

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
CENTRO DE BIOLOGÍA INTEGRATIVA, UNIVERSIDAD MAYOR**



**Rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1
como mecanismo de supervivencia en etapas
tempranas de senescencia celular inducida
por terapia (TIS)**

Profesor Patrocinante:

Dr. Mario Chiong L.
Depto. Bioquímica y Biología
Molecular,
Laboratorio de Metabolismo y
Remodelado Vascular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas,
Universidad de Chile.

Directores de Tesis:

Dr. J. César Cárdenas M.
Dr. Ulises Ahumada C.
Centro de Biología Integrativa,
Laboratorio de Bioenergética y
Metabolismo Celular,
Facultad de Ciencias,
Universidad Mayor.

Memoria para optar al título de Bioquímico

ANDREA CAROLINA PUEBLA HUERTA

Santiago, 2023

*Esta memoria fue financiada por el Proyecto Fondecyt #1200255, FONDAP #15150012,
Postdoctoral Fondecyt #3220593 y Fondecyt #1220110.*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi familia por todo el apoyo desde que decidí estudiar la carrera de bioquímica, en el transcurso de esta y durante el desarrollo de esta Tesis. Especialmente gracias a mis padres, Carolina y Luis, quienes siempre me han dado grandes enseñanzas y lo mejor de sí mismos. A mis hermanitos, el Luchín y el Rorro, que los amo un montón y espero que siempre sigan sus sueños. Valeria, una hermanita más y la mejor bióloga ambiental que conozco. Gaby, mi prima, y mi mejor consejera y confidente. A mi tío "Taty", quien no se encuentra en este plano, siempre confió en mis capacidades y me dio todo su apoyo y fuerza para iniciar mi etapa universitaria. A mi abuelita "Mamitita" por siempre estar para regalarme en toda mi época de escolar y universitaria. A mi pololo Sebastián, porque todo su apoyo ha sido fundamental en mi etapa de Tesis, gracias por tu amor y por crecer conmigo. Y finalmente a mis gatitas, Mochi y Haru, las mejores roomies que podría tener.

A todo mi CMBL, puros viejitos que se ganaron un espacio en mi corazón, especialmente mi tutor, Ulises, que realmente puedo decir que me saqué la lotería de los tutores. Gracias por cada enseñanza y cada reto que me llevó al aprendizaje, gracias por forjarme como científica y por sacar lo mejor de mí. Es algo que llevaré siempre conmigo. No olvidar a los emblemáticos: Edu, un grande de los memes y buenos consejos. Galdo y sus mañas. Los chiquillos: Pablo, Sergio, Osán, Mati, Dani, gracias por siempre acompañarme y esperar a que termine de almorzar, grandes almuerzos compartidos. Gracias infinitas a mi hermanita de Tesis, por todos los chismecitos, almuerzos y buenos momentos, mi Cami, que ahora cumple sus sueños en España. Jorge, que ya no está en el lab pero fue un gran apoyo emocional para mí. Finalmente, a profesor J. César por recibirme en el laboratorio y por darme el apoyo y herramientas necesarias para desarrollarme científicamente.

Agradezco también a mis amigos de la universidad “las malditas víboras” con quienes formamos un grupo bastante particular, lleno de buenos momentos y risas que nunca olvidaré. Gracias por todos los momentos de estudio, carretes, viajesitos, paseos en el centro e idas en metro, risas y chismecitos; Amix, Lore, Wonka, Wilson, Pete, Dani, Melissa y mención honrosa a mi Toto, el mejor lab partner del mundo mundial.

Por último, pero no menos importante, gracias a mis hermanitas de la Tuna de la Universidad de Chile. Un grupo de grandes mujeres que son dignas de admiración, las amo a todas y espero que nuestra hermandad perdure hasta el infinito. Mi época universitaria no habría sido lo mismo sin esta experiencia, gracias por el apoyo incondicional y por ser mi escolita de vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Envejecimiento y senescencia celular	5
1.2 Tipos de senescencia celular	7
1.3 Marcadores de senescencia celular	8
1.4 Regulación del flujo de Ca ²⁺ mitocondrial en senescencia	12
1.5 Flujos de Ca ²⁺ modulados por proteínas antiapoptóticas	14
1.6 Apoptosis y senescencia celular.....	16
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVO GENERAL.....	18
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4.1 Caracterizar la dinámica espacial y temporal de las proteínas Bcl-xL y VDAC1 en etapas tempranas de senescencia celular inducida por doxorubicina en células IMR90.	18
4.2 Evaluar el rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en la captación de Ca ²⁺ mitocondrial en células IMR90 estimuladas con doxorubicina.	18
4.3 Determinar si la interacción de Bcl-xL con VDAC1 es esencial para la viabilidad de células IMR90 en etapas tempranas de senescencia celular inducida por doxorubicina.	18
5. PROPUESTA.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
7. RESULTADOS.....	29
<i>7.1 Objetivo 1. Determinación de la dinámica espacial y temporal de proteínas Bcl-xL en las etapas tempranas de senescencia celular inducida por quimioterapéuticos (TIS).....</i>	<i>29</i>
7.1.1 Caracterización del modelo de senescencia celular inducida por doxorubicina a los 12 días y 24 h post inducción.	29
7.1.2 Determinación de marcadores de senescencia celular inducida por doxorubicina a los 12 días y 24 h post inducción.	31
7.1.3 Caracterización de las proteínas Bcl-xL y VDAC1 en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h).....	34

7.1.4 Determinación de dinámica espacial de Bcl-xL en células IMR90 durante etapas tempranas de TIS (24 h).....	35
<i>7.2 Objetivo 2. Evaluar el rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 y su impacto en la captación de Ca²⁺ mitocondrial en etapas tempranas de TIS (24 h).</i>	38
7.2.1 Caracterización de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en etapas tempranas de TIS (24 h).....	38
7.2.2 Rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en la captación de Ca ²⁺ mitocondrial en etapas tempranas de TIS (24h).....	40
7.2.3 Caracterización de proteínas implicadas en el flujo de Ca ²⁺ en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h).....	43
7.2.4 Prueba de concepto de senolítico ABT-263 como inhibidor de Bcl-xL y posible disruptor de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1.....	45
7.2.5 Docking molecular de interacción entre Bcl-xL con VDAC1 incluyendo ABT-263.....	47
7.2.6 Caracterización de Bcl-xL y VDAC1 en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263.....	48
7.2.7 Determinación de dinámica espacial de Bcl-xL en células IMR90 durante etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263.....	49
7.2.8 Caracterización de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263.....	51
7.2.9 Rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en la captación de Ca ²⁺ mitocondrial en etapas tempranas de TIS incluyendo el inhibidor ABT-263.....	52
7.2.10 Caracterización de proteínas implicadas en el flujo de Ca ²⁺ en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263.....	55
<i>7.3 Objetivo 3. Determinar si la interacción de Bcl-xL con VDAC1 es esencial para la viabilidad de células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h)</i>	57
7.3.1 Caracterización de interferente Bcl-xL.....	57
7.3.2 Determinación de la viabilidad de células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h) y su dependencia con la interacción de Bcl-xL y VDAC1 utilizando el inhibidor ABT-263 ...	58
7.3.3 Determinación de marcador de senescencia celular (SA β-gal) en modelo de 12 días, incluyendo inhibidor ABT-263 e interferente de Bcl-xL.....	63
8. DISCUSIÓN	67
8.1 Respecto al modelo celular	68

8.2	Uso de ABT-263 como disruptor de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1	70
8.3	Sobre el rol de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en la captación de Ca²⁺ mitocondrial	74
8.4	Sobre el rol de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en la supervivencia celular	76
9.	PROYECCIONES.....	80
10.	CONCLUSIONES.....	83
11.	BIBLIOGRAFÍA	84

ABREVIATURAS

A1/Bfl-1: Proteína A1 asociada a Bcl-2

ABT-263: Navitoclax, derivado de ABT-737

ABT-737: Mimético de BH3 de proteínas Bcl-2

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de varianza

APAF: Del inglés *Apoptosis protease-activating factor-1*; en español Factor-1 de apoptosis activador de proteasas

ARG: Arginina

ASN: Asparagina

Bak: Del inglés *Bcl-2 homologous antagonist killer*; en español Antagonista asesina homóloga de Bcl-2

Bax: Del inglés *Bcl-2-associated X protein*; en español Proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2 (Familia): Familia de proteínas asociadas a linfoma de células B-2

Bcl-2 (Proteína): Del inglés *B-cell lymphoma 2*; en español Linfoma de células B-2

Bcl-w: Proteína 2 tipo Bcl-2

Bcl-xL: Del inglés *B-cell lymphoma-extra-large*; en español Proteína asociada a linfoma de células-B extralargo

BH1: Del inglés *Bcl-2 homology domain 1*; en español Dominio 1 de homología a Bcl-2

BH2: Del inglés *Bcl-2 homology domain 2*; en español Dominio 2 de homología a Bcl-2

BH3: Del inglés *Bcl-2 homology domain 3*; en español Dominio 3 de homología a Bcl-2

Bmf: Del inglés *Bcl-2 Modifying Factor*; en español Factor modificante de Bcl-2

BSA: Albúmina de suero de bovino

Ca²⁺: Calcio

CDK: Del inglés *Cyclin-dependent kinase*; en español Quinasa dependiente de ciclina

CEPIA2MT: Mitocepsia

DAMPS: Patrones moleculares asociado a daño

DDR: Del inglés *DNA Damage Response*; en español Respuesta al daño del ADN

DMEM-HG: Medio Dulbecco's Modified Eagle's-Alta glucosa

Doxo: Doxorubicina

FBS: Suero fetal bovino

Fc: Fracción cristalizante de los anticuerpos

FCCP: Carbonilcianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona

GRP75: Del inglés *chaperone glucose-regulated protein 75*; en español Proteína chaperona regulada por glucosa 75

h: Hora

HMGB1: Del inglés *High mobility group box 1 protein*; en español Proteína de alta movilidad del grupo 1

HSP90: Del inglés *Heat shock protein 90*; en español Proteína de shock térmico 90

IP3: Inositol-1,4,5-trifosfato

IP3R: Receptor de inositol-1,4,5-trifosfato

IP3R1: Isoforma 1 del receptor de inositol-1,4,5-trifosfato

IP3R2: Isoforma 2 del receptor de inositol-1,4,5-trifosfato

IP3R3: Isoforma 3 del receptor de inositol-1,4,5-trifosfato

IR: Radiación ionizante

KO: Knockout

LEU: Leucina

LMB1: Del inglés *Lamin B1*; en español Lamina B1

Mcl-1: Proteína de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida

MCU: Del inglés *Mitochondrial calcium uniporter*; en español Unitransportador de Ca²⁺ mitocondrial

MERCS: Del inglés *Mitochondria-Endoplasmic-Reticulum (ER) contact sites*; en español Sitios de contacto entre el Retículo endoplásmico y la mitocondria

mg: Miligramo

MICU1: Del inglés *Mitochondrial Calcium Uptake 1 protein*; en español Proteína captadora de Ca²⁺ mitocondrial 1

mL: Milímetro

MOMP: Del inglés *Mitochondrial outer membrane permeabilization*; en español Permeabilización de la membrana externa mitocondrial

mTOR: Del inglés *Mammalian Target of Rapamycin*; en español Proteína diana de rapamicina en mamíferos

nm: Nanómetro

nM: Nanomolar

Noxa: Proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato

N-terminal: Amino-terminal

PARP1: Del inglés *Poly(ADP-ribose) polymerase-1*; en español Poli(ADP-ribosa) polimerasa-1.

PBS: Amortiguador fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PLA: Del inglés *Proximity Ligation Assay*; en español Ensayo de ligación por proximidad

pmoles: Picomoles

PPI: Interacción proteína-proteína

PROTAC: Del inglés *Proteolysis targeting chimera*; en español Quimera dirigida a proteólisis

PUMA: Del inglés *p53 upregulated modulator of apoptosis*; en español Modulador de apoptosis regulada por incremento de p53

RB: Proteína retinoblastoma

RE: Retículo endoplásmico

ROS: Del inglés *Reactive oxygen species*; en español Especies reactivas de oxígeno

SASP: Del inglés *Senescence-Associated Secretory Phenotype*; en español Fenotipo secretorio asociado a senescencia

SA- β gal: Del inglés *Senescence-associated beta-galactosidase*; en español Beta-galactosidasa asociada a senescencia

SEM: Error estándar medio

SRC: Proteína proto-oncogénica tirosina quinasa codificada por el gen SRC (SRC)

TA: Temperatura ambiente

TBS: Amortiguador tris salino

TBS-T: Amortiguador tris salino + Tween 20

TFAM: Del inglés *Mitochondrial transcription factor A*; en español Factor de transcripción A mitocondrial

TIS: Senescencia inducida por terapia

TMRE: Del inglés *Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester, Perchlorate*; en español Tetrametil rodamina, éster etílico, perclorato

TOMM20: Del inglés *Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20*; en español Translocasa de la membrana externa mitocondrial 20

TYR: Tirosina

VDAC: Del inglés *Voltage Dependent Anion Channel*; en español Canal aniónico dependiente de voltaje

VDAC1: Del inglés *Voltage Dependent Anion Channel 1*; en español Isoforma 1 del canal aniónico dependiente de voltaje

Z-VAD: Compuesto Z-VAD-FMK

γ -H2A.X: Del inglés H2A histone family member X phosphorylated; en español Miembro X de la familia de histonas H2A fosforilada.

μL : Microlitro

μm : Micrómetro

μM : Micromolar

RESUMEN

La senescencia celular se ha descrito como un fenotipo caracterizado por un arresto permanente e irreversible del ciclo celular, además de un fenotipo secretorio asociado a senescencia (SASP). Por otro lado, presenta daño macromolecular y alteraciones metabólicas, que incluyen una acumulación de calcio (Ca^{2+}) mitocondrial. Pese a esto último, una característica relevante del fenotipo es que presenta una resistencia a la apoptosis mediada por la vía intrínseca. Esta resistencia está mediada por proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, como por ejemplo la proteína asociada a linfoma de células-B extralargo (Bcl-xL), la cual aumenta en células senescentes inducidas luego de una exposición a tratamientos anticancerígenos. Este fenómeno se conoce como senescencia celular inducida por terapia (TIS). Por otra parte, se ha caracterizado que la inhibición de Bcl-xL genera senolisis (muerte selectiva de células senescentes), específicamente por fármacos tales como Navitoclax (ABT-263), mimético del dominio BH3. Investigaciones en células cancerígenas muestran que Bcl-xL interactúa con el canal aniónico dependiente de voltaje 1 (VDAC1), evitando una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial al disminuir la captación de Ca^{2+} en la mitocondria mediada por VDAC1, y de esta forma impide la apoptosis. Actualmente se desconoce si este mecanismo de supervivencia ocurre en etapas tempranas de TIS permitiendo el desarrollo del fenotipo senescente. Por lo cual se propuso la siguiente hipótesis: “La interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en etapas tempranas de TIS inducida por doxorubicina en células IMR90 genera una disminución en la captación de Ca^{2+} mitocondrial, permitiendo la supervivencia de las células y el establecimiento del fenotipo senescente”.

Al establecer un tratamiento temprano de 24 h con doxorubicina como inductor de TIS en células IMR90, encontramos que: incrementan los niveles de la proteína Bcl-xL, su colocalización con la mitocondria, así como también su proximidad con VDAC1. Además, se observa una disminución en la captación de Ca^{2+} en la mitocondria proveniente desde el retículo endoplásmico (RE). Al realizar nuevamente el tratamiento temprano de TIS en células IMR90, pero añadiendo en conjunto ABT-263, descrito como inhibidor de las proteínas Bcl-xL, Bcl-w y Bcl-2; ocurre una reversión de los efectos descritos. Destacándose un incremento en la captación de Ca^{2+} en la mitocondria, concomitante con una disminución en la viabilidad celular. Los datos obtenidos fueron un indicio de que ABT-263, al actuar como inhibidor de Bcl-xL, podría interrumpir la interacción entre Bcl-xL y VDAC1. Esto fue probado mediante *docking* molecular de estas proteínas, teniendo en cuenta que la literatura previa indica que la interacción entre las proteínas de interés estaría mediada por el dominio BH4, mientras que ABT-263 es un mimético del dominio BH3. Finalmente, en el modelo propuesto de *docking* se encontró que ABT-263 estaría posicionándose en sitios aledaños caracterizados como clave en la interacción de Bcl-xL y VDAC1, describiéndose que Bcl-xL es capaz de interaccionar con VDAC1 mediante los aminoácidos TYR101, ASN136, ARG139, LEU194 y TYR195.

En resumen, esta investigación nos permitió dilucidar la relevancia en la interacción de Bcl-xL con VDAC1 como mecanismo de supervivencia que se establece en etapas tempranas de TIS en células normales, lo que conlleva al posterior desarrollo del fenotipo senescente inducido por doxorubicina. Además, se logró describir el efecto senolítico de ABT-263, de manera tanto funcional como estructural.

ABSTRACT

Role of the interaction between Bcl-xL and VDAC1 as a survival mechanism in early stage of Therapy-Induced Senescence (TIS).

Cellular senescence has been identified as a phenotype characterized by permanent and irreversible cease to divide, as well as by a secretory senescence-associated pro-inflammatory phenotype (SASP) and resistance to apoptosis. On the other hand, it presents macromolecular damage and metabolic alterations, which include an accumulation of mitochondrial calcium (Ca^{2+}). Despite of the later, a relevant characteristic of this phenotype is it presents apoptosis resistance mediate by intrinsic pathway. This resistance is mediated by antiapoptotic proteins belonging to the Bcl-2 family, like protein B-cell lymphoma-extra-large (Bcl-xL), which increase in senescence cells induced after exposure to anticancer treatments. This phenomenon is known as therapy-induced senescence (TIS). On the other hand, it has been characterized that Bcl-xL inhibition generates senolysis (selective senescent cell death), specifically by drugs such as Navitoclax (ABT-263), mimetic of the BH3 domain. Studies in cancer cells shows that the interaction between Bcl-xL and Voltage Dependent Anion Channel 1 (VDAC1), avoids mitochondrial Ca^{2+} overload by decreasing VDAC1-mediated Ca^{2+} uptake into the mitochondria, and thus prevents apoptosis. Currently, it remains unknown whether this survival mechanism would be shared between cancer cells and early stages of normal TIS cells, which may allow the development of the senescent phenotype. Therefore, the following hypothesis was proposed: "The interaction between Bcl-xL and VDAC1 in early stages of TIS induced by doxorubicin in IMR90 cells generates a decrease in mitochondrial Ca^{2+} uptake, allowing cell survival and the establishment of senescent phenotype."

Establishing an early 24-h treatment with doxorubicin as an inducer of TIS in IMR90 cells, we found that: levels of the Bcl-xL protein, its colocalization with mitochondria, as well as its proximity to VDAC1 increase. In addition, a decrease in the uptake of Ca^{2+} in the mitochondria from the endoplasmic reticulum (ER) is observed. By carrying out the early treatment of TIS again in IMR90 cells, but adding together ABT-263, a mimetic of the BH3 domain described as an inhibitor of the Bcl-xL, Bcl-w and Bcl-2 proteins; a reversal of the effects described occurs. Standing out an increase in the uptake of Ca^{2+} in the mitochondria, concomitant with a decrease in cell viability. The data obtained were indicative that ABT-263, by acting as an inhibitor of Bcl-xL, could disrupt the interaction between Bcl-xL and VDAC1. This was tested by molecular docking of these proteins, considering that previous literature indicates that the interaction between the proteins of interest would be mediated by BH4 domain, whereas ABT-263 is a mimetic of the BH3 domain. Finally, in the proposed docking model it was found that ABT-263 would be positioning itself in neighboring sites characterized as key in the interaction of Bcl-xL and VDAC1, describing that Bcl-xL can interact with VDAC1 through the amino acids TYR101, ASN136, ARG139, LEU194, and TYR195.

