd17b4, Ptgs3
Vía de reciclaje de L1	2.4x10 ⁻⁷	Tráfico y regulación de uniones Gap	7.5x10 ⁻⁵		Actg1, Ap2m1, Cltc, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Biogénesis mitocondrial	2.8x10 ⁻⁴	Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Glud1, Sod2	
		Biogénesis y mantenimiento de organelos	2.5x10 ⁻⁵	Atp5a1, Atp5d, Atp5e, Atp5f1, Atp5h, Atp5k, Atp5o, Glud1, Sod2	Arf4, Arl3, Cct3, Cct4, Cct5, Cct8, Cdk1, Hsp90aa1, Ppp2r1a, Tcp1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
		Tráfico de uniones Gap	4.4x10 ⁻⁵		Actg1, Ap2m1, Cltc, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Tráfico de conexinas dependiente de microtúbulos desde el Golgi a la membrana plasmática	2.1x10 ⁻⁶		Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Ensamblaje de uniones Gap	1.6x10 ⁻³		Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Tráfico de conexinas la membrana plasmática	4.1x10 ⁻⁶		Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Señalización por Rho GTPasas	1.1x10 ⁻⁴		Actg1, Arhgdia, Arhgdib, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Cttna1, Cttnb1, Cyfip1, Cyfip2, Daam1, Fina, Gdi2, Gna13, H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Iqgap1, Mapk1, Myl9, Pfn1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoa,

				Rhoc, Rhog, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
	RHO GTPasas efectoras	4.4x10 ⁻⁷		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Ctnna1, Ctnnb1, Cyfip1, Cyfip2, Daam1, Flna, H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Iqgap1, Mapk1, Myl9, Pfn1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoa, Rhoc, Rhog, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
	Presentación de antígenos MHC de clase II	7.1x10 ⁻⁴	Canx, Ctsb, Ctsd	Ap1b1, Ap2a1, Ap2m1, Arf1, Capza2, Cltc, Rab7, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
	Regulación de la actividad de PLK1 en transición G2/M	4.9x10 ⁻²		Cdk1, Hsp90aa1, Ppp1cb, Ppp2r1a, Rps27a, Tuba1a, Tuba4a, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Ywhae, Ywhag
	Rensamblaje de la envoltura nuclear	6.7x10 ⁻⁵	Lmna	Cdk1, Kpn1b, Ppp2ca, Ppp2r1a, Ran, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
	Ciclo de chaperona HSP90 para receptores de hormonas esteroideas (SHR)	1.3x10 ⁻⁵		Capza2, Fkbp4, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Ptges3, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
	Interacciones L1CAM	1.5x10 ⁻⁹		Actg1, Ap2a1, Ap2m1, Cltc, Dpysl2, Ezr, Itgb1, Mapk1, Msn, Rac1, Rdx, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
	Reclutamiento de NuMA a centrosomas mitóticos	2.6x10 ⁻³		Cdk1, Hsp90aa1, Ppp2r1a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
	Axón guía	3.1x10 ⁻⁴		Actg1, Ap2a1, Ap2m1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cltc, Dpysl2, Ezr, Hras, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Itgb1, Kras, Mapk1, Msn, Pfn1, Rac1, Rdx, Rhoa, Rhoc, Rps27a, Tln1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
	Vía de reciclaje de L1	5.3x10 ⁻¹³		Actg1, Ap2a1, Ap2m1, Cltc, Dpysl2, Ezr, Mapk1, Msn, Rdx, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
	Fase G2-G2/M	3.9x10 ⁻²		Cdk1, Cdk2, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rps27a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
	Ensamblaje de cilias	2.3x10 ⁻²		Arf4, Arl3, Cct3, Cct4, Cct5, Cct8, Cdk1, Hsp90aa1, Ppp2r1a, Tcp1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
	IQGAPs activadas por RHO GTPasas	1.6x10 ⁻¹¹		Actg1, Calm1, Cdc42, Ctnna1, Ctnnb1, Iqgap1, Rac1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6

		Forminas activadas por RHO GTPasas	7.8×10^{-3}		Actg1, Cdc42, Daam1, Pfn1, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoa, Rhoc, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Transporte anterógrado mediado por COPI	3.9×10^{-2}		Arf1, Arf4, Arf5, Capza2, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Tráfico Golgi-RE retrógrado dependiente de COPI	1.3×10^{-2}	Sec22b, Surf4	Arf1, Arf4, Arf5, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Tráfico Golgi-RE retrógrado independiente de COPI	5.3×10^{-5}	Rab6a, Rab6b	Capza2, Rab18, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Transición G2/M	3.9×10^{-2}		Cdk1, Cdk2, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rps27a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
		Rol de GTSE1 en la progresión G2/M	6.7×10^{-3}		Cdk1, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Rps27a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Tráfico retrógrado Golgi-RE	4.0×10^{-3}	Rab6a, Rab6b, Sec22b, Surf4	Arf1, Arf4, Arf5, Capza2, Rab18, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Modificaciones postraduccionales carboxiterminales de tubulina	4.0×10^{-3}		Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Agregación autofágica	7.1×10^{-4}		Rps27a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Autofagia selectiva	2.8×10^{-4}	Mfn1, Mfn2, Tomm7, Tomm70a	Rps27a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Sellado de la envoltura nuclear por ESCRT-III	4.0×10^{-4}		Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Desarrollo del sistema nervioso	3.2×10^{-4}		Actg1, Ap2a1, Ap2m1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cltc, Dpysl2, Ezr, Hras, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Itgb1, Kras, Mapk1, Msn, Pfn1, Rac1, Rdx, Rhoa, Rhoc, Rps27a, Tln1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Kinesinas	4.9×10^{-2}		Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Factores involucrados en el desarrollo de megacariocitos y la producción de plaquetas	8.1×10^{-3}	Ak3, Ehd3, Mfn1, Mfn2	Capza2, Cdc42, Rab5a, Rac1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
Asociación de TriC/CCT con proteínas blanco durante la biosíntesis	2.8×10^{-7}	Plegamiento de proteínas mediado por chaperonina	5.8×10^{-5}		Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Gnai2, Gnai3, Gnao1, Gnb1, Gnb4, Tcp1
		Asociación de TriC/CCT con proteínas blanco	9.9×10^{-6}		Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Tcp1

		durante la biosíntesis			
		Plegamiento de proteínas	5.8x10 ⁻⁵		Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Gnai2, Gnai3, Gnao1, Gnb1, Gnb4, Tcp1
		Amplificación de señales	4.4x10 ⁻²		Gna11, Gna13, Gnai2, Gnai3, Gnaq, Gnb1, Gnb4
		Regulación de la secreción de insulina	3.8x10 ⁻²		Acs13, Gna11, Gnai2, Gnaq, Gnas, Gnb1, Gnb4, Marcks, Rap1a, Slc2a1
		Cooperación de PDCL y TRiC/CCT en el plegamiento proteína G	5.4x10 ⁻⁵		Cct3, Cct4, Cct5, Cct6a, Cct7, Cct8, Gnai2, Gnai3, Gnao1, Gnb1, Gnb4, Tcp1
RHO GTPasas efectoras	9.6x10 ⁻⁷	Activación de BAD y translocación a la mitocondria	1.3x10 ⁻²		Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
		Señalización por Rho GTPasas	1.1x10 ⁻⁴		Actg1, Arhgdia, Arhgdib, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Cttna1, Cttnb1, Cyfip1, Cyfip2, Daam1, Flna, Gdi2, Gna13, H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Iqgap1, Mapk1, Myl9, Pfn1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoa, Rhoc, Rhog, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