In summary, this study aims to elucidate the relevance of the interaction between Bcl-xL and VDAC1 as a survival mechanism that establish in early stage of TIS in normal cells, that leads to development to the senescent phenotype. Also, it was possible to describe the senolytic effect of ABT-263, both functionally and structurally.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Envejecimiento y senescencia celular

El envejecimiento de la población, específicamente el incremento en la proporción de personas de 60 años y más, es un fenómeno que acontece a nivel de países tanto en desarrollo, como en vías de desarrollo. Una de las causas destacadas que podría explicar este incremento es la disminución en la fertilidad total, es decir, la disminución de 5,0 a 2,6 hijos por mujer.¹ Otra de las causas principales que se ha descrito, corresponde a un incremento de 18 años en la expectativa de vida (de 53 a 71 años) entre 1960 y 2015, en el mundo.² Siendo esto último concomitante a una mejor nutrición en la población, un mejor saneamiento ambiental y una mayor higiene, un conocimiento más profundo de las alteraciones de la salud y la rápida difusión de los conocimientos médicos y su aplicación en las prácticas sanitarias.¹ En Chile, el número absoluto de adultos mayores ha aumentado 6,8 veces entre 1950 y 2017, constituyendo el 16,2% de la población,³ estimándose que para el año 2050 supere el 30%.⁴ Por otra parte, el índice de envejecimiento nacional (número de personas sobre 60 años por cada 100 personas menores de 15 años) ha aumentado desde 21,1 en 1991 hasta 60 en el año 2018, estimándose que para 2050 este índice debería ser de 170,² Estos datos muestran que se ha iniciado un proceso de envejecimiento acelerado en la población de nuestro país.

Asociado al proceso de envejecimiento, se ha descrito un deterioro gradual de las condiciones de salud física y mental, lo que aumenta el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas. Por consiguiente, el envejecimiento se ha caracterizado como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de estas enfermedades,⁵ las cuales podrían conducir a la pérdida gradual de la autonomía y limitación funcional de los individuos.⁶ Específicamente, según la Encuesta Nacional de Dependencia (ENADEAM), el

75% de las personas mayores declara tener al menos una enfermedad crónica, dentro de las cuales las de mayor prevalencia son la hipertensión arterial (62,1%), la osteoartritis (43,6%) y la diabetes (21,8%), entre otras alteraciones cognitivas.⁷ Siendo estas enfermedades asociadas al envejecimiento, un foco de estudio relevante en la actualidad.

De acuerdo con los antecedentes expuestos, el envejecimiento corresponde a un fenómeno que va en incremento en nuestro país, generando consecuencias en la calidad de vida de las personas. Por lo tanto, se hace necesario comprender la biología de este proceso, partiendo por su definición. El envejecimiento se define como una serie de procesos intrínsecos, inevitables e irreversibles relacionados a la edad de un ser vivo eucarionte, asociado a pérdida de la viabilidad e incremento en la vulnerabilidad como organismo.⁸ En estos fenómenos relacionados a la edad, existen una serie de cambios fisiológicos y celulares característicos, conocidos como “sellos” del proceso de envejecimiento.⁵ Dentro de estos sellos encontramos a la senescencia celular, la cual se define como un estado de arresto proliferativo estable y generalmente irreversible, que presenta diversos cambios morfológicos, estructurales y funcionales en la célula.⁹ Entre estos cambios encontramos modificaciones en el secretoma, activación de vías supresoras de tumores, como también alteraciones en la cromatina e integridad del genoma.¹⁰ Este fenotipo puede encontrarse en tejidos de mamíferos, y puede observarse en muchos procesos fisiológicos y patológicos, desde el desarrollo embrionario,¹¹ la reparación de tejidos, como también la diabetes y neurodegeneración.¹² Por otra parte, se ha descrito que la acumulación de células senescentes es una de las principales causas de envejecimiento,¹³ además de que su eliminación retardaría el envejecimiento y los desórdenes relacionados al mismo.^{13,14} Esta eliminación puede desarrollarse mediante drogas que alteran la viabilidad de células senescentes de forma específica, llamadas senolíticos.¹⁵ Debido a que gran número de patologías presentan como principal factor de

riesgo el envejecimiento, la senescencia celular está siendo estudiada actualmente como un blanco terapéutico, promoviéndose el desarrollo de drogas senolíticas. Siendo estas últimas, agentes que inducen selectivamente la apoptosis de células senescentes.¹⁶

1.2 Tipos de senescencia celular

La senescencia corresponde a un proceso fisiológico pluridimensional, el cual se caracteriza por presentar un arresto proliferativo irreversible que se desarrolla en respuesta a diversos tipos de estrés asociados a estímulos tanto intrínsecos como extrínsecos.¹⁰ Entre tales estímulos encontramos: exposición a agentes genotóxicos, privación de nutrientes, hipoxia, disfunción mitocondrial y activación de oncogenes.¹⁷ Estos involucran, generalmente, un daño persistente al ADN.¹⁸

A consecuencia de lo anterior, es posible encontrar distintos tipos de senescencia, entre los cuales se pueden destacar:

Senescencia celular replicativa: El primer acercamiento a este fenotipo fue descrito por Hayflick y Moorehead, cuando se evidenció que un cultivo prolongado de fibroblastos diploides sufrió una pérdida de su capacidad proliferativa de manera permanente.¹⁹ Esto corresponde a un fenómeno de enlentecimiento y finalmente cese de las duplicaciones celulares, punto que se conoce como “límite de Hayflick”. Producto de sucesivas duplicaciones, los telómeros se acortan lo que altera el carácter protector de estos segmentos de ADN, desencadenando respuestas al daño del ADN (más conocido como DDR, por sus siglas en inglés).²⁰

Senescencia celular prematura por estrés: Se ha descrito que otros estímulos tales como el estrés oxidativo,²¹ el estrés de retículo²² y el estrés metabólico,²³ pueden inducir senescencia. Estas causas no requieren que la célula tenga un alto número de divisiones para adquirir dicho fenotipo, por lo tanto, es independiente del acortamiento de los telómeros.²⁴

Este tipo de senescencia se ha descrito como un factor fundamental en el desarrollo de enfermedades denominadas de “envejecimiento prematuro” como lo son las metabólicas y las neurodegenerativas.²⁵ Además, podría presentarse como un mecanismo de resistencia a ciertos fármacos.²⁶ En relación con lo último, se ha descrito que ciertos tratamientos anticancerígenos tales como la quimioterapia con doxorubicina,²⁷ como también la radioterapia, pueden desencadenar el desarrollo del fenotipo senescente mediante la respuesta de daño al ADN previamente mencionada.²⁸ Por lo tanto, este tipo de senescencia también se conoce actualmente como senescencia inducida por terapia (o por sus siglas en inglés, TIS).²⁹

Las células senescentes inducidas por quimioterapéuticos pueden favorecer efectos adversos de la quimioterapia y recidiva del tumor.³⁰ Por lo tanto, estudiar TIS inducida por quimioterapéuticos como doxorubicina, en relación con los cambios en la biología de estas células, puede ayudar al desarrollo de potenciales senolíticos.¹⁶ Tal es el caso de ABT-263, una droga senolítica que inhibe proteínas antiapoptóticas que se sobreexpresan en las células senescentes, tales como Bcl-xL y Bcl-2. Al estar dirigida a esta característica particular, ABT-263 desencadena la muerte selectiva de células senescentes.³¹

1.3 Marcadores de senescencia celular

Como se mencionó, existen diversas maneras de inducir el fenotipo senescente. Para poder identificarlo existen diversos marcadores. Sin embargo, éstos son heterogéneos puesto que no presentan una alta especificidad.¹⁰ Debido a esto, los marcadores han sido caracterizados a lo largo del tiempo para comprender la naturaleza de este tipo celular y poder detectarlo de la manera más adecuada posible. A continuación, se describirán los más destacados:

DDR: Diversos estímulos pueden generar en las células un daño en su ADN mediante una ruptura de la doble hebra. Esto desencadena la activación de la DDR, en la cual se

promueve la fosforilación de la histona H2A.X, mencionada comúnmente como γ -H2A.X. Este evento facilita el ensamblaje de complejos reparadores del ADN.³² En contextos en los cuales no se logra resolver el daño, ocurre una acumulación de este, lo cual corresponde a una característica clave en el desarrollo del fenotipo senescente.³³ Por esta razón es que la aparición de γ -H2A.X es considerada un marcador de senescencia.³⁴

Arresto del ciclo celular: La persistencia de DDR induce la fosforilación de p53 en múltiples sitios de serina, lo que genera su activación.³⁵ Una vez activo, p53 induce la transcripción del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina (CDK): p21, el cual inhibe el complejo E1-CDK2. Esto resulta en la inhibición de la fosforilación de la proteína retinoblastoma (RB), mediada por CDK2. Como consecuencia, se genera un arresto del ciclo celular en la transición G1-S,³⁶ como también en la fase G2-M.³⁷ En contexto de un daño persistente al ADN, también puede producirse la activación del inhibidor de CDK4/6: p16, mediante cambios epigenéticos. En este caso, también se induce la detención del ciclo celular asociado a la hipofosforilación de RB.³⁸ Por otro lado, se ha descrito a p21 como un factor clave en el inicio de la senescencia, mientras que p16 permitiría la irreversibilidad del ciclo celular al mantener RB inactiva.³⁹

El arresto del ciclo celular irreversible corresponde a un marcador destacado del fenotipo senescente. Por esta razón, inicialmente el fenómeno se asoció únicamente a células con capacidad proliferativa.⁹ Sin embargo, en la actualidad se han evidenciado fenotipos similares a senescencia en células diferenciadas, como por ejemplo en neuronas.⁴⁰

Fenotipo secretorio asociado a senescencia (SASP): Se ha descrito que en células senescentes se desarrolla un SASP.⁴¹ Este secretoma es variable dependiendo del tipo celular y de la inducción de senescencia, pudiendo ser dinámico a lo largo del tiempo.⁴² Una cualidad destacable del SASP es la preponderancia de moléculas proinflamatorias

incluyendo citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, lípidos bioactivos y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs).⁴³

Núcleo y tamaño celular: Los niveles disminuidos de la proteína LMB1 corresponden a un marcador común en senescencia. Esta disminución compromete la integridad nuclear del fenotipo.⁴⁴ Otro marcador frecuentemente utilizado para caracterizar el fenotipo senescente es la deslocalización y secreción de HMGB1, una alarmina asociada al fenotipo secretor de células senescentes, desde el núcleo.⁴⁵ Por otra parte, las células senescentes presentan particularmente un aumento del tamaño celular, exhibiendo una forma irregular y alargada. Esto puede ser fácilmente evidenciado utilizando microscopía de campo claro.³⁶

Lisosomas: La senescencia se caracteriza por presentar un aumento en las proteínas lisosomales, como también en el contenido lisosomal.⁴⁶ Además, alteraciones en la acidificación lisosomal también han sido descritas, generándose un aumento en el pH.⁴⁷ Este incremento es una condición necesaria para la actividad de la enzima lisosomal beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-βgal).⁴⁸ Esta enzima es detectable a pH 6,0 en cultivos celulares que presentan senescencia replicativa o inducida, mas no en células que proliferan.⁴⁹ Por esta razón actualmente es el marcador más común y uno de los primeros ensayos utilizados para caracterizar senescencia.⁴⁸

Mitocondrias: Se ha descrito que las mitocondrias son fundamentales para el desarrollo del fenotipo senescente.⁵⁰ Junto con lo anterior, las células senescentes muestran un aumento en el número de mitocondrias⁵¹ debido a una mitofagia reducida, lo que produce una acumulación de estas. Como consecuencia, el potencial mitocondrial se ve disminuido, llevando a la liberación de diversas enzimas mitocondriales, como también a un incremento en la producción de ROS.⁵² Asimismo, esto se asocia a una disminución en la fisión mitocondrial, además de un incremento en la fusión.⁵³ En efecto, se ha descrito que un incremento en la fusión mitocondrial correspondería a un mecanismo de protección frente

a la apoptosis en células senescentes.⁵⁰ Para detectar estos cambios, se suele utilizar microscopía electrónica, como también sondas mitocondriales para medir el potencial de membrana.⁵²

Resistencia a la apoptosis en senescencia celular: En la literatura se describe que la apoptosis intrínseca está mediada por un balance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas. Estas últimas, miembros de la familia Bcl-2, estarían mediando la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), como también la liberación del citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol.⁵⁴ Una vez en el citosol, el citocromo c se une a APAF-1, estableciéndose así el apoptosoma. Esto genera la activación en cascada de las caspasas, a través de la caspasa-9.⁵⁵ Las proteínas miembros de la familia Bcl-2 involucradas en este proceso, se caracterizan por presentar una secuencia corta conservada (motivos BH). Entre ellas, serían altamente conservados los dominios BH1, BH2 y BH3.⁵⁶ Estas se clasifican en tres subgrupos: las proteínas antiapoptóticas/pro-supervivencia, incluyendo Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-B, y A1/Bfl-1. Las proteínas pro-apoptóticas con dominios BH3-only, las cuales corresponden a Bim, Bid, Bad, Noxa, PUMA, y Bmf. Además, las proteínas pro-apoptóticas multidominio, Bax y Bak.⁵⁷ Del grupo de proteínas pro-apoptóticas con dominios BH3-only; Bim, Bid y PUMA son activadoras de Bax y Bak en la superficie mitocondrial. Estas últimas son capaces de formar macroporos y causar así la MOMP.⁵⁸ Por otro lado, las proteínas antiapoptóticas pueden unirse y secuestrar a las proteínas activadoras de Bax y Bak descritas previamente. Con respecto a esto, las proteínas pro-apoptóticas Bad, Noxa y Bmf actúan como sensibilizadoras, al unirse e inactivar a las proteínas antiapoptóticas, pudiendo liberar a las proteínas activadoras que han sido secuestradas.⁵⁹ Este balance entre proteínas pro-apoptóticas y antiapoptóticas determina la supervivencia de una célula.⁶⁰

Por otra parte, el grupo de proteínas antiapoptóticas/pro-supervivencia se caracteriza por presentar un dominio BH4 en el N-terminal.⁶¹ Este dominio BH4 les permite a las proteínas como Bcl-2 y Bcl-xL, unirse a otras proteínas que no pertenezcan a la familia Bcl-2.^{62,63} Por lo tanto, estas presentan otros roles alternativos a su regulación anti-apoptótica, tales como: en la proliferación, autofagia, diferenciación, reparación de ADN, progresión tumoral y angiogénesis.⁶⁴

Con respecto a las células senescentes, hay que considerar que además de estar detenidas en el ciclo celular, se vuelven resistentes a la muerte celular mediada por la vía intrínseca.⁵⁹ En ciertos casos, esta resistencia celular autónoma se debe a una mayor expresión de proteínas antiapoptóticas en comparación con proteínas proapoptóticas.³¹ En relación con esto, se ha caracterizado que miembros de la familia Bcl-2, descritas previamente, estarían regulando la apoptosis o la supervivencia celular; dependiendo de su abundancia, localización e interacciones.⁶⁵ Particularmente, las proteínas antiapoptóticas miembros de la familia Bcl-2: Bcl-xL y Bcl-w, incrementan en las células senescentes.⁶⁶ Reportándose en diversos modelos de inducción de senescencia que, tanto Bcl-xL como Bcl-w, incrementan tanto su transcripción, así como también su traducción cap-independiente.⁶⁷ De forma interesante, se ha descubierto que al inhibir estas proteínas se produce senolisis o muerte selectiva de células senescentes, caracterizando de esta manera a la expresión de estas proteínas como clave para la viabilidad de células senescentes.⁶⁸

1.4 Regulación del flujo de Ca²⁺ mitocondrial en senescencia

Como se mencionó anteriormente, existen numerosas alteraciones mitocondriales presentes en senescencia. Además de lo mencionado, una característica destacada debido al carácter regulatorio sobre la fisiología mitocondrial es el Ca²⁺.⁶⁹ El Ca²⁺ regula una serie

de aspectos, tales como la cadena transportadora de electrones, la función de enzimas del ciclo de Krebs, el potencial de membrana y la morfología mitocondrial.⁷⁰⁻⁷³ Además, en células senescentes se ha descrito una acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria.⁷⁴ Sin embargo, actualmente no son claros los mecanismos moleculares por los cuales la mitocondria se sobrecarga de Ca^{2+} , y sobre todo considerando la heterogeneidad del fenotipo. En lo que respecta a esto, se ha descrito que el RE es el principal reservorio de Ca^{2+} dentro de la célula.⁷⁵ Sin embargo, para que el Ca^{2+} pueda entrar a la mitocondria requiere regiones de alta cercanía con el RE. Esto último se describe como un acoplamiento de tipo estructural y funcional, donde la membrana mitocondrial externa está en contacto con la membrana del RE a distancias en un rango de 10 a 50 nm. Estas regiones han sido denominadas MERCS (del inglés *Mitochondria-Endoplasmic-Reticulum (ER) contact sites*).⁷⁶ Particularmente, en estos contactos ocurre una interacción física entre el Receptor de Inositol-1,4,5-Trifosfato (IP3R), GRP75 y VDAC.⁷⁷ Una vez que el Ca^{2+} se libera desde el RE, principalmente por IP3R, es capaz de alcanzar altas concentraciones del orden de 25 μM . Esto último debido al estrecho contacto entre el RE y la mitocondria, generando microdominios de Ca^{2+} .^{76,78} De esta forma, los microdominios permiten la presencia de una alta concentración de Ca^{2+} , necesaria para la apertura del poro unitransportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) en la membrana interna de la mitocondria.⁷⁹ MCU permite el paso del Ca^{2+} a la matriz mitocondrial donde regula todos los fenómenos ya mencionados, formando un complejo con proteínas accesorias asociadas al sensado de Ca^{2+} intermembrana y de la matriz.⁸⁰ La distribución del Ca^{2+} además, se ha descrito como heterogénea en las regiones del lumen del RE; siendo determinante la salida de Ca^{2+} desde el RE y las concentraciones de Ca^{2+} citosólicas para modular estas interacciones RE-mitocondria.⁸¹ Por otra parte, se ha descrito que la regulación de estos flujos de Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria, juega un rol fundamental para la mantención de las células senescentes.

Describiéndose que, al añadir un quelante de Ca^{2+} en células derivadas de endometrio humano, se previene el desarrollo de senescencia prematura.⁸²

De forma interesante, se ha descrito a las MERCS como un factor clave en el desarrollo del fenotipo senescente.⁸³ Específicamente, el grupo de David Bernard expuso que las MERCS dependerían de IP3R, específicamente de IP3R2. De esta forma, al generar un *knockout* (KO) de IP3R2, tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuiría el número de MERCS, concomitante a una disminución en el desarrollo de senescencia celular. Por otro lado, inducir las MERCS aumentaría la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria, desencadenando el desarrollo de senescencia celular en fibroblastos humanos MRC5.⁸⁴

En relación con estos antecedentes, se puede concluir que los flujos de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria, acompañados de las MERCS, juegan un rol en el desarrollo del fenotipo senescente.^{81,84}

1.5 Flujos de Ca^{2+} modulados por proteínas antiapoptóticas

Según lo establecido, una de las características de las células senescentes es que presentan una mayor expresión de proteínas antiapoptóticas, siendo descritas como esenciales para su supervivencia, particularmente Bcl-2, Bcl-w y Bcl-xL.⁶⁶ Lo anterior dio paso al uso de inhibidores de estas proteínas antiapoptóticas, tales como ABT-263, utilizándolos como blancos terapéuticos. ABT-263 presenta alta afinidad por Bcl-xL y por Bcl-2, presentando uniones más débiles a Bcl-w y Mcl-1.⁸⁵ El uso de este compuesto resulta en apoptosis selectiva en varios tipos de células senescentes, sin afectar la viabilidad de células normales, concepto conocido como senolisis.^{31,66,86}

Diversas investigaciones muestran que ciertas proteínas antiapoptóticas estarían regulando los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria. Por ejemplo, se ha descrito que Bcl-xL es capaz de

interactuar con IP3R, generando una inhibición en la salida del flujo de Ca^{2+} y de esta forma contraponiéndose a la apoptosis desencadenada por Ca^{2+} en células cancerígenas.⁸⁷ Este tipo de regulación por inhibición también se le ha atribuido a la proteína Bcl-2, de la cual se describió que puede interactuar con IP3R mediante su dominio BH4.^{88,89} A pesar de lo anterior, siguen siendo controversiales los efectos de la interacción entre proteínas de la familia BCL-2 y las proteínas asociadas al flujo de calcio.^{90,91} Esto resulta relevante debido a que los niveles de Ca^{2+} mitocondrial están estrechamente relacionados con la muerte y la supervivencia celular. De modo que altos niveles de Ca^{2+} mitocondrial inducen MOMP y, en consecuencia, apoptosis.⁹²

Curiosamente, en otros contextos como en células cancerígenas, se ha encontrado que la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-xL estaría regulando el Ca^{2+} mitocondrial. Se estableció que Bcl-xL, mediante su dominio BH4, interactúa directamente con VDAC1, disminuyendo el flujo de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria mediado por VDAC1. Esta interacción sería un mecanismo de supervivencia de células tumorales, al evitar el desarrollo de una apoptosis desencadenada por sobrecarga de Ca^{2+} .⁸⁹

Con respecto al contexto en senescencia celular, se tienen como antecedentes provenientes del proyecto postdoctoral de Ulises Ahumada-Castro, cotutor de esta memoria; que posterior a 24 h de inducción de senescencia con doxorubicina, se observó una disminución en el flujo de Ca^{2+} hacia la mitocondria mediante detección con Mitocepia (CEPIA2MT). Siendo este último un indicador fluorescente verde de Ca^{2+} , codificado genéticamente en la mitocondria (**figura 1**).⁹³ Por otra parte, al inducir la salida de Ca^{2+} lisosomal se sigue observando esta disminución en el flujo de Ca^{2+} mitocondrial.⁹⁴ Relacionado a esto es que se propuso que la proteína Bcl-xL, usualmente descrita como blanco senolítico,⁶⁶ estaría involucrada en la regulación de los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria debido a que ya había sido caracterizada su interacción con VDAC1 como un

mecanismo de supervivencia; siendo esta última, la principal fuente de entrada de Ca^{2+} mitocondrial.⁸⁹

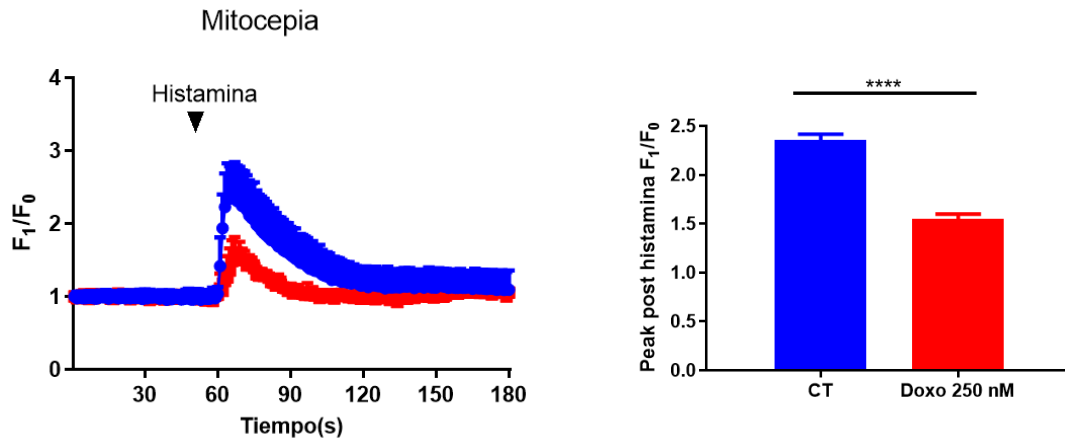


Figura 1. (F_1/F_0) para CEPIA2MT como evaluación de Ca^{2+} mitocondrial estimulado por histamina. Se muestra en azul: control (CT) y en rojo: células inducidas con doxorubicina (Doxo 250 nM) por 24 h. Las células fueron estimuladas con 0,3 mM de histamina, aproximadamente a los 50 segundos. Estadística descriptiva muestra promedio de los peaks cuantificados \pm SEM. N=10 células, con N de 3 por condición. **** $p \leq 0.0001$, utilizando T-test.

1.6 Apoptosis y senescencia celular

Como pudimos identificar, la senescencia celular y la apoptosis estarían estrechamente relacionadas. Se ha descrito que las células, al responder a un daño al ADN, implementan programas adaptativos que a menudo culminan en 2 destinos celulares distintos: apoptosis o senescencia.⁹⁵ Se encontró que la proteína proto-oncogénica tirosina quinasa codificada por el gen *SRC* (SRC) era activada por bajos niveles de agentes de daño al ADN, ya sea por los quimioterapéuticos Etopósido y Doxorubicina, como también por radiación ionizante (IR). Con un daño menor en el ADN, esta proteína activó p38 lo cual promovió la expresión de proteínas asociadas a la supervivencia y a la senescencia celular, como también previno un incremento de proteínas proapoptóticas. Por otra parte, altas concentraciones de quimioterapéutico favorecieron el desarrollo de apoptosis.⁹⁶ Sumado a

esto, recientemente se ha descrito que la inhibición de Bcl-xL en células de melanoma humano, redirigen la respuesta terapéutica desde senescencia a apoptosis.⁹⁷ Por lo tanto, se puede afirmar que, pese a que existe una dicotomía entre apoptosis y senescencia, estos fenómenos se encuentran relacionados tal que podrían ser parte de dos destinos con un punto de inicio en común.

Tomando en cuenta estos antecedentes se puede establecer que, por una parte, existe una expresión característica de proteínas antiapoptóticas en el fenotipo senescente; siendo estas determinantes en la viabilidad celular.⁶⁸ Por otro lado, se ha descrito que varias de estas proteínas cumplen roles en la regulación de Ca^{2+} mitocondrial, otro aspecto que también es relevante para la supervivencia celular.^{84,92}

Existe evidencia de que las proteínas antiapoptóticas, particularmente Bcl-xL,⁶⁶ regulan los flujos de Ca^{2+} de entrada a la mitocondria mediante su interacción con VDAC1. Sin embargo, este estudio ha sido descrito en células tumorales.^{62,63,89} Si existe un mecanismo similar al descrito en células cancerígenas, pero en etapas tempranas de TIS, es aún desconocido. Por lo tanto, se establece la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

“La interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en etapas tempranas de TIS inducida por doxorubicina en células IMR90 genera una disminución en la captación de Ca^{2+} mitocondrial, permitiendo la supervivencia de las células y el establecimiento del fenotipo senescente”.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la interacción de Bcl-xL con VDAC1 reduce la captación de Ca^{+2} mitocondrial en etapas tempranas de senescencia celular inducida por doxorubicina, siendo esencial para la viabilidad de células IMR90.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1** Caracterizar la dinámica espacial y temporal de las proteínas Bcl-xL y VDAC1 en etapas tempranas de senescencia celular inducida por doxorubicina en células IMR90.
- 4.2** Evaluar el rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en la captación de Ca^{2+} mitocondrial en células IMR90 estimuladas con doxorubicina.
- 4.3** Determinar si la interacción de Bcl-xL con VDAC1 es esencial para la viabilidad de células IMR90 en etapas tempranas de senescencia celular inducida por doxorubicina.

5. PROPUESTA

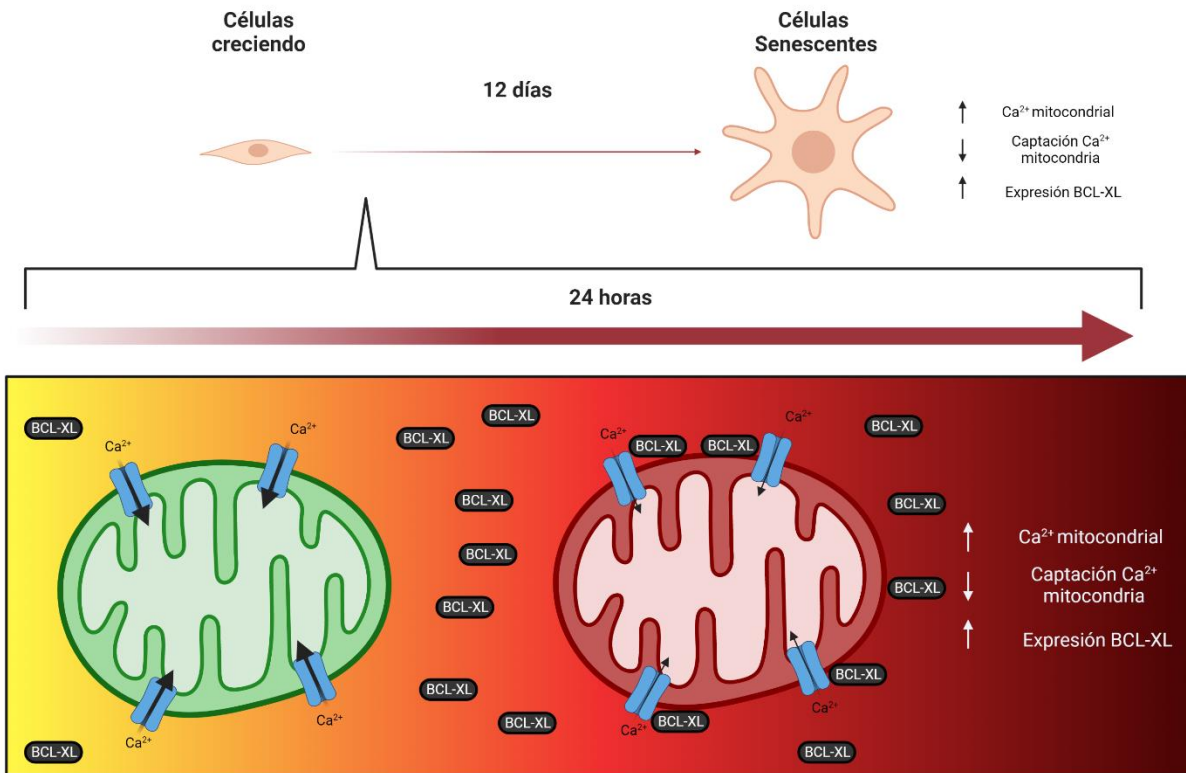


Figura 2. Propuesta de investigación. En un contexto de senescencia temprana (24 h) inducida por terapia (TIS) con doxorrubicina, se propone que la proteína antiapoptótica Bcl-xL incrementa su expresión, su localización mitocondrial y su interacción con el canal VDAC1 . De este modo, disminuirían los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria, mientras que el Ca^{2+} mitocondrial en ese punto se encontraría incrementado.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

En Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EE. UU.) se adquirió yoduro de propidio (P3566), anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con alexa 568 (A-11011), anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con alexa 568 (A-11004), anticuerpos secundarios anti-conejo conjugado con HRP (31460), anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado con HRP (31430), reactivo de Bradford (23200), tetrametil rodamina, éster etílico, perclorato (TMRE) (T669), kit sustrato quimioluminiscente West Pico (34080), solución de fijación PFA 4% (R37814), medio Dulbecco's Modified Eagle's-Alta glucosa (DMEM-HG) (12100-046), DMEM-HG sin glutamina y sin Ca^{2+} (21068028), Hoechst (H3570), medio de montaje ProLong (P36984), X-Gal (B-1690), Fluo-4 AM (F-14201), Rhod-2 AM (R-1245MP), SYTOX™ blue (s11348), siRNA BCL2L1 (4390824), lipofectamine-3000 (L3000-015) y lipofectamine RNAi max (13778-150). En Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EE. UU.) se adquirió BSA (sc-2323), compuesto Z-VAD-FMK (Z-VAD) (sc-3067), anticuerpo anti- β -actina (sc-47778), anticuerpo anti-HSP90 (13119sc) y anticuerpo anti-IP3R2 (7278sc). En Sigma-Aldrich (Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE. UU.) adquirimos histamina dihidrocloruro (H7250-5G), PLA Duolink® (DUO92014-100RXN), carbonilcianuro-4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP) (C2920-10MG), cocktail inhibidor de proteasas (P2714-1BTL), acrilamida:bisacrilamida 29:1 (1690-OP) y cristal violeta (C6158-50g). Anticuerpo Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) (05-636) y amortiguador RIPA fueron adquiridos de Millipore (Burlington, Massachusetts, EE. UU.). Se adquirieron en Winkler (Santiago, RM, Chile) TRIS, glicerol, 2-mercaptoetanol, SDS, azul de bromofenol, glicina, metanol, glutaraldehído, NaCl, KCl y Tween-20. De Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.) se obtuvo el anticuerpo anti-p21 Waf1/Cip1 (12D1) (2947), anticuerpo anti-IP3R1 (8568S), anticuerpo anti-PARP1 (46D11), anticuerpo anti-

P53 (9282S), anticuerpo anti-Bcl-xL (54H6), anticuerpo anti-MCU (D2Z3B), anticuerpo anti-H2A.X (20E3), anticuerpo anti-HMGB1 (3935S) y anticuerpo anti-MICU1 (D4P8Q). Anticuerpo anti-VDAC1 (AB10527), anti-VDAC1 (AB14734), anticuerpo anti-TOMM20 (AB56783) y anticuerpo anti-caspasa-3 clivada (AB32042) fueron adquiridos en Abcam (Cambridge, Reino Unido). Anticuerpo anti-IP3R3 (610313BD) fue adquirido en BD Biosciences (Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.).

Cultivo celular

Se utilizó la línea celular normal de pulmón humano IMR90 (ATCC® CCL186™), la cual fue mantenida a 37°C, 5% de CO₂ y 3% de O₂ en DMEM-HG suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (penicilina 10.000 U/mL y streptomycin 10 µg/mL). En experimentos de senescencia tardía (6 días/12 días), se refrescó el medio de cultivo cada 2 días. Los experimentos de senescencia temprana (24 h) fueron estimulados al día posterior a sembrar las células. Todos los experimentos, tanto controles como las células al iniciar los tratamientos con doxorubicina, fueron realizados usando entre 5.000 y 10.000 células por cm², independiente del tipo de placa utilizada.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y electrotransferencia de proteínas

La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, se cargaron 30 µg de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 5% y el separador al 10%, 15% y 5% de poliacrilamida, de acuerdo con las necesidades experimentales. La electroforesis se realizó en amortiguador de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%) a un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego a 120 V hasta el final de la corrida electroforética. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.) de 0,45 µm previamente

activada con metanol, a amperaje constante de 400 mA por 90 min en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% p/v; metanol 20% v/v).

Western Blot

Posterior a la electrotransferencia, las membranas se incubaron con solución de bloqueo (TBS-T [Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Tween-20 0,1% p/v], BSA 3% p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y posteriormente se incubaron toda la noche, con agitación suave, con el anticuerpo primario correspondiente en la siguiente dilución: anti-p21 (1:1000, conejo), anti- β -actina (1:3000, ratón), anti-p53 (1:1000), anti-Bcl-xL (1:1000, conejo), anti-VDAC1 (1:1000, conejo), anti-IP3R1 (1:1000, conejo), anti-IP3R2 (1:500, cabra), anti-IP3R3 (1:1000, ratón), anti-MCU (1:1000, conejo), anti-MICU1 (1:1000, conejo), anti-PARP1 (1:1000, conejo) y anti-caspasa-3 clivada (1:1000, conejo). Todos en solución de TBS-T 1% p/v BSA. Luego, las membranas se lavaron durante 15 min en TBS-T, y se incubaron durante 1 hora a TA con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, anti-IgG de ratón o anti-IgG de cabra, conjugado con peroxidasa de rabanito, según corresponda, a una dilución de 1:3000, 1:2000, 1:1000 y 1:500, en solución de incubación. Para la detección, las membranas previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL y se digitalizó la señal utilizando el sistema Chemidoc Imager (Biorad, Hercules, CA, EE. UU.). Las imágenes se procesaron y analizaron mediante el software ImageJ (NIH Image).

Inmunofluorescencia Indirecta

Las células se lavaron con PBS, luego se fijaron con PFA 4% por 10 min. A continuación, se realizó la permeabilización con 0.2% tritón X-100 en PBS por 10 minutos a TA. Se bloqueó con PBS-BSA 3% por 60 minutos a TA en una cámara húmeda. La incubación con el anticuerpo primario (1:200) o (1:100) según corresponda, fue realizada en PBS-BSA 1% durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó en BSA 1% p/v (1:500) y se dejó por 120 minutos a TA en cámara húmeda en oscuridad. Se realizaron 3 lavados de PBS durante 5 minutos. Para la tinción del núcleo se agregó Hoescht (1:1000) (Thermo Fisher Scientific) por 5 minutos. Se realizó el montaje usando el medio de montaje ProLong (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Bcl-xL (1:200, conejo), anti-TOMM20 (1:200, ratón), anti-VDAC1 (1:100, conejo), anti- γ -H2A.X (1:200, ratón) y anti-HMGB1 (1:100, conejo). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Alemania). Luego fueron procesadas y analizadas mediante el software ImageJ (NIH Image).

Tinción de SA- β gal

Las células fueron lavadas con PBS y fijadas por 10 minutos con 2% formaldehído–0,2% glutaraldehído. Luego de lavar con PBS, las células fueron incubadas toda la noche a 37°C en incubador sin CO₂ en una solución de tinción que contiene 1 mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-inolil- β -D-galactosido, 40 mM ácido cítrico/amortiguador fosfato (pH 6,0), 5 mM de ferrocianuro de potasio, 5 mM ferricianuro de sodio, 150 mM NaCl, y 2 mM MgCl₂. Luego las células fueron lavadas y se contó 100 células por condición. Se expresó como porcentaje de células positivas para la tinción (células evidentemente azules), del total de células.

Transfecciones de interferente de Bcl-xL

Específicamente para las transfecciones de interferente de Bcl-xL (siRNA BCL2L1), se utilizaron 60 pmoles por cada placa de 60 mm. Además, se utilizó lipofectamine RNAi max de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Los experimentos de esta memoria fueron realizados 48 h post-transfección excepto para el interferente de Bcl-xL, en el cual se realizaron a 24 y 48 h post-transfección.

Ensayo de ligamiento por proximidad (PLA)

Se utilizó el ensayo de ligamiento por proximidad (PLA) Duolink® (Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE. UU.). El ensayo permite evaluar interacciones entre proteínas endógenas que estén a distancias entre 0 y 40 nm. En principio la técnica se basa en la unión de 2 anticuerpos, hechos en distinta especie, que se unen a las proteínas de interés, como se observa en la **figura 3A**. En el caso de la presente investigación, se utilizaron los anticuerpos anti-Bcl-xL (conejo) y anti-VDAC1 (ratón). Luego se utiliza un par de anticuerpos secundarios unidos a oligonucleótidos específicos contra la Fc de los anticuerpos primarios (**figura 3B**). Como se muestra en la **figura 3C**, estos oligonucleótidos solo hibridan si es que los anticuerpos se encuentran a la distancia antes mencionada, esto mediado por una ligasa que forma una estructura de ADN circular necesaria para el siguiente paso de amplificación. Como ya se mencionó, y se muestra en la **figura 3D**, una ADN polimerasa amplifica este ADN circular 1000 veces o más, y por la forma de replicación utilizada (Rolling circle amplification) todas las hebras de ADN quedan unidas generando una señal localizada. Finalmente, oligonucleótidos marcados se unen a sus secuencias complementarias dentro de estas hebras de ADN amplificadas (**figura 3E**), las cuales son visualizadas como puntos discretos (**figura 3F**). Las imágenes se obtuvieron en un

microscopio confocal TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Alemania). Finalmente fueron procesadas y analizadas mediante el software ImageJ (NIH Image).