		RHO GTPasas efectoras	4.4x10 ⁻⁷		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Cttna1, Cttnb1, Cyfip1, Cyfip2, Daam1, Flna, H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Iqgap1, Mapk1, Myl9, Pfn1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoa, Rhoc, Rhog, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
		PKNs activadas por RHO GTPasas	2.6x10 ⁻³		H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Ppp1cb, Rac1, Rhoa, Rhoc, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
		Genes metabólicos regulados por p53	1.4x10 ⁻³	Gls, Prdx5	Gpi1, Prdx1, Prdx2, Txn1, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
		Inactivación de ciclina B mediada por Chk1/Chk2	9.8x10 ⁻⁴		Cdk1, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
Activación y agregación plaquetaria	6.5x10 ⁻⁶	Activación y agregación plaquetaria	5.1x10 ⁻⁵	Abhd12, Cd63, Cyb5r1, Lgals3bp, Sccpdh, Tmx3	Actg1, Actn1, Actn2, Actn4, Calm1, Cdc42, Csk, Flna, Gna11, Gna13, Gnai2, Gnai3, Gnaq, Gnb1, Gnb4, Mapk1, Rac1, Rap1a, Rap1b, Rhoa, Rhog, Tagln2, Tln1, Tuba4a, Wdr1, Ywhaz
Activación de MAPK2 y MAPK	2.7x10 ⁻⁵	Señalización por NTRKs	1.8x10 ⁻²		Ap2a1, Ap2m1, Cltc, Hras, Kras, Mapk1, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rap1a, Rhoa, Ywhab
		Señalización por NTRK1 (TRKA)	1.4x10 ⁻²		Ap2a1, Ap2m1, Cltc, Hras, Kras, Mapk1, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rap1a, Rhoa, Ywhab
		Activación de RAF	3.4x10 ⁻²	Phb	Calm1, Hras, Kras, Ppp2ca, Ppp2r1a, Ywhab

		Activación de MAPK2 y MAPK	2.3x10 ⁻⁴		Actg1, Csk, Hras, Iqgap1, Kras, Mapk1, Pebp1, Rap1a, Rap1b, Tln1, Ywhab
		Regulación negativa de la vía MAPK	3.0x10 ⁻²		Hras, Kras, Mapk1, Pebp1, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rps27a, Ywhab
Gluconeogénesis	2.7x10 ⁻⁵	Gluconeogénesis	4.4x10 ⁻⁸	G6pc3, Got2, Mdh2, Slc25a1, Slc25a11, Slc25a12, Slc25a13	Eno1b, Eno3, Got1, Gpi1, Pgam1, Pgi1, Tpi1
		Metabolismo de glucosa	2.0x10 ⁻⁴	G6pc3, Got2, Mdh2, Slc25a1, Slc25a11, Slc25a12, Slc25a13	Eno1b, Eno3, Got1, Gpi1, Hk2, Pgam1, Pgi1, Pkm, Tpi1
Activación de HSF1	1.5x10 ⁻⁴	Activación de HSF1	1.3x10 ⁻³		Eef1a1, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Ptges3, Ywhae
Detoxificación de ROS	1.6x10 ⁻⁴	Detoxificación de ROS	1.3x10 ⁻³	Gpx8, P4hb, Prdx5, Sod2	Cat, Ero1l, Prdx1, Prdx2, Txn1
Elongación de la traducción mitocondrial	7.5x10 ⁻⁴	Traducción mitocondrial	7.3x10 ⁻³	Mrpl11, Mrpl13, Mrpl15, Mrpl19, Mrpl27, Mrpl32, Mrpl39, Mrpl41, Mrpl50, Mrps25, Mrps28, Mrps36	Gfm1, Mrpl4
		Elongación de la traducción mitocondrial	5.1x10 ⁻³	Mrpl11, Mrpl13, Mrpl15, Mrpl19, Mrpl27, Mrpl32, Mrpl39, Mrpl41, Mrpl50, Mrps25, Mrps28, Mrps36	Gfm1, Mrpl4
		Terminación de la traducción mitocondrial	2.1x10 ⁻²	Mrpl11, Mrpl13, Mrpl15, Mrpl19, Mrpl27, Mrpl32, Mrpl39, Mrpl41, Mrpl50, Mrps25, Mrps28, Mrps36	Mrpl4
IQGAPs activada por RHO GTPasas	7.7x10 ⁻⁴	Señalización por Rho GTPasas	1.1x10 ⁻⁴		Actg1, Arhgdia, Arhgdib, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Ctnna1, Ctnnb1, Cyfip1, Cyfip2, Daam1, Flna, Gdi2, Gna13, H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Iqgap1, Mapk1, Myl9, Pfn1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoa, Rhoc, Rhog, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywha