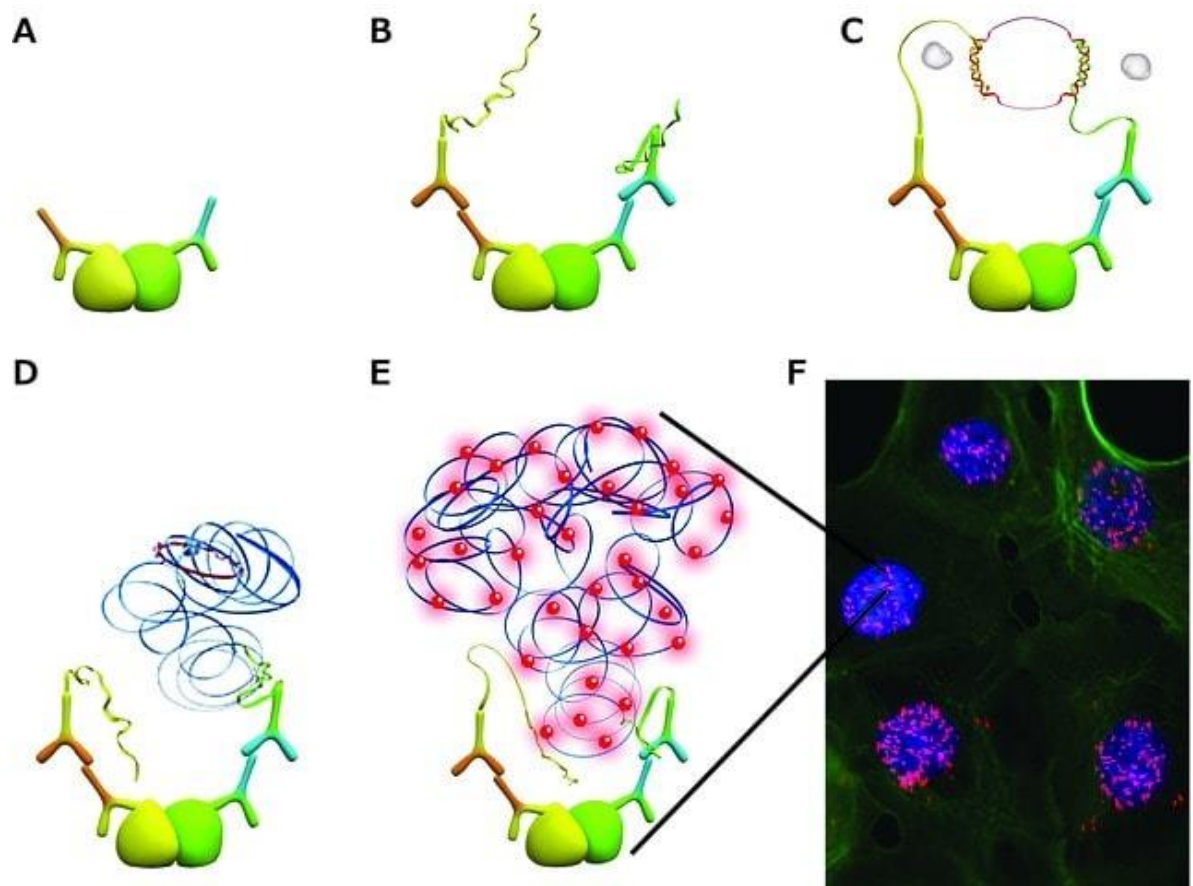


Figura 3. Esquema de PLA Duolink®. Se puede observar los pasos asociados al protocolo **A)** Dos anticuerpos primarios reconocen proteínas específicas de interés dentro de la célula, representadas como globos amarillos y verdes. **B)** Luego, anticuerpos secundarios acoplados a oligonucleótidos (sondas PLA) reconocen los anticuerpos primarios. **C)** Cuando las sondas PLA están en proximidad, los oligonucleótidos se unen y ligan entre ellos. **D)** Estos oligonucleótidos ligados forman un templado de ADN circular el cual es amplificado por la ADN polimerasa. **E)** Oligonucleótidos marcados con fluoróforos se complementan a los amplicones recién amplificados en determinadas regiones. **F)** Las señales de PLA están listas para ser analizadas en un microscopio confocal (Extraído de la página de Sigma-Aldrich).

Determinación de incrementos de Ca^{2+} mitocondrial y citoplasmático

Para medir niveles de Ca^{2+} se utilizó la sonda Fluo-4 AM, tanto para evaluar la salida de Ca^{2+} desde el RE, como también para evaluar la salida de Ca^{2+} mitocondrial mediada por FCCP. Se utilizó Rhod-2 AM para evaluar el ingreso de Ca^{2+} a la mitocondria luego de

la salida desde el RE. Para las 2 sondas se utilizó una solución de la sonda a concentración 5 μM en medio de cultivo suplementado con FBS 10% por 30 minutos a TA. Luego se lavó las células y se restituyó por medio fresco y suplementado. Para los casos de Fluo-4 AM como evaluador de Ca^{2+} que sale del RE y Rhod-2 AM, previo al experimento se cambió el medio de cultivo por DMEM-HG sin Ca^{2+} (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) y sin suplementar. El estímulo para liberar Ca^{2+} desde el RE fue realizado con histamina 0,3 mM (Sigma-Aldrich, Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE. UU.) en DMEM-HG sin Ca^{2+} , aplicado a los 15 o 20 segundos de iniciado el experimento. Además, el estímulo para liberar el Ca^{2+} desde la mitocondria fue realizado con el desacoplante de potencial mitocondrial FCCP 1 μM (Sigma-Aldrich Whitehouse Station, Nueva Jersey, EE. UU.) en DMEM-HG con Ca^{2+} , aplicado a los 15 o 20 segundos de iniciado el experimento. Los experimentos fueron registrados en un microscopio confocal TCS SP8 (Leica, Wetzlar, Alemania) y se registró cada 1 segundo, con un aumento 20X y un pinhole de 1,5.

Ensayo de densidad celular por Cristal violeta

Se sembraron células en placas de 96-well ($5000/\text{cm}^2$), posterior a los estímulos correspondientes, se aplicó a las células una solución de cristal violeta al 0,5% (200 μL por pocillo) y se incubó durante 20 minutos. Posterior a eso se retiró el cristal violeta y las placas fueron lavadas de manera vertical con flujo suave de agua. Se dejó secar las placas durante 24 h. Para cuantificar se añadió metanol (200 μL por pocillo), y se utilizó el equipo Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG, Suiza).

Determinación de viabilidad por SYTOX™ blue mediante citometría de flujo

Se recolectó las células adheridas, por tripsinización, las cuales fueron lavadas con PBS. Se resuspendió en 200 μL de PBS y se agregó SYTOX™ blue 2,5 μM . Luego se mezcló con un pequeño vortex de forma suave. Finalmente, se incubaron las muestras por

15 min a TA. Todas las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo. Para análisis de muerte celular por apoptosis se incubaron previamente las células con el inhibidor de pan-caspasas Z-VAD a 40 μ M.

Medición de potencial de membrana mitocondrial por sonda TMRE mediante citometría de flujo

Se recolectó las células adheridas, por tripsinización, las cuales fueron lavadas con PBS. Se resuspendió en 200 μ L de PBS y se agregó TMRE 5 nM. Luego se mezcló con un pequeño vortex de forma suave. Finalmente, se incubaron las muestras por 15 min a TA. Todas las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo.

Docking molecular de Bcl-xL y VDAC1 añadiendo ABT-263

Se utilizó el software ColabFold,⁹⁸ implementando el algoritmo AlphaFold.⁹⁹ Se analizaron los 5 modelos más representativos de interacción BCL-xL:VDAC1, y se caracterizó que la conformación predicha por el software converge en el modelo de interacción presentado en esta memoria. Las estructuras tridimensionales de los modelos de las proteínas individuales fueron corroboradas por las estructuras cristalográficas 4QNQ y 3EMN para Bcl-xL junto a ABT-263 y VDAC1 respectivamente.

Análisis Estadístico

Todos los valores fueron expresados como promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes o 6 experimentos independientes, en el caso particular de Western blot. En el caso de datos que presentaron distribución normal, los datos fueron analizados utilizando T-Test y ANOVA de una vía con comparaciones respecto a los diversos grupos experimentales con corrección de Sidak, como también, con respecto al control con

corrección de prueba de Dunnet. * $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.
Todos los resultados fueron analizados con el programa estadístico GraphPad Prism 8.0.2.

7. RESULTADOS

7.1 Objetivo 1. Determinación de la dinámica espacial y temporal de proteínas Bcl-xL en las etapas tempranas de senescencia celular inducida por quimioterapéuticos (TIS).

7.1.1 Caracterización del modelo de senescencia celular inducida por doxorubicina a los 12 días y 24 h post inducción.

Para estudiar TIS en el laboratorio se utiliza actualmente un modelo de inducción de senescencia con doxorubicina a una concentración de 250 nM, descrita previamente en la literatura.^{67,100} El estímulo se mantuvo por 48 h y posteriormente las células se dejaron hasta 12 días para su caracterización (**figura 4**). En base a esto, la **figura 5** muestra el plan de trabajo para inducir senescencia a etapas tempranas, en el cual se indujo senescencia con doxorubicina a una concentración de 250 nM, pero esta vez durante 24 h. Siendo este último el modelo utilizado para el desarrollo de esta memoria.

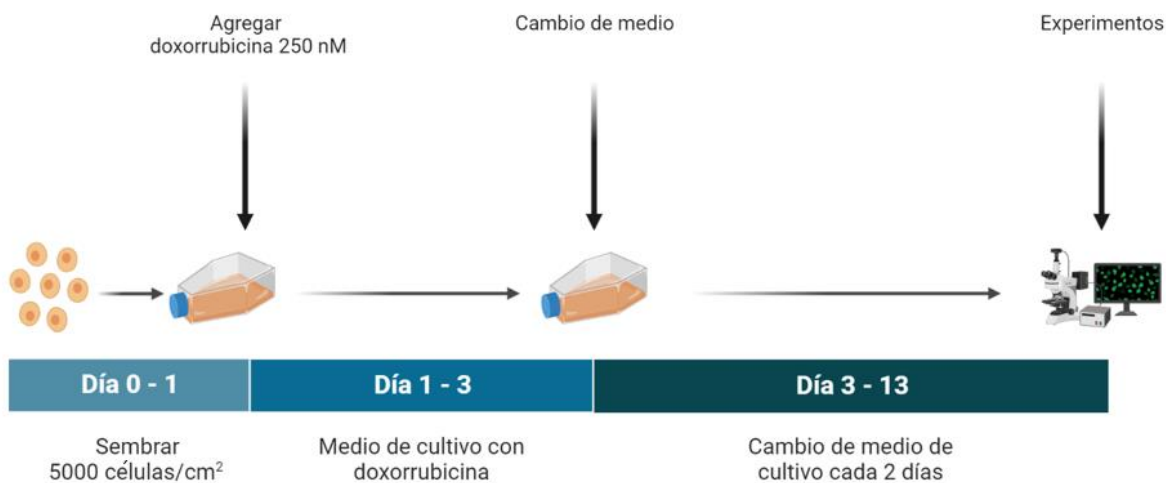


Figura 4. Esquema de inducción de senescencia de 12 días en células IMR90. Se sembraron 5000 células/cm², posterior a eso se indujo senescencia con doxorubicina 250 nM al siguiente día. Se mantuvieron las células hasta el día 13 con cambio de medio cada 2 días.

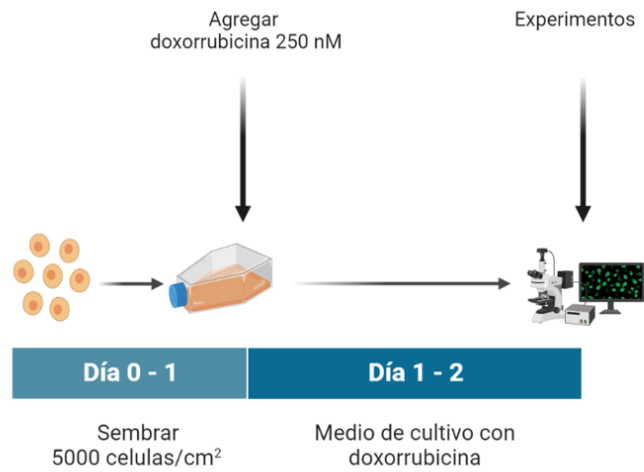


Figura 5. Esquema de inducción de senescencia 24 h en células IMR90. Se sembraron 5000 células/cm², posterior a eso se indujo senescencia con doxorubicina 250 nM al siguiente día. Se esperó un tiempo de 24 h post inducción para realizar los experimentos.

7.1.2 Determinación de marcadores de senescencia celular inducida por doxorubicina a los 12 días y 24 h post inducción.

En primer lugar, se determinaron marcadores asociados a senescencia celular en el modelo de 12 días (**figura 4**), actualmente usado en el laboratorio. Posteriormente se evaluaron los niveles de p21 y p53 de forma semicuantitativa mediante Western blot. Se puede observar en la **figura 6** que se incrementaron los niveles de p21 ($4,4 \pm 1,0$) con respecto al control ($1,0 \pm 0,2$). p53 mostró tendencia a la disminución, pese a no ser significativo. Luego, se evaluaron marcadores de senescencia celular en el modelo de 24 h (**figura 5**). Se puede evidenciar en la **figura 7** que, en etapas tempranas de inducción con doxorubicina, se incrementó la expresión de los marcadores p21 ($2,9 \pm 0,6$) con respecto al control ($1,0 \pm 0,1$) y p53 ($5,9 \pm 2,0$) con respecto a su control ($1,0 \pm 0,2$). Junto con lo anterior, en la **figura 8** se muestran los marcadores de senescencia HMGB1 y γ -H2A.X. En la inmunofluorescencia para HMGB1 se observó una tendencia a disminuir su marca nuclear en condiciones de inducción de senescencia a las 24 h (coeficiente de Manders: $0,19 \pm 0,0,8$) aunque no hubo diferencias significativas con respecto al control (coeficiente de Manders: $0,22 \pm 0,05$). Además, otra forma de evaluar la extensión de daño en la inducción de senescencia es contar el número de focos positivos de γ -H2A.X dentro del núcleo, asociados a focos de daño al ADN. Se observó un aumento en condiciones de inducción de senescencia a las 24 h (938 ± 37 focos de daño al ADN). En tanto que, en los controles, estos focos fueron menos (619 ± 28 focos de daño al ADN).

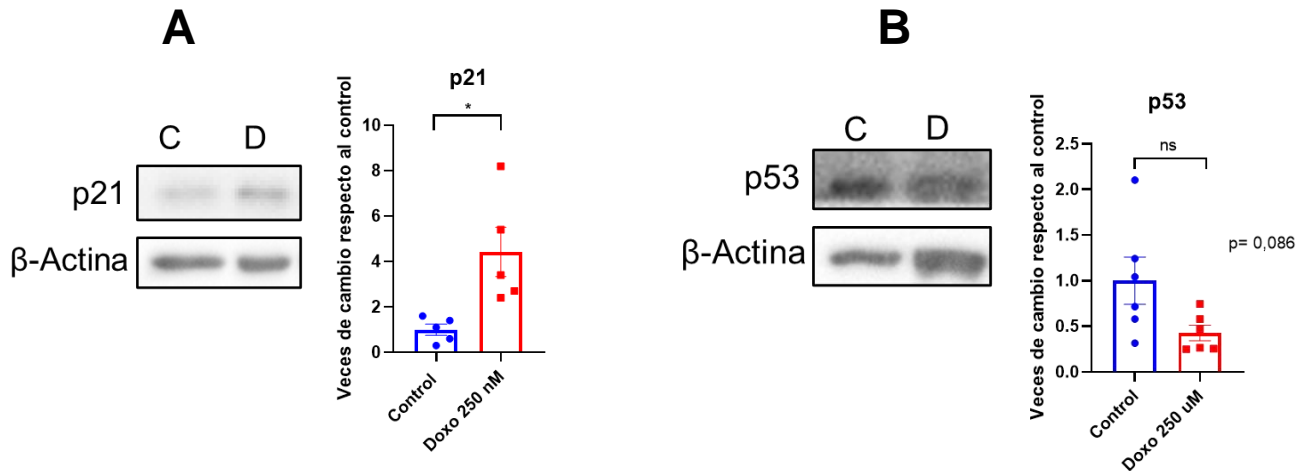


Figura 6. Cuantificación de niveles de p21 y p53 en modelo de senescencia 12 días luego de iniciado el tratamiento. (A) Gráficos de cuantificación y normalización respecto al control de p21 y **(B)** p53 junto a sus imágenes representativas de Western blot, incluyendo su condición control (C: control) y células senescentes inducidas con doxorubicina (D: doxorubicina). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=5-6. * $p \leq 0.05$, utilizando T-Test.

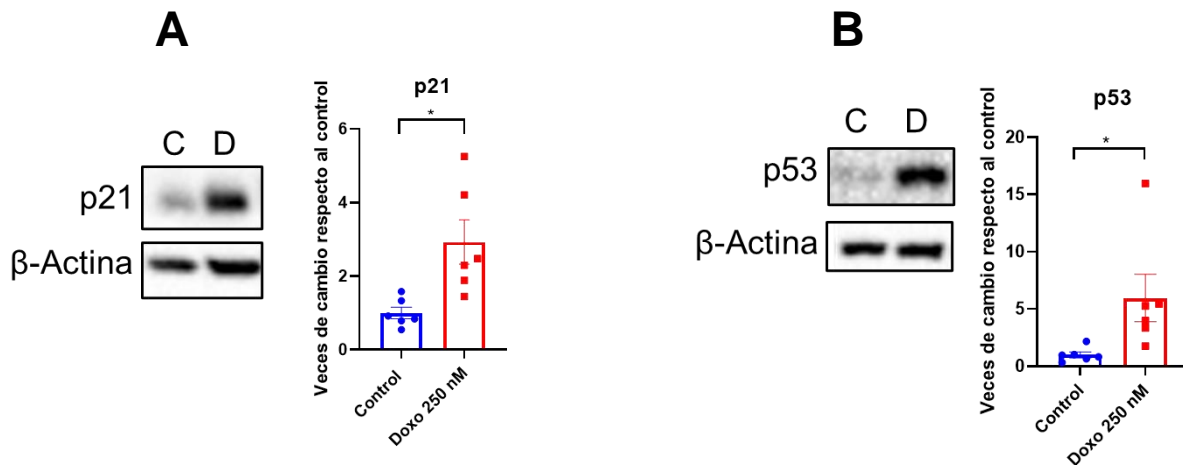


Figura 7. Cuantificación de niveles de p21 y p53 en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Gráficos de cuantificación y normalización respecto al control de p21 y **(B)** p53, junto a sus imágenes representativas de Western blot, incluyendo su condición control (C: control) y células inducidas con doxorubicina (D: doxorubicina). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=6. * $p \leq 0.05$, utilizando T-test.

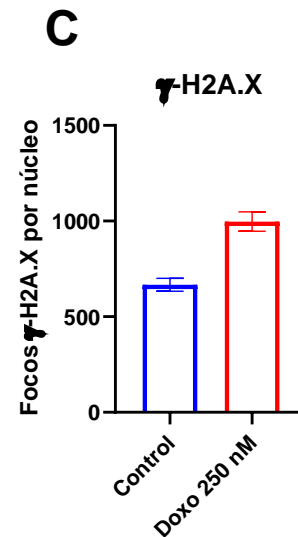
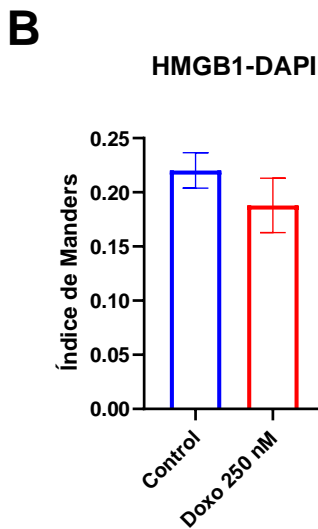
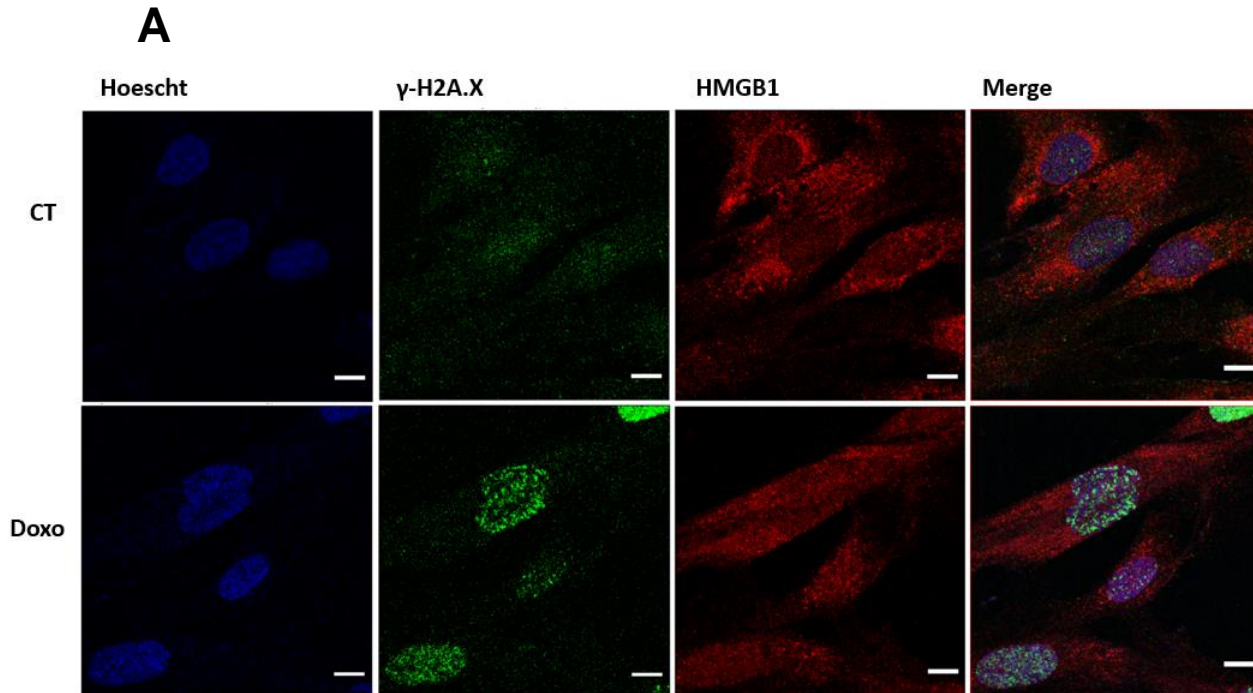


Figura 8. Evaluación del grado de colocalización de HMGB1 y cuantificación de focos de γ -H2A.X en células IMR90 en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para γ -H2A.X (en verde), HMGB1 (en rojo) y Hoescht, una sonda que permite la identificación del núcleo (en azul). La barra blanca en cada imagen representa una distancia de 10 μ m **(B)** Cuantificación de coeficiente de Manders. **(C)** Cuantificación de focos de γ -H2A.X. Para identificar los focos se consideraron todos los puntos de circularidad entre 0,0 y 1,0; de tamaño 0-infinito μ m². Se muestran las condiciones control (CT) y células inducidas con doxorubicina (Doxo 250 nM). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=50 células totales, con N de 2 por condición.

7.1.3 Caracterización de las proteínas Bcl-xL y VDAC1 en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h)

Una vez caracterizado el modelo de etapas tempranas de senescencia (24 h), se evaluó nuestra propuesta de investigación. Se utilizó como referencia el mecanismo propuesto por el grupo de Geert Bultynck.⁸⁹ Lo primero que se realizó fue evaluar si las proteínas de interés Bcl-xL y VDAC1 presentaban cambios al inducir senescencia según el modelo establecido. Se evaluó la expresión de estas proteínas mediante Western blot. Bcl-xL incrementó sus niveles de forma significativa, en términos estadísticos, a las 24 h de inducción de senescencia, ($1,6 \pm 0,2$ veces) respecto al control ($0,9 \pm 0,1$) (**Figura 9**). Este fenómeno ha sido caracterizado previamente en un modelo de inducción de 7 días post quimioterapéutico.⁶⁶ Por otra parte, VDAC1 no sufrió cambios significativos bajo la condición de estudio (**Figura 9**).

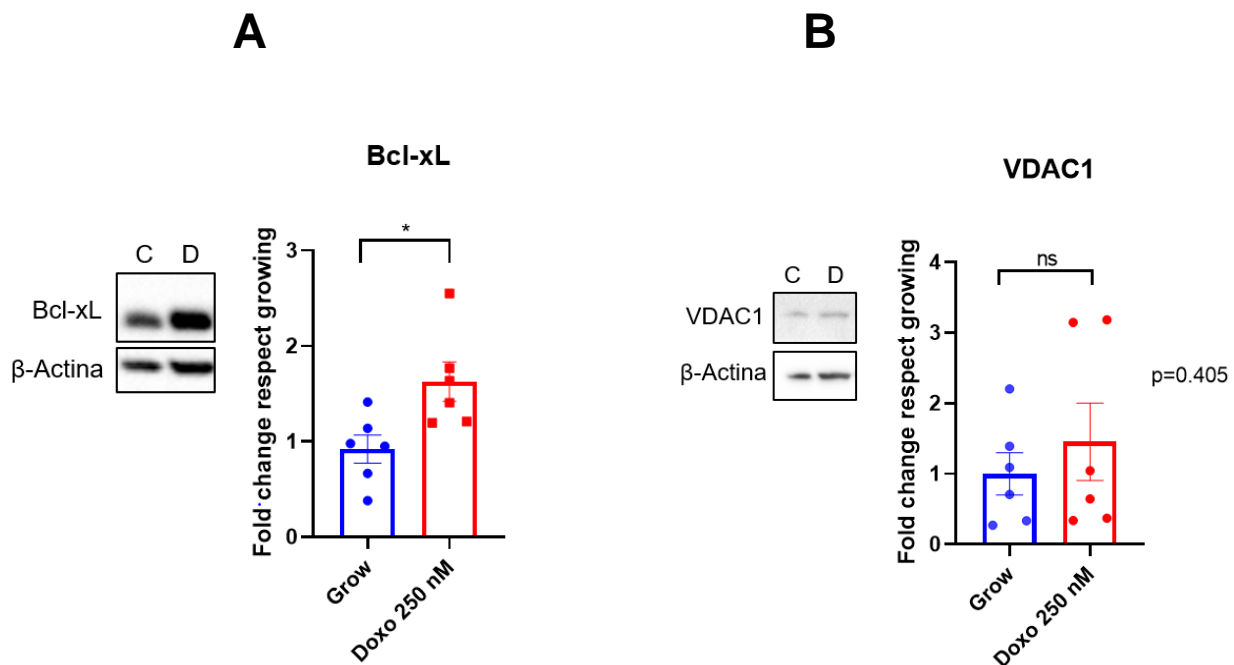


Figura 9. Cuantificación de niveles de Bcl-xL y VDAC1 en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Gráficos de cuantificación y normalización respecto al control de Bcl-xL y **(B)** VDAC1, junto a sus imágenes representativas de Western blot, incluyendo su condición control (C: control) y células inducidas con doxorrubicina (D: Doxo 250 nM). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=6. * $p \leq 0.05$, utilizando T-test.

7.1.4 Determinación de dinámica espacial de Bcl-xL en células IMR90 durante etapas tempranas de TIS (24 h)

Luego de verificar la expresión de las proteínas de interés, se determinó su dinámica espacial. Para esto se realizaron experimentos de inmunofluorescencia, evaluando de esta forma la colocalización de Bcl-xL con la mitocondria. En la **figura 10** se puede observar que Bcl-xL incrementó su localización mitocondrial de forma significativamente estadística (coeficiente de Manders: $0,43 \pm 0,02$) a las 24 h de inducción de senescencia, respecto al control (coeficiente de Manders: $0,35 \pm 0,02$).

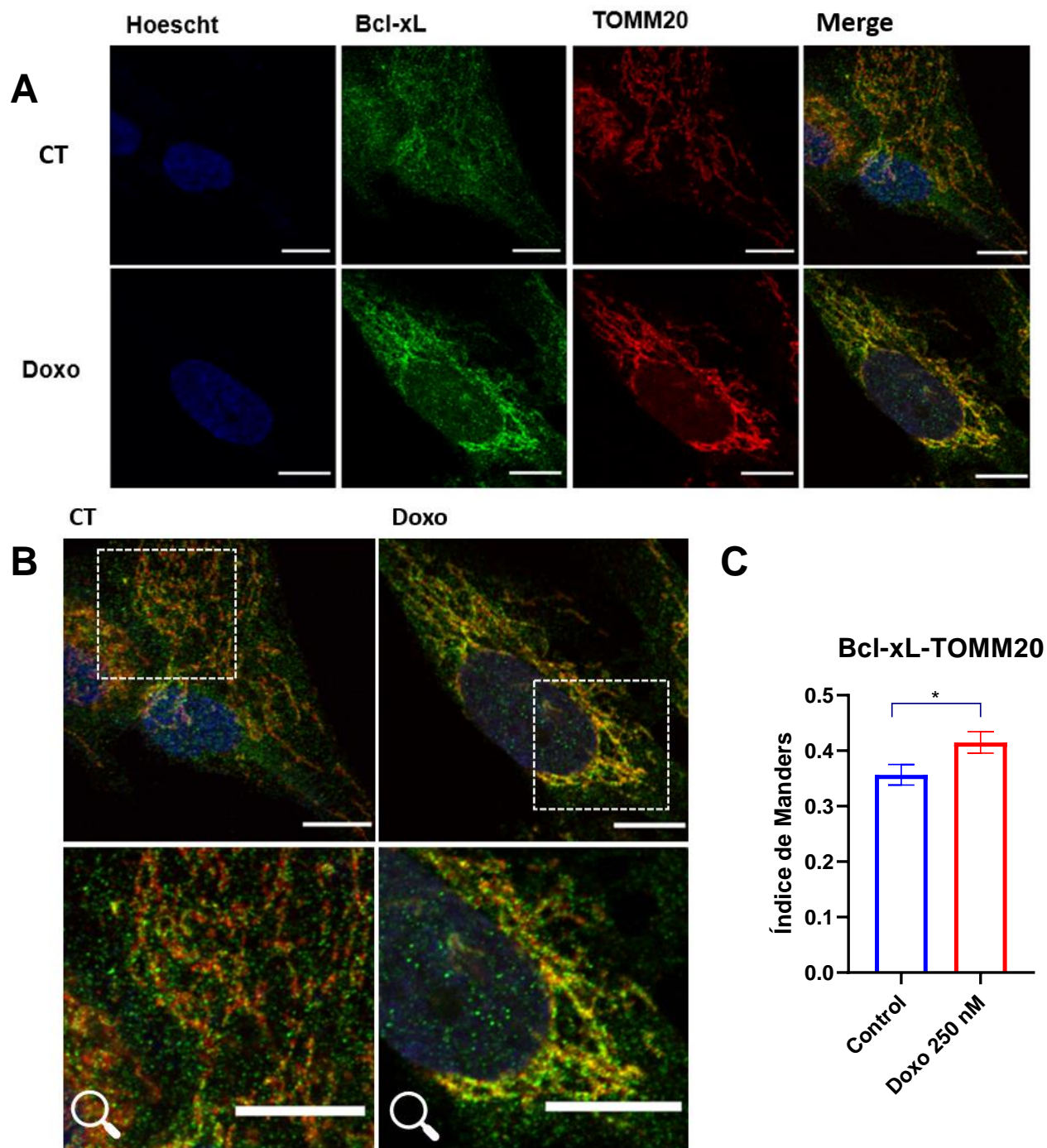


Figura 10. Evaluación del grado de colocalización de Bcl-xL con la mitocondria (TOMM20) en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Imágenes respectivas de inmunofluorescencia de Bcl-xL (verde), TOMM20 (rojo) y Hoescht, una sonda que permite la identificación del núcleo (azul). **(B)** Detalle con aumento del Merge de la figura A. Las líneas punteadas delimitan la zona ampliada. Se representa la escala de 10 μm con una barra blanca. **(C)** Cuantificación de coeficiente de Manders. Se muestran las condiciones control (CT) y células inducidas con doxorubicina 250 nM (Doxo). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=10-15 células c/N, con N de 3 por condición. ****** $p \leq 0.01$, utilizando T-test.

Considerando los datos expuestos se puede concluir que en nuestro modelo de senescencia celular en etapas tempranas de inducción con doxorubicina (24 h), ocurre un aumento en los niveles proteicos de Bcl-xL, acompañado de un incremento en la localización mitocondrial de la misma.

7.2 Objetivo 2. Evaluar el rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 y su impacto en la captación de Ca²⁺ mitocondrial en etapas tempranas de TIS (24 h).

7.2.1 Caracterización de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en etapas tempranas de TIS (24 h)

Una vez descrito el aumento en los niveles de BCL-xL, junto con un aumento en la localización mitocondrial, se realizaron aproximaciones para evaluar su interacción con la proteína VDAC1. Para esto se utilizó la herramienta denominada *proximity ligation assay* PLA. Como se observa en la **figura 11**, existe un incremento en la cantidad de contactos (298 ± 22 puntos por célula) de estas proteínas a las 24 h de inducción de senescencia con respecto al control (205 ± 18 puntos por célula). Junto con lo anterior, en la **figura 12** se realizó un control técnico. Se muestra una inmunofluorescencia representativa de VDAC1-TOMM20 para caracterizar la localización mitocondrial de VDAC1, además de la evidenciada anteriormente para Bcl-xL en la **figura 10**.

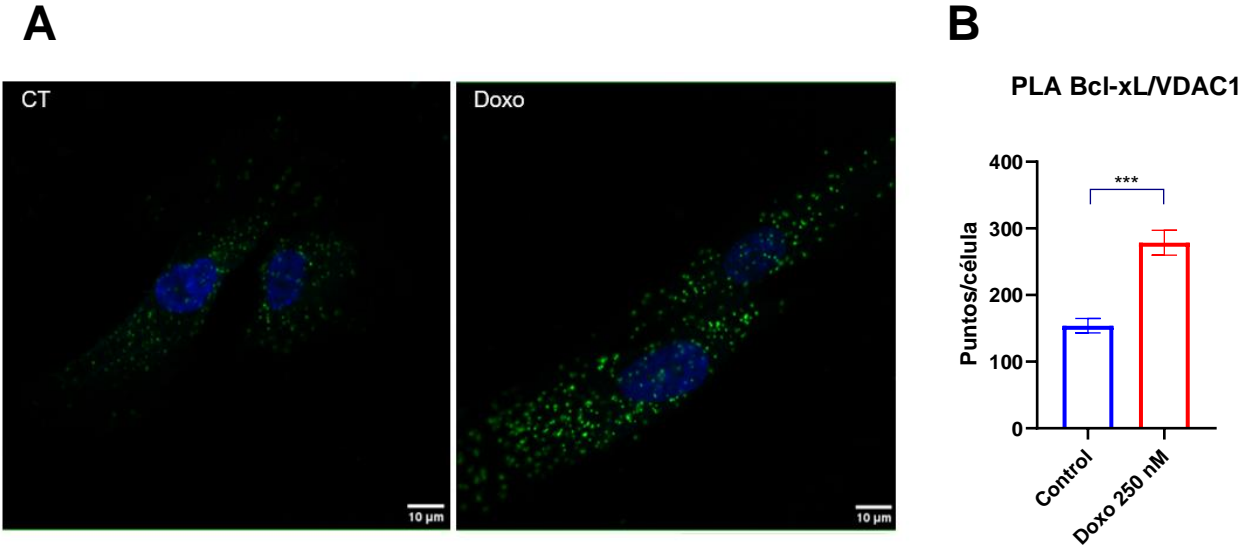


Figura 11. Cuantificación del número de interacciones entre Bcl-xL y VDAC1 utilizando técnica PLA en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado del tratamiento. (A) Imágenes representativas de puntos verdes cuantificados para control (CT) y células inducidas con doxorubicina 250 nM (Doxo). Se representa la escala de 10 μm con una barra blanca. **(B)** La cuantificación en el gráfico indica número de puntos verdes por célula. Los datos muestran promedio \pm SEM. N=20 células c/N, con N de 3 por condición. *** $p \leq 0.001$, utilizando T-test.

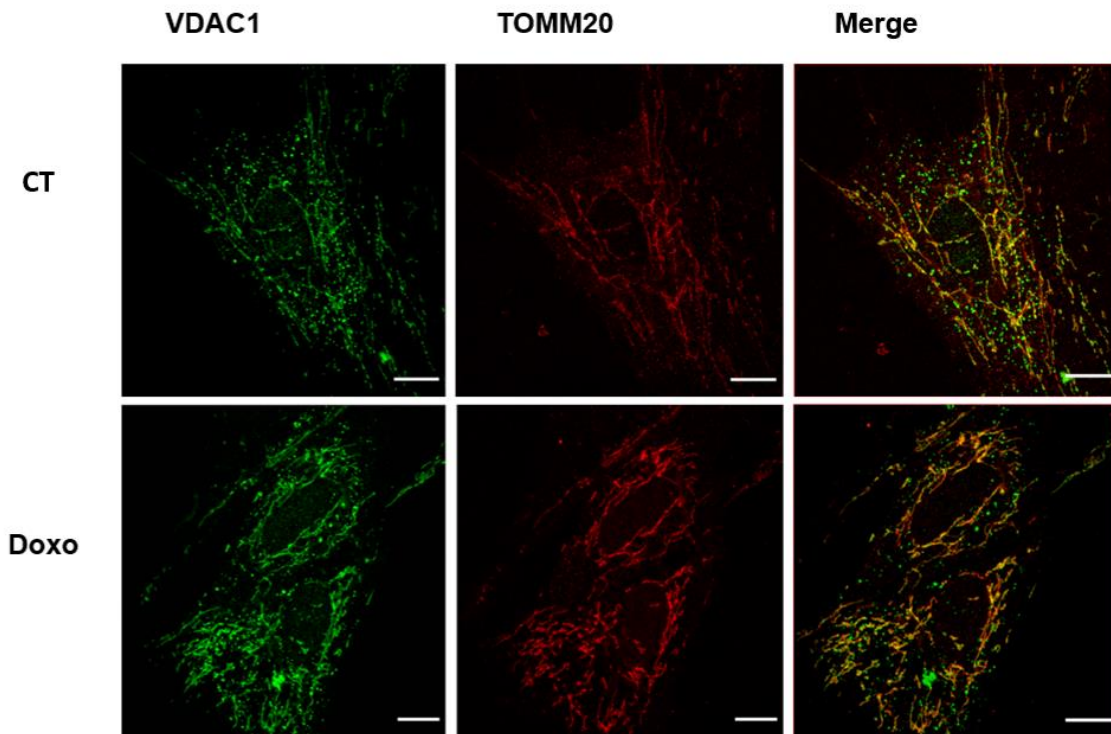


Figura 12. Inmunofluorescencia representativa de VDAC1-TOMM20 en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. Imágenes respectivas de inmunofluorescencia de VDAC1 (verde) y TOMM20, un marcador de mitocondrias (rojo). Se muestran las condiciones control (CT) y células inducidas con doxorubicina 250 nM (Doxo). Se representa la escala de 10 μ m con una barra blanca.