		RHO GTPasas efectoras	4.4x10 ⁻⁷		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Ctnna1, Ctnnb1, Cyfip1, Cyfip2, Daam1, Flna, H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Iqgap1, Mapk1, Myl9, Pfn1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoa, Rhoc, Rhog, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
		Axón guía	3.1x10 ⁻⁴		[Actg1, Ap2a1, Ap2m1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cltc, Dpysl2, Ezr, Hras, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Itgb1, Kras, Mapk1, Msn, Pfn1, Rac1, Rdx, Rhoa, Rhoc, Rps27a, Tln1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Fase G2-G2/M	4.0x10 ⁻²		Cdk1, Cdk2, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rps27a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
		PKNs activadas por RHO GTPasas	2.6x10 ⁻³		H2afz, Hist1h2ba, Hist1h2bc, Hist1h4m, Hist2h2ac, Hist2h2be, Ppp1cb, Rac1, Rhoa, Rhoc, Ywhab, Ywhae, Ywhag, Ywhah, Ywhaz
		IQGAPs activada por RHO GTPasas	1.6x10 ⁻¹¹		Actg1, Calm1, Cdc42, Ctnna1, Ctnnb1, Iqgap1, Rac1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6

		Forminas activadas por RHO GTPasas	7.8×10^{-3}		Actg1, Cdc42, Daam1, Pfn1, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rac1, Rhoc, Rhoc, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
		Transición G2/M	3.8×10^{-2}		Cdk1, Cdk2, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Ppp1cb, Ppp2ca, Ppp2r1a, Rps27a, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb5, Tubb6, Ywhae, Ywhag
		Desarrollo del sistema nervioso	3.2×10^{-4}		Actg1, Ap2a1, Ap2m1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cltc, Dpysl2, Ezr, Hras, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Itgb1, Kras, Mapk1, Msn, Pfn1, Rac1, Rdx, Rhoc, Rhoc, Rps27a, Tln1, Tuba1a, Tuba1c, Tuba4a, Tubb1, Tubb2a, Tubb3, Tubb4a, Tubb4b, Tubb6
PAKs activadas por RHO GTPasas	1.1×10^{-3}	PAKs activadas por RHO GTPasas	1.3×10^{-2}		Calm1, Cdc42, Flna, Myl9, Ppp1cb, Rac1
WASPs y WAVEs activadas por RHO GTPasas	1.4×10^{-3}	Enfermedades	2.8×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Hsp90ab1, Mapk1, Rac1, Sugt1, Txn1
		Dinámica de actina para la formación de copa fagocítica	3.1×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Hsp90aa1, Hsp90ab1, Mapk1, Rac1
		Enfermedades infecciosas	2.8×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Hsp90ab1, Mapk1, Rac1, Sugt1, Txn1
		WASPs y WAVEs activadas por RHO GTPasas	1.5×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Mapk1, Rac1
		Infección por Leishmania	2.8×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Calm1, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Hsp90ab1, Mapk1, Rac1, Sugt1, Txn1
		Infección parasitaria	1.8×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Mapk1, Rac1
		Fagocitosis de Leishmania	1.8×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Mapk1, Rac1
		Fagocitosis mediada por FCGR3A	1.8×10^{-2}		Actg1, Arpc1b, Arpc4, Cdc42, Cyfip1, Cyfip2, Mapk1, Rac1
Procesamiento de SMDT1	1.9×10^{-3}	Procesamiento de SMDT1	4.3×10^{-2}	Afg3l2, Phb, Phb2, Pmpca, Pmpcb	
Interacciones de basigina	2.5×10^{-3}	Interacciones de basigina	4.0×10^{-2}		Atp1b3, Itgb1, Ppia, Slc16a1, Slc3a2, Slc7a5
Prenilación de RAB	2.8×10^{-3}	Prenilación de RAB	3.1×10^{-2}	Rab13, Rab24, Rab3d, Rab6a, Rab6b, Rab8b	Rab18, Rab5a, Rab5c, Rab7
Endocitosis y reciclaje de transferrina	3.2×10^{-3}	Endocitosis y reciclaje de transferrina	3.9×10^{-2}	Atp6v1a, Atp6v1b2, Atp6v1c1, Atp6v1e1, Atp6v1h	Atp6v0a1, Tfrc