7.2.2 Rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en la captación de Ca^{2+} mitocondrial en etapas tempranas de TIS (24h)

Como ya se planteó, en un contexto de inducción de senescencia en etapas tempranas (24 h), la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 regularía el ingreso de flujo de Ca^{2+} hacia la mitocondria mediada por VDAC1, permitiendo la progresión del fenotipo senescente. Por lo tanto, se realizó una caracterización de los flujos de Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria. Se puede observar en la **figura 13A**, que los flujos de Ca^{2+} desde el RE, bajo inducción con histamina, hacia la mitocondria disminuyeron a las 24 h de inducción de senescencia (peak post estimulación con histamina: $1,2 \pm 0,01$) con respecto al control (peak post estimulación con histamina: $1,5 \pm 0,01$). Este resultado es concordante con la

regulación que se atribuye a la interacción de Bcl-xL y VDAC1.⁸⁹ Además, no se observó diferencias estadísticamente significativas en los flujos de Ca^{2+} desde el RE hacia el citoplasma bajo inducción con histamina y detectados con Fluo-4 (24 h de inducción de senescencia, peak post estimulación con histamina: $4,8 \pm 0,1$; control, peak post estimulación con histamina: $4,3 \pm 0,1$) (**figura 13B**). Finalmente, para complementar estos datos, se realizó un experimento para medir el Ca^{2+} presente en la mitocondria en las 24 h de inducción de senescencia (**figura 13C**). Para esto se utilizó FCCP, un agente desacoplante de potencial mitocondrial, para inducir la liberación de Ca^{2+} en la mitocondria y realizar mediciones de Ca^{2+} citoplasmático con Fluo-4. Se pudo caracterizar que el Ca^{2+} estaba incrementado en la mitocondria a las 24 h de inducción de senescencia (peak post estimulación con FCCP: $1,3 \pm 0,01$) con respecto al control (peak post estimulación con FCCP: $1,1 \pm 0,003$). Esto se relaciona con lo previamente descrito sobre la acumulación de Ca^{2+} mitocondrial en células senescentes.⁷⁴

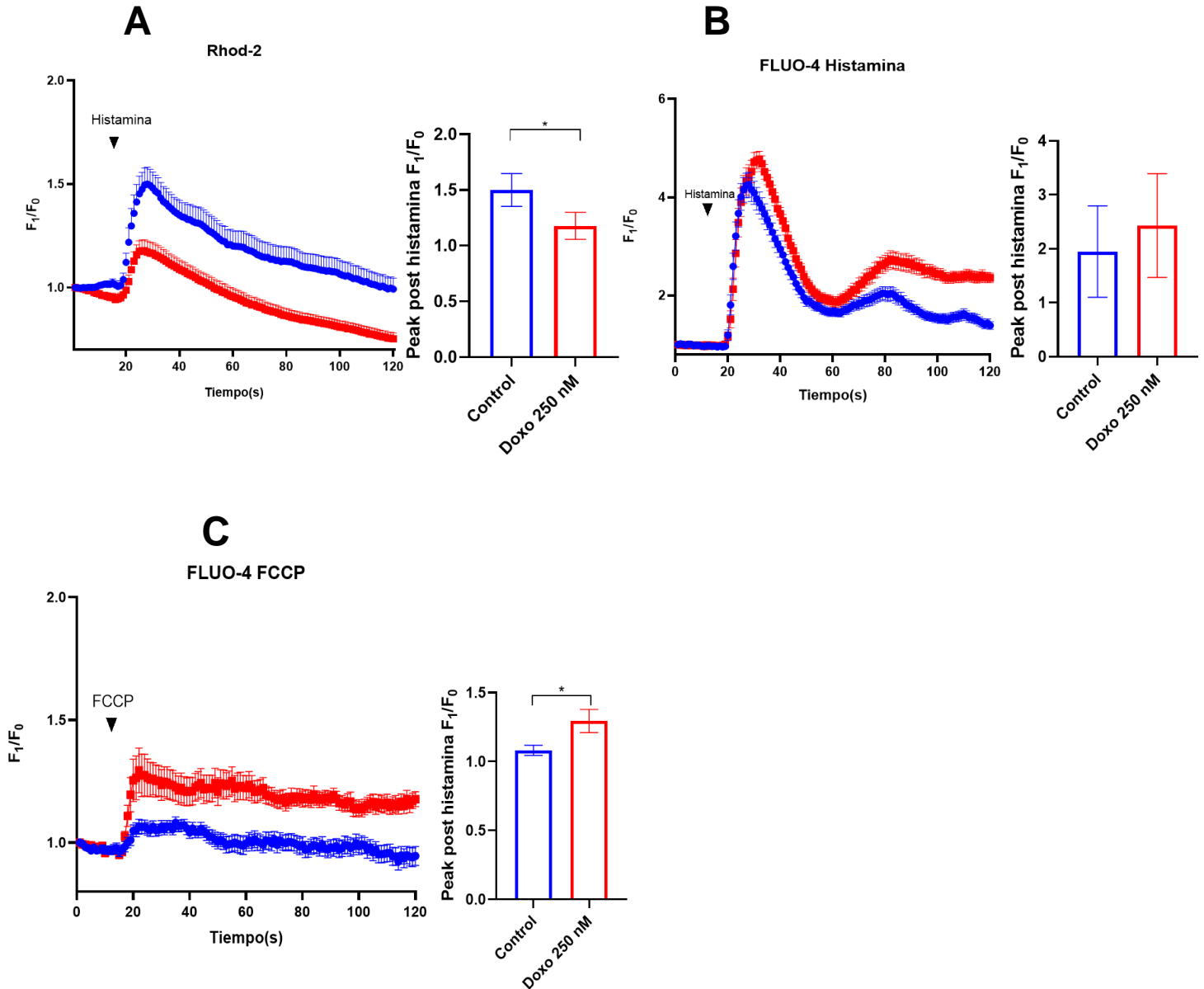


Figura 13. Evaluación de las dinámicas de Ca^{2+} en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Se muestra la curva de intensidad de fluorescencia normalizada por la fluorescencia inicial (F_1/F_0) para la sonda Rhod-2 como evaluación de Ca^{2+} mitocondrial estimulado por histamina. N=8 células con N de 3 por condición. **(B)** (F_1/F_0) para Fluo-4 como evaluación de Ca^{2+} citoplasmático estimulado por histamina. N= 20 células con N de 2 por condición. **(C)** (F_1/F_0) para Fluo-4 como evaluación de Ca^{2+} citoplasmático proveniente desde la mitocondria estimulado con FCCP. N=11 células con N de 3 por condición. En todos los análisis se muestra control y células inducidas con doxorrubicina (Doxo). Las células fueron estimuladas con 0,3 mM de histamina y 1 μ M de FCCP, según corresponda. Estadística descriptiva muestra promedio de los peaks cuantificados \pm SEM. * $p \leq 0.05$, utilizando T-test.

7.2.3 Caracterización de proteínas implicadas en el flujo de Ca²⁺ en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h)

Para evaluar que los cambios en los flujos de Ca²⁺ descritos anteriormente no se deban a una regulación de las proteínas involucradas en los flujos de Ca²⁺, se evaluaron los niveles de expresión mediante Western blot de las isoformas de IP3R como también de MCU y MICU1. Se puede observar en la **figura 14**, que los niveles de las isoformas de IP3R no presentaron cambios estadísticamente significativos a las 24 h de inducción de senescencia, al igual que MCU y MICU1.

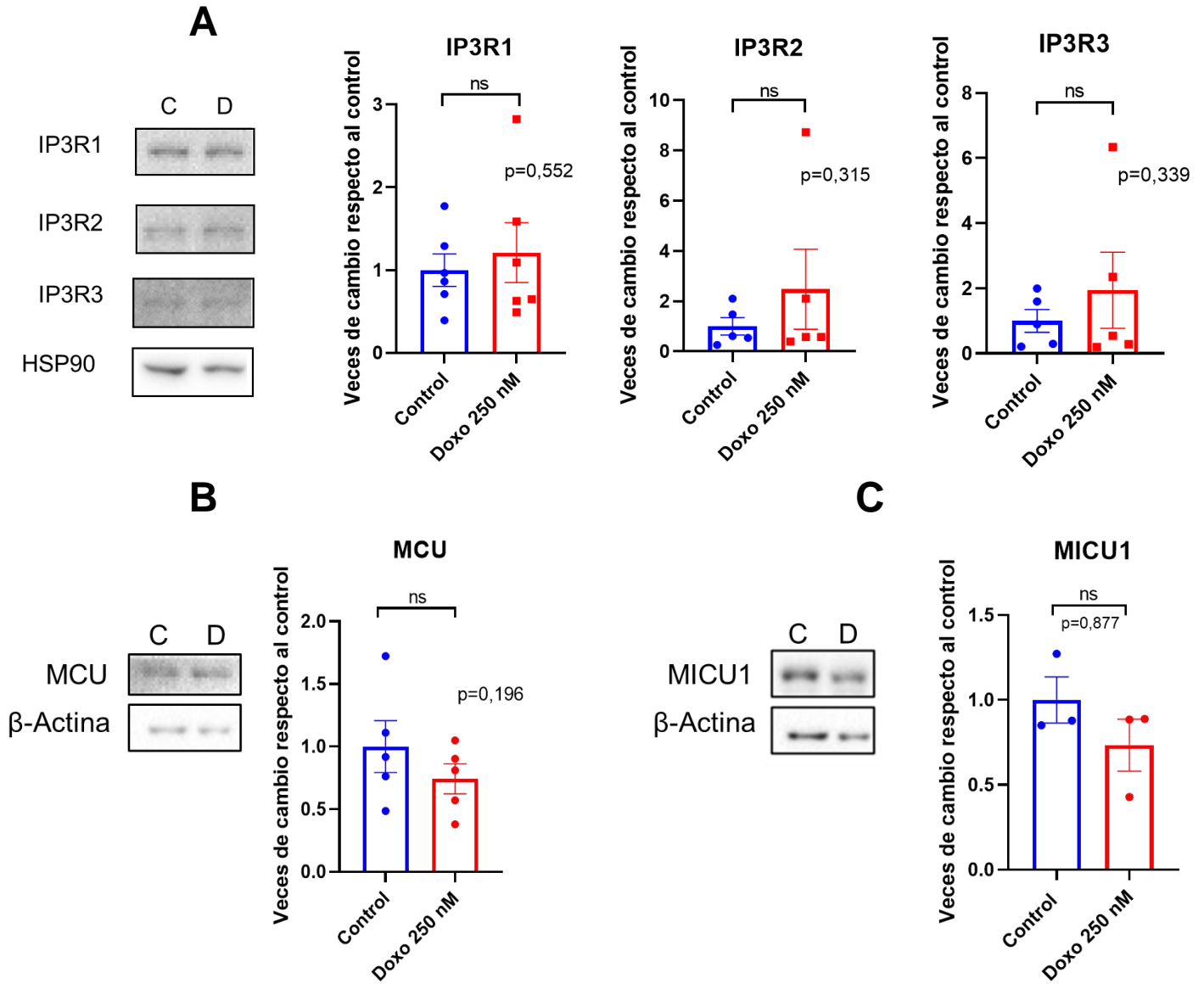


Figura 14. Cuantificación de niveles de isoformas de IP3R, MCU y MICU1 en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Gráficos de cuantificación y normalización respecto al control de IP3R1, IP3R2 e IP3R3 **(B)** MCU, y **(C)** MICU1, junto a sus imágenes representativas de Western blot, incluyendo su condición control (C: control) y células inducidas con doxorubicina (D: Doxo 250 nM). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=3-6. * $p < 0.05$, utilizando T-test.

7.2.4 Prueba de concepto de senolítico ABT-263 como inhibidor de Bcl-xL y posible disruptor de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1

Previamente, se pudo describir lo propuesto en nuestro modelo de estudio (**figura 2**), demostrando que Bcl-xL incrementa su localización mitocondrial, como también sus puntos de contacto con VDAC1. Además, existe una disminución en los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria en etapas tempranas de TIS. Para complementar esta información y para poder evidenciar si la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 es clave para la supervivencia de células en etapas tempranas de TIS dependiendo de la regulación de los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria, se decidió usar el inhibidor de Bcl-xL: ABT-263. Este actúa como inhibidor de las proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-w y Bcl-xL.⁸⁵ Se ha descrito además que ABT-263 actúa como senolítico.³¹ Por esta razón se plantea que al inhibir Bcl-xL y, como parte de su mecanismo senolítico, ABT-263 podría interrumpir la interacción entre Bcl-xL con VDAC1, alterando las regulaciones de las dinámicas de Ca^{2+} mitocondrial y generando así la muerte de células en etapas tempranas de TIS (**figura 15**).

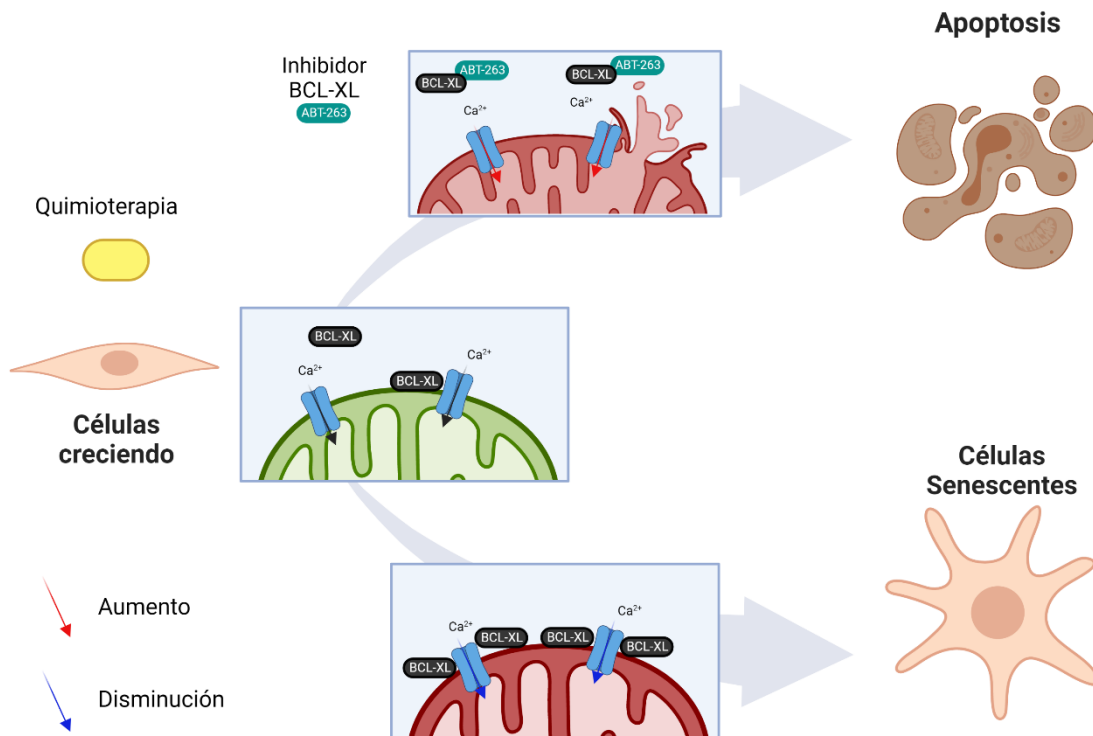


Figura 15. Prueba de concepto de la interrupción en la interacción de Bcl-xL con VDAC1 mediante el uso de ABT-263. ABT-263, molécula mimética de BH3, inhibidor de Bcl-xL y descrito como senolítico. ABT-263 podría interrumpir la interacción entre Bcl-xL con VDAC1 y alterar las regulaciones de las dinámicas de Ca²⁺ mitocondrial como parte de su mecanismo senolítico.

7.2.5 Docking molecular de interacción entre Bcl-xL con VDAC1 incluyendo ABT-263

En relación con lo anterior, para verificar si ABT-263 estaría interrumpiendo la interacción entre Bcl-xL y VDAC1, se realizaron ensayos *in silico* mediante docking molecular de las estructuras de Bcl-xL (PDBID:4QNQ) y VDAC1 (PDBID: 3EMN) mediante una colaboración realizada junto a la Doctora Ariela Vergara y Roberto Rosales de la Universidad de Talca. Para esto se utilizó el software ColabFold,⁹⁸ implementando el algoritmo AlphaFold.⁹⁹ En primer lugar, se estableció la identidad entre las estructuras cristalizadas de origen murino y humano, siendo para Bcl-xL un 97.9% y para VDAC1 un 94.3%. Al tener una alta identidad se procedió a utilizar las estructuras de ratón. La interfaz de contacto fue corroborada mediante dos distintos enfoques. El primer enfoque se centró en las interacciones establecidas a 5Å entre la proteína Bcl-xL y ABT-263 (PDBID:4QNQ), dado que la asociación de la interacción Bcl-xL:VDAC1 inhibe la actividad de la proteína Bcl-xL. El segundo enfoque se llevó a cabo según predicciones de interfaces de contacto para interacción proteína-proteína (PPI), a través de los softwares Bipsi y RaptorX. De la combinación de ambos enfoques, se logró identificar 5 putativos residuos de Bcl-xL claves para formar el complejo Bcl-xL:VDAC1. Estos corresponderían a TYR101, ASN136, ARG139, LEU194, y TYR195. En la **figura 16**, se puede observar a la molécula de ABT-263 en amarillo, la cual estaría posicionada en sitios de Bcl-xL que estarían siendo partícipes de la interacción con VDAC1. De esta forma, esta superposición estructural permitió describir que puede darse una interrupción en la interacción de Bcl-xL con VDAC1 al utilizar ABT-263, siendo una posibilidad para estudiar la relevancia de esta interacción en la supervivencia de células en etapas tempranas de TIS.

SUPERPOSICIÓN ESTRUCTURAL MODELO INTERACCIÓN CON PDBID:4QNQ.

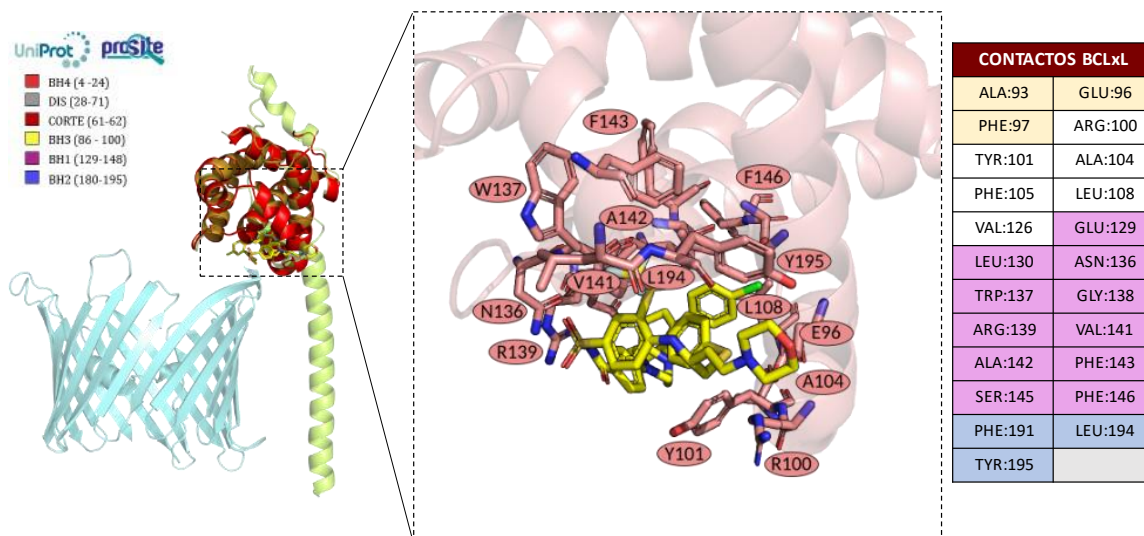


Figura 16. Docking molecular de las estructuras de Bcl-xL con VDAC1, incluyendo ABT-263. Mediante el software ColabFold se realizó un docking molecular. En amarillo se observa la molécula de ABT-263 presente en los sitios de Bcl-xL descritos que interactúan con VDAC1 en este modelo para el cual fueron identificados 5 aminoácidos clave: TYR101, ASN136, ARG139, LEU194, y TYR195.

7.2.6 Caracterización de Bcl-xL y VDAC1 en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263

En primer lugar, al describir la relación estructural entre ABT-263 y Bcl-xL, fue relevante realizar una caracterización de las proteínas de interés: Bcl-xL y VDAC1 para descartar si no ocurrían cambios en los niveles de proteínas bajo el uso de este compuesto. Interesantemente, la **figura 17** muestra que al utilizar ABT en condiciones de inducción de senescencia a 24 h (Doxo+ABT) se observó una disminución estadísticamente significativa de Bcl-xL ($0,69 \pm 0,3$) en comparación a la condición con doxorubicina ($1,6 \pm 0,2$). Esto también se condice con una tendencia a la disminución de ABT ($0,4 \pm 0,1$) con respecto al control ($0,9 \pm 0,14$). Por otra parte, no ocurrieron cambios significativos en VDAC1 bajo el uso de este compuesto en las mismas condiciones.

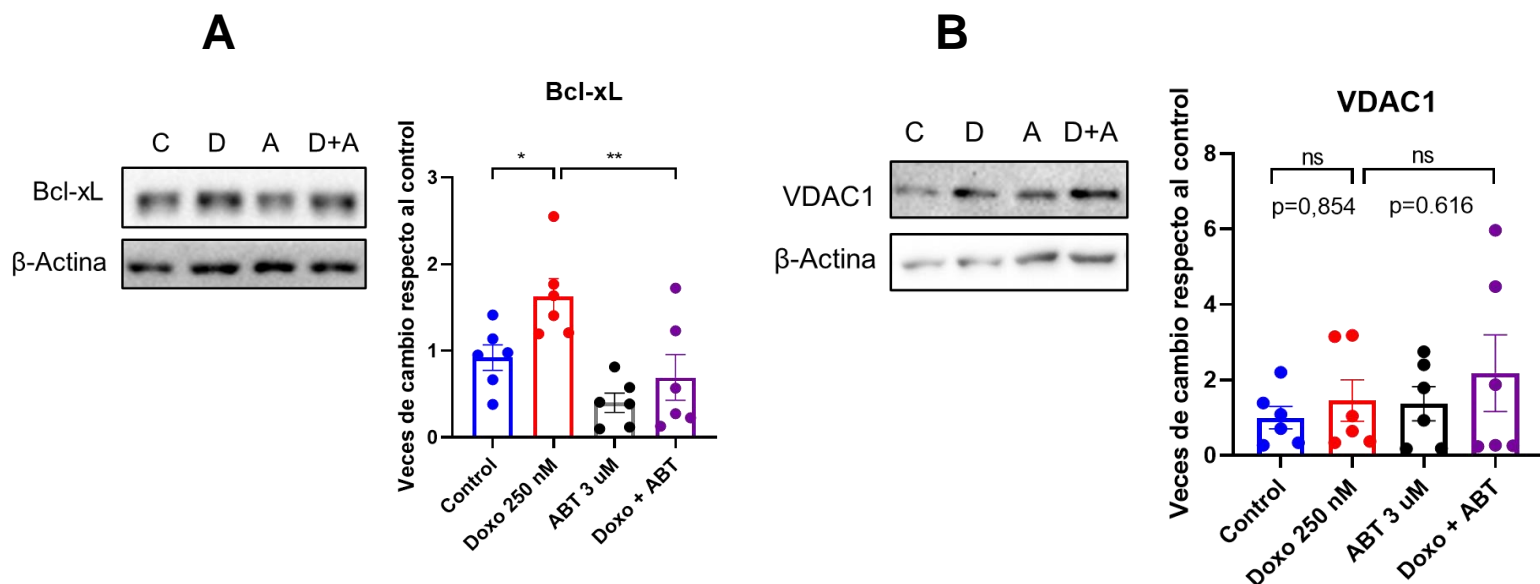
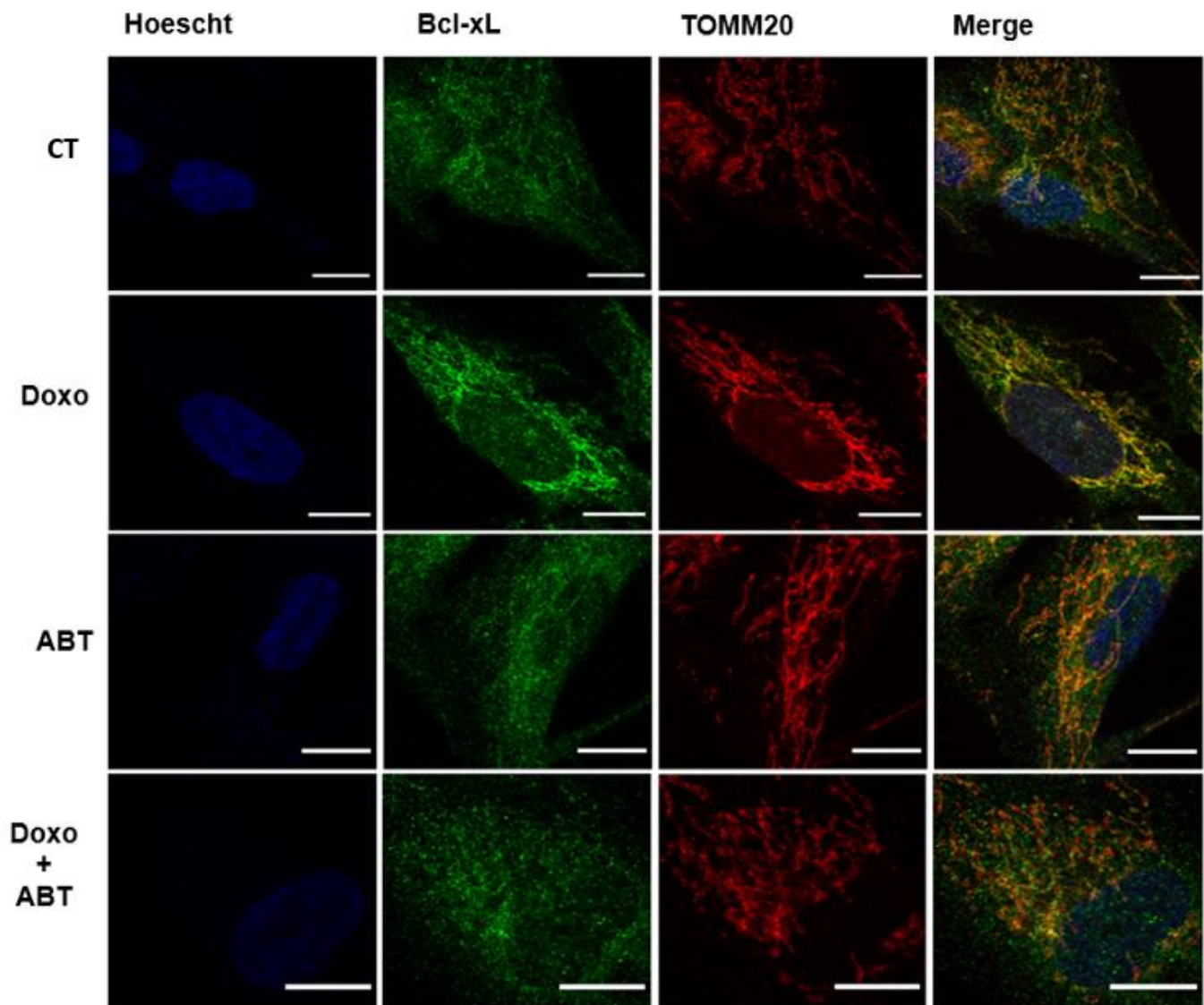


Figura 17. Cuantificación de niveles de Bcl-xL y VDAC1 en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento incluyendo ABT-263. (A) Gráficos de cuantificación y normalización respecto al control de Bcl-xL y (B) VDAC1, junto a sus imágenes representativas de Western blot, incluyendo su condición control (C: control), células inducidas con doxorubicina (D: Doxo 250 nM), células inducidas con ABT-263 (A: ABT-263 3 μM) y células inducidas con doxorubicina y ABT-263 (D+A: Doxo+ABT-263 a concentraciones previamente descritas). Los datos muestran promedio ± SEM. N=6. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, utilizando ANOVA y post test Sidak.

7.2.7 Determinación de dinámica espacial de Bcl-xL en células IMR90 durante etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263

Como se pudo identificar en la **figura 17**, Bcl-xL presentó una disminución significativa en su expresión proteica en condiciones de inducción de senescencia a las 24 h en conjunto con el inhibidor ABT-263, comparado al incremento que observamos previamente al tratar únicamente con doxorubicina. Además de lo anterior, se evaluó la dinámica espacial de Bcl-xL. Como podemos observar en la **figura 18**, efectivamente el tratamiento de ABT-263 en conjunto con la inducción de senescencia temprana, disminuyó la colocalización de Bcl-xL y la mitocondria (coeficiente de Manders: $0,36 \pm 0,02$) con respecto al tratamiento único con doxorubicina (coeficiente de Manders: $0,43 \pm 0,02$).

A



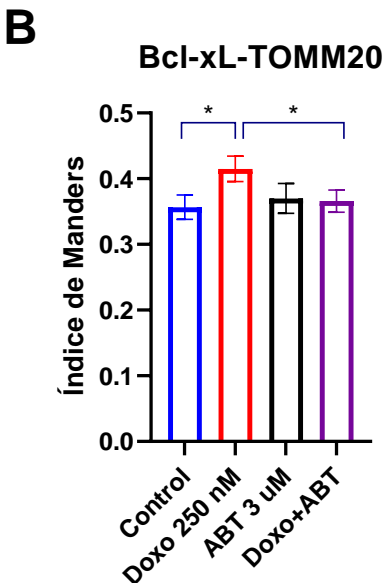


Figura 18. Evaluación del grado de colocalización de Bcl-xL con la mitocondria (TOMM20) en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Imágenes respectivas de inmunofluorescencia de Bcl-xL (verde), el marcador de mitocondrias TOMM20 (rojo) y Hoescht, una sonda que permite la identificación del núcleo (azul). Se representa la escala de 10 μ m con una barra blanca. **(B)** Cuantificación de coeficiente de Manders. Se muestran las condiciones control (CT), células inducidas con doxorubicina 250 nM (Doxo), células inducidas con ABT-263 3 μ M (ABT) y células inducidas con doxorubicina y ABT-263 a concentraciones previamente descritas (Doxo+ABT). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=10 células, con N de 3 por condición. * $p \leq 0.05$, utilizando ANOVA y post test Sidak.

7.2.8 Caracterización de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263.

Considerando que el uso de ABT-263 interfiere con la colocalización mitocondrial de Bcl-xL, se evaluó los efectos del inhibidor en los sitios de proximidad descritos entre Bcl-xL y VDAC1 bajo condiciones de inducción de senescencia a las 24 h. La **figura 19**, muestra que existe una disminución en los sitios de proximidad (507 ± 15 puntos por célula) con respecto al control (899 ± 23 puntos por célula). Estos resultados sugieren que la interacción descrita entre Bcl-xL y VDAC1 estaría siendo interrumpida por ABT-263.

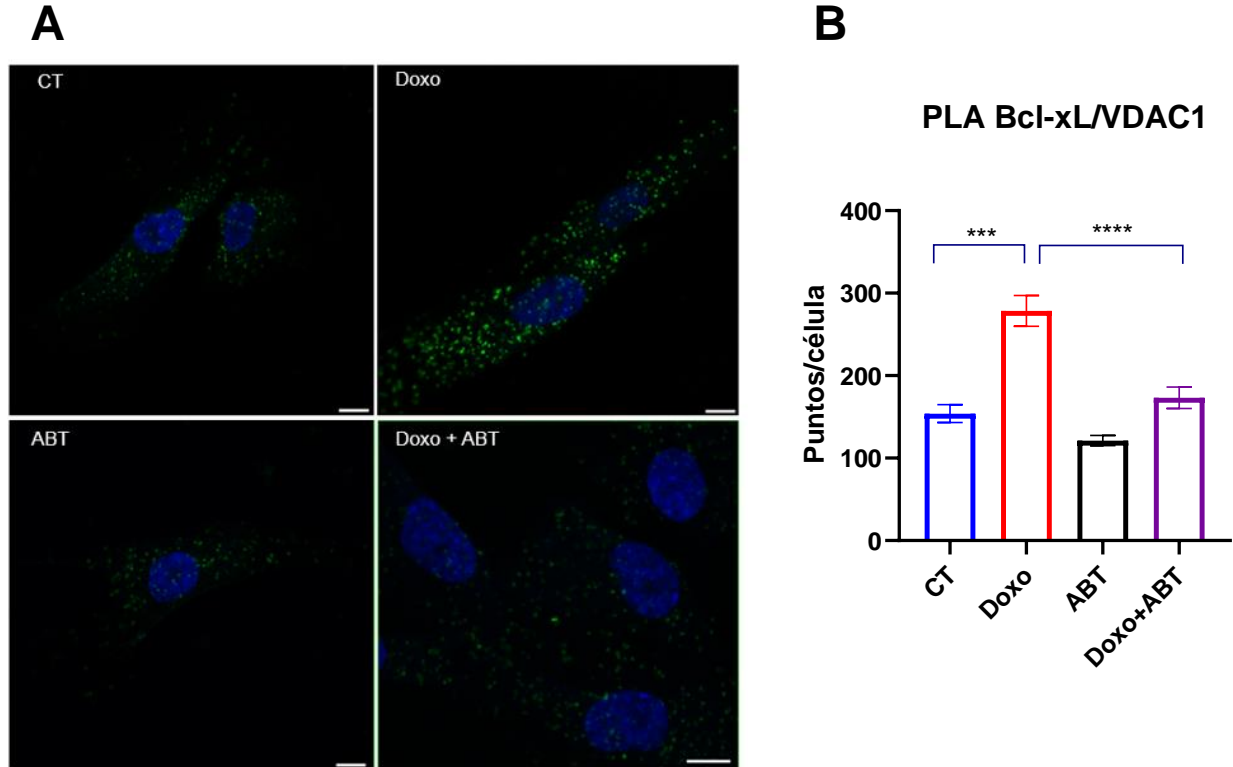
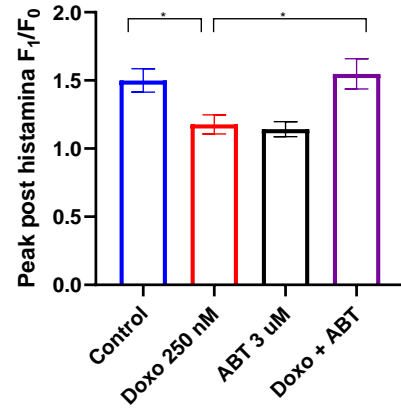
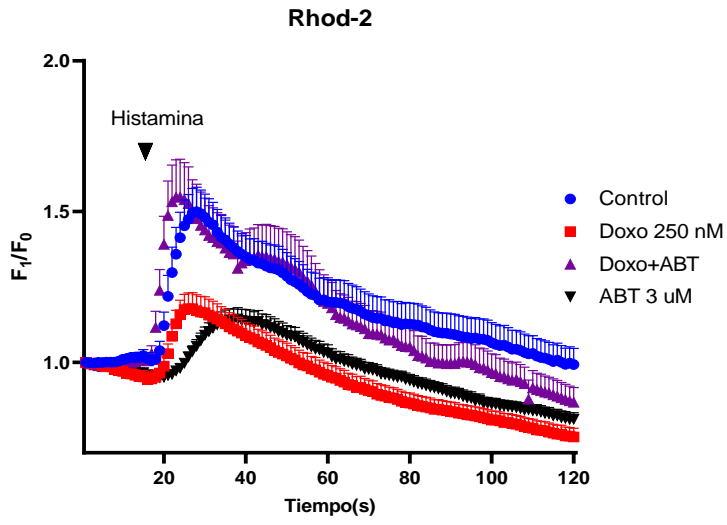
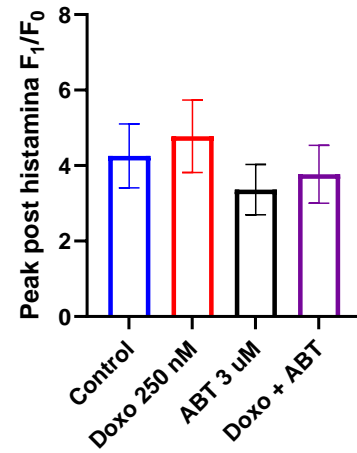
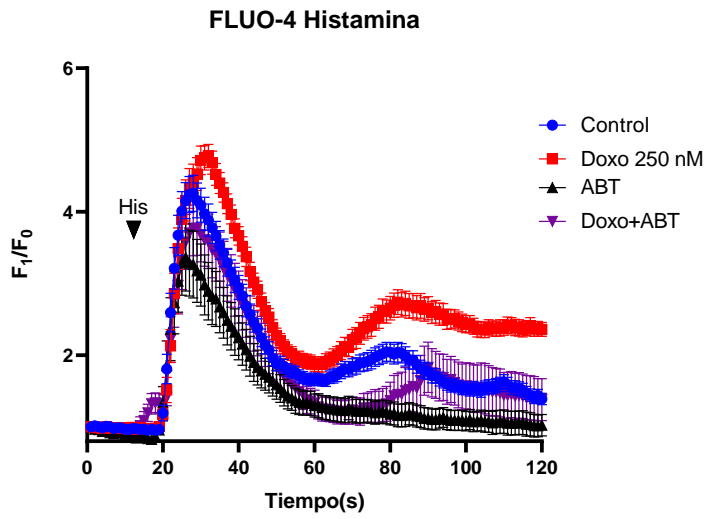


Figura 19. Cuantificación del número de interacciones entre Bcl-xL y VDAC1 utilizando técnica PLA en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado del tratamiento. (A) Imágenes representativas de puntos verdes cuantificados para control (CT), células inducidas con doxorubicina 250 nM (Doxo), células inducidas con ABT-263 3 μ M (ABT) y células inducidas con doxorubicina y ABT-263 a concentraciones previamente descritas (Doxo+ABT). Se representa la escala de 10 μ m con una barra blanca. **(B)** La cuantificación en el gráfico indica número de puntos verdes por célula. Los datos muestran promedio \pm SEM. N=20 células, con N de 3 por condición. *** $p \leq 0.001$, utilizando ANOVA y post test Sidak.

7.2.9 Rol de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 en la captación de Ca^{2+} mitocondrial en etapas tempranas de TIS incluyendo el inhibidor ABT-263

Hasta el momento se logró describir que, al realizar el tratamiento con ABT-263 en conjunto con la inducción de senescencia a etapas tempranas (24 h), Bcl-xL disminuye sus niveles proteicos, su localización mitocondrial y su proximidad con VDAC1. Estos resultados son coincidentes con el modelo estructural propuesto en la **figura 16**. Luego, se evaluó si el inhibidor tiene un efecto a nivel funcional, es decir un impacto sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Para esto se realizaron experimentos para evaluar las dinámicas de los flujos

de Ca^{2+} incluyendo al inhibidor ABT-263. En la **figura 20A** se observa que los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria (evaluados con Rhod-2) bajo inducción con histamina, se incrementaron en niveles similares al control cuando se incluyó ABT-263 en conjunto a la inducción temprana de senescencia (peak post estimulación con histamina: $1,55 \pm 0,1$) en comparación a lo observado previamente sin el inhibidor (peak post estimulación con histamina: $1,18 \pm 0,07$), siendo esto estadísticamente significativo. Por otro lado, en la **figura 20B**; se evidencia que hay una tendencia a la disminución en los flujos de Ca^{2+} desde el RE hacia el citoplasma bajo inducción con histamina y detectados con Fluo-4, al utilizar el inhibidor ABT-263 en condiciones de etapas tempranas de inducción de senescencia (**figura 20C**) en comparación a lo observado con doxorrubicina previamente sin el inhibidor (**figura 20C**). Esto podría relacionarse con el incremento de los flujos de Ca^{2+} mitocondriales descritos previamente. Finalmente, en la **figura 20C** se muestra que el Ca^{2+} mitocondrial liberado mediante el uso de FCCP, presentó una disminución significativa bajo tratamiento conjunto de ABT-263 y doxorrubicina a etapas tempranas ($1,1 \pm 0,01$), en comparación a lo analizado previamente con doxorrubicina ($1,3 \pm 0,01$).

A**B**

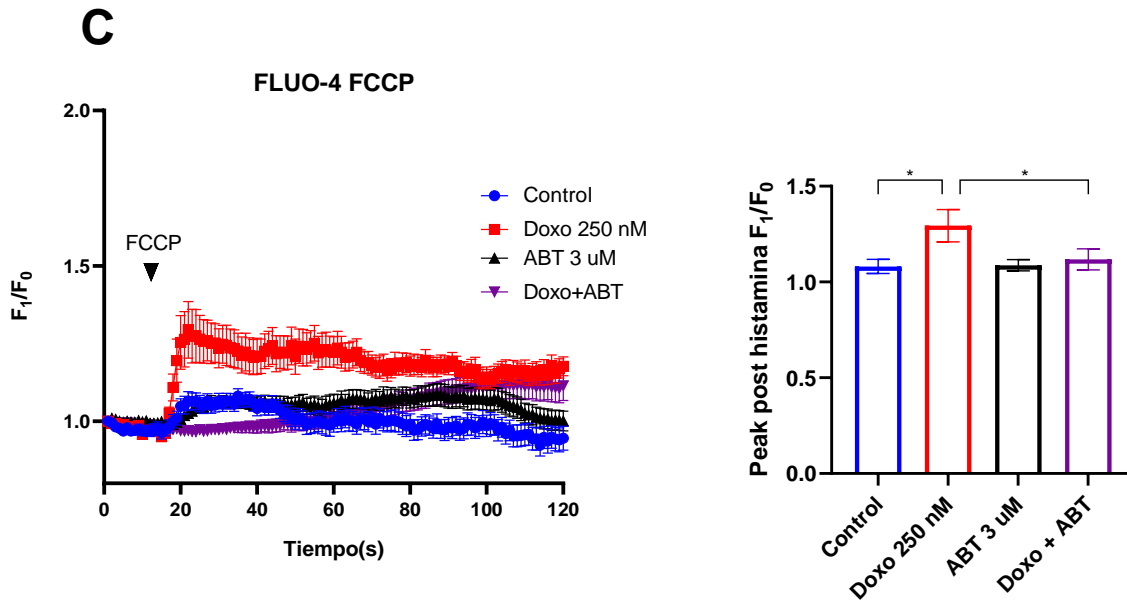


Figura 20. Evaluación de las dinámicas de Ca^{2+} en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Se muestra la curva de intensidad de fluorescencia normalizada por la fluorescencia inicial (F_1/F_0) para la sonda Rhod-2 como evaluación de Ca^{2+} mitocondrial estimulado por histamina. N=8 células con N de 3 por condición. **(B)** (F_1/F_0) para Fluo-4 como evaluación de Ca^{2+} citoplasmático proveniente desde el RE estimulado por histamina. N=10 células con N de 2 en condiciones Control, Doxo y N de 1 en condiciones de ABT-263 y Doxo+ABT **(C)** (F_1/F_0) para Fluo-4 como evaluación de Ca^{2+} citoplasmático proveniente desde la mitocondria estimulado con FCCP. N=11 células con N de 3 por condición. En todos los análisis se muestra control, células inducidas con doxorrubicina 250 nM (Doxo), células inducidas con ABT-263 3 μM (ABT) y células inducidas con doxorrubicina y ABT-263 a concentraciones previamente descritas (Doxo+ABT). Las células fueron estimuladas con 0,3 mM de histamina y 1 μM de FCCP, según corresponda. Estadística descriptiva muestra promedio de los peaks cuantificados \pm SEM. * $p \leq 0.05$, utilizando T-test para grupos comparados.

7.2.10 Caracterización de proteínas implicadas en el flujo de Ca^{2+} en células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h) incluyendo el inhibidor ABT-263

Para evaluar si el efecto ABT-263 en las dinámicas de flujos de Ca^{2+} está asociado a cambios en la expresión de proteínas involucradas en la regulación de los flujos de Ca^{2+} , en la **figura 21** se muestra que las tres isoformas de IP3R no presentaron cambios estadísticamente significativos, a excepción de IP3R1, que mostró una disminución mediante el uso de ABT-263 en condiciones de etapas tempranas de inducción de senescencia ($0,42 \pm 0,08$), en comparación a lo observado previamente solo con

doxorrubicina ($1,2 \pm 0,36$). Por otro lado, también se evidenció que no existían cambios significativos en los niveles de MCU, ni de MICU1.

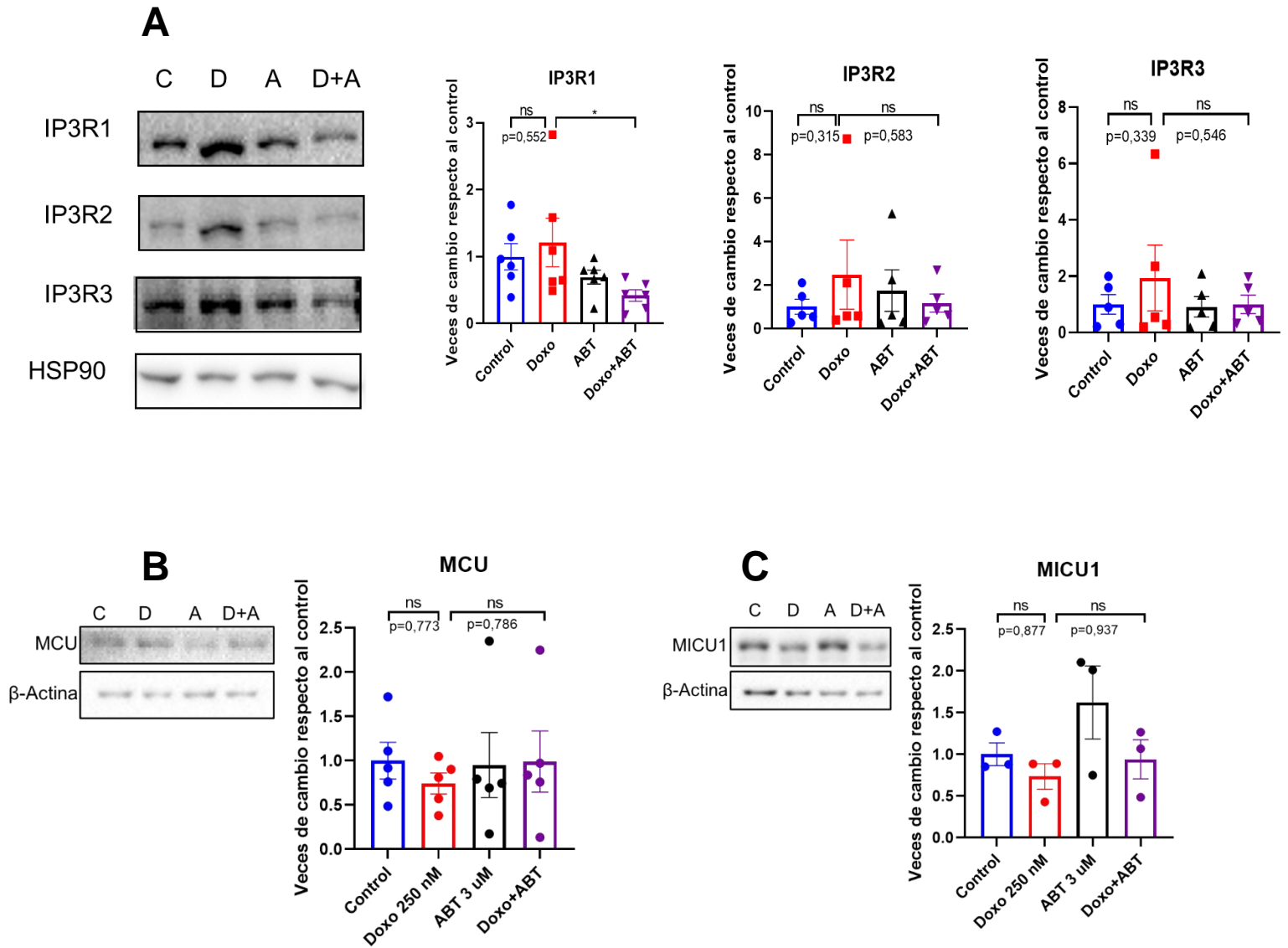


Figura 21. Cuantificación de niveles de isoformas de IP3R, MCU y MICU1 en modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Gráficos de cuantificación y normalización respecto al control de IP3R1, IP3R2, IP3R3, **(B)** MCU, y **(C)** MICU1, junto a sus imágenes representativas de Western blot, incluyendo su condición control (C: control), células inducidas con doxorrubicina (D: Doxo 250 nM), células inducidas con ABT-263 (A: ABT-263 3 μ M) y células inducidas con doxorrubicina y ABT-263 (D+A: Doxo+ABT-263 a concentraciones previamente descritas). Los datos muestran promedio \pm SEM. N=6. * $p \leq 0,05$, utilizando ANOVA y post test Sidak.

En conclusión, mediante los experimentos realizados en el objetivo 2 se pudo evaluar el rol de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1, identificando que Bcl-xL incrementa su cercanía con VDAC1 y además que los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria disminuyen en etapas tempranas de TIS. Además, se utilizó un modelo para interrumpir estructuralmente la interacción propuesta entre Bcl-xL y VDAC1, mediante el uso de un inhibidor de Bcl-xL (ABT-263) propuesto mediante *docking* molecular. Esto permitió caracterizar el rol de esta interacción en las dinámicas de flujos de Ca^{2+} al mostrar una reversión de los efectos observados en etapas tempranas de TIS.

7.3 Objetivo 3. Determinar si la interacción de Bcl-xL con VDAC1 es esencial para la viabilidad de células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h)

7.3.1 Caracterización de interferente Bcl-xL

Una vez descrito el rol de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en las dinámicas de los flujos de Ca^{2+} , específicamente en la disminución de los flujos de entrada de Ca^{2+} hacia la mitocondria mediados por VDAC1, se evaluó si esta modulación en los flujos de Ca^{2+} presentaba un rol en la viabilidad de las células IMR90 en el modelo de inducción de senescencia temprana (24 h). En primer lugar, para añadir otra alternativa de interrupción en la interacción entre Bcl-xL y VDAC1, además de la previamente descrita al utilizar ABT-263, se utilizó un interferente para Bcl-xL. Se muestra su caracterización mediante Western blot en la **figura 22**. Luego de realizar la transfección con el interferente de Bcl-xL, se observó que los niveles de la expresión de la proteína Bcl-xL muestran una tendencia a disminuir a las 24 h ($0,25 \pm 0,1$), con respecto al tiempo cero ($1,0 \pm 0,5$).

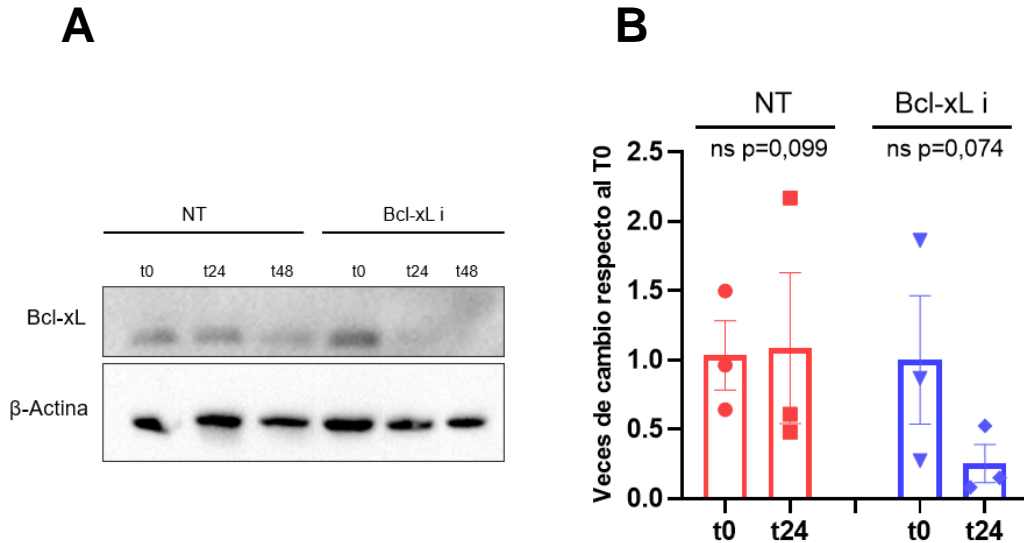


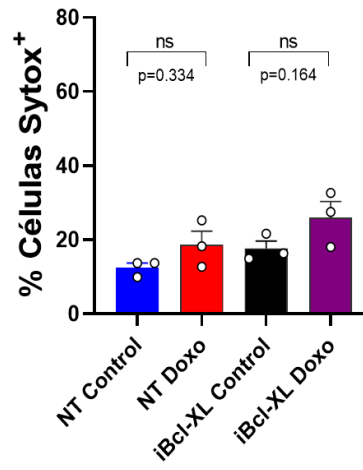
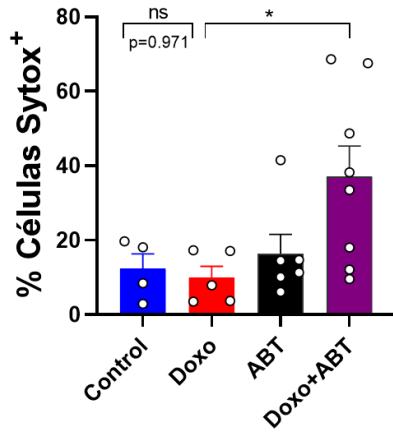
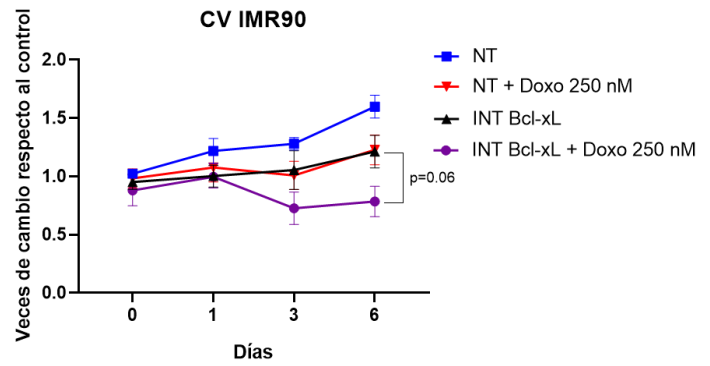
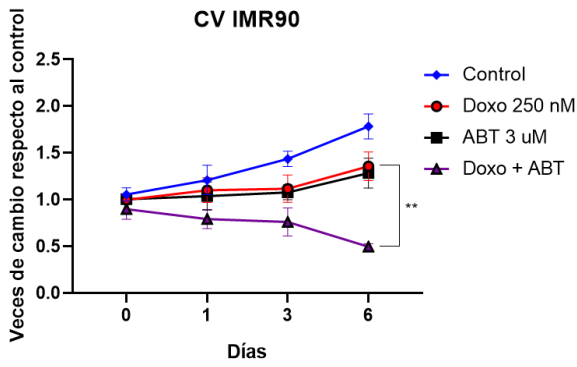
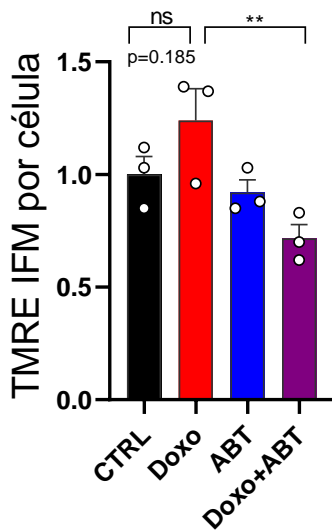
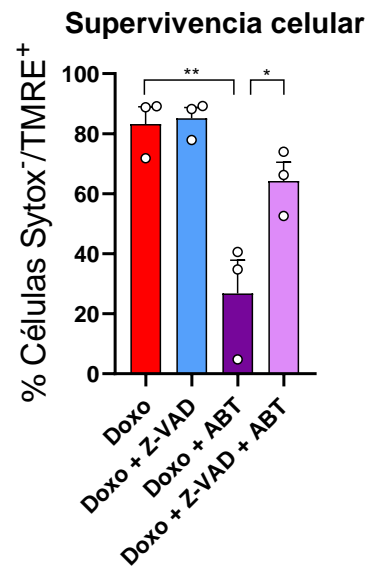
Figura 22. Cuantificación de niveles de isoformas de interferente de Bcl-xL. (A) Imágenes representativas de Western blot para Bcl-xL, incluyendo las condiciones control (NT) e interferente de Bcl-xL (Bcl-xL i) a tiempos 0, 24 y 48 h post transfección. **(B)** Gráfico de cuantificación y normalización respecto al tiempo 0. Los datos muestran promedio \pm SEM. N=3. Se usó T-test para ambos grupos.

7.3.2 Determinación de la viabilidad de células IMR90 en etapas tempranas de TIS (24 h) y su dependencia con la interacción de Bcl-xL y VDAC1 utilizando el inhibidor ABT-263

Posterior a caracterizar el interferente para Bcl-xL como otra alternativa de interrupción en la interacción entre Bcl-xL y VDAC1, se realizaron experimentos para evaluar el rol de esta interacción en la viabilidad. Se evaluó el efecto de ABT-263, como también el interferente para Bcl-xL, en conjunto con la inducción de senescencia en el modelo temprano establecido. Para esto se caracterizó la viabilidad mediante citometría de flujo utilizando SYTOX blue, una sonda de tinción de alta afinidad al ADN en células con la membrana plasmática comprometida.¹⁰¹ Se observa en la **figura 23A** que utilizar estos tratamientos combinados ya sea inducción de senescencia en conjunto con ABT-263 (24

h), o junto a la transfección de interferente para Bcl-xL (24 h), se indujo una disminución en la viabilidad. Esta diferencia fue significativa únicamente al utilizar el conjunto de doxorrubicina y ABT-263 (Porcentaje de células SYTOX positivas: 37 ± 8) con respecto a la inducción solo con doxorrubicina (Porcentaje de células SYTOX positivas: $9,9 \pm 3$). Además, se empleó un ensayo basado en la tinción con cristal violeta para evaluar densidad celular. Luego de utilizar estos tratamientos combinados ya sea inducción de senescencia en conjunto con ABT-263 (24 h), o junto a la transfección de interferente para Bcl-xL (24 h), esperando una progresión de 6 días. Se observa en la **figura 23B** que ambos tratamientos combinados utilizados sólo indujeron una tendencia a la disminución en la viabilidad, sin alcanzar significancia estadística, siendo el más cercano el uso de ABT-263 bajo inducción de senescencia temprana (unidades de absorbancia: $0,49 \pm 0,15$) con respecto al tratamiento único con doxorrubicina (unidades de absorbancia: $1,36 \pm 0,1$) con un $p=0,06$. Además de lo anterior, se evaluó el potencial mitocondrial al utilizar el inhibidor ABT-263, esto relacionado con la disminución en la viabilidad que se observó. Se utilizó la sonda TMRE para evaluar potencial mitocondrial mediante citometría de flujo. En la **figura 23C** se observa que el potencial presentó una disminución significativa en el tratamiento combinado de inducción de senescencia a etapas tempranas en conjunto con ABT-263 (MFI: $0,7 \pm 0,06$) en comparación a la inducción solo con doxorrubicina (MFI: $1,24 \pm 0,14$). Se ha descrito que la inhibición de proteínas antiapoptóticas mediante ABT-263 induce senolisis, particularmente de tipo apoptótica.⁶⁶ Por lo tanto, se realizaron experimentos para evaluar qué tipo de muerte estaría ocurriendo en nuestro fenómeno. Se realizó experimentalmente nuevas mediciones de la viabilidad mediante citometría de flujo, esta vez agregando Z-VAD, un inhibidor de pan-caspasas para dilucidar si estaba ocurriendo muerte por apoptosis. La **figura 23D** muestra que al añadir Z-VAD en conjunto con el tratamiento combinado de inducción de senescencia con el inhibidor ABT-263, se revirtió la muerte celular descrita previamente en la **figura 23A**, presentando mayor porcentaje de células vivas (SYTOX

negativas: $64,27 \pm 6,3$) con respecto al tratamiento único con doxorubicina (SYTOX negativas: $27,74 \pm 11,1$). Por lo tanto, este experimento sugiere que ABT-263 estaría interrumpiendo la interacción de Bcl-xL, revirtiendo las regulaciones en el flujo de Ca^{2+} mitocondrial, y generando muerte por apoptosis. Finalmente, la **figura 23E** muestra una caracterización de proteínas involucradas en la vía de apoptosis, PARP-1 y caspasa 3-clivada, para confirmar que está ocurriendo este proceso en células bajo tratamiento inducción de senescencia temprana en conjunto con ABT-263. Se observó una disminución de la proteína PARP-1 en la condición del tratamiento conjunto de doxorubicina y ABT-263 ($0,42 \pm 0,04$) veces con respecto al tratamiento único con doxorubicina ($1,4 \pm 0,3$), tomando valores similares a controles de muerte que se realizaron con células senescentes correspondientes al modelo de 12 días incluyendo ABT-263 2,5 y 5 μ M. Así mismo también se observó un aumento de la proteína caspasa 3-clivada con el tratamiento combinado propuesto ($5,8 \pm 2,7$), en comparación a la condición con doxorubicina ($1,4 \pm 0,3$), siendo similar también a los controles de muerte descritos.

A**B****C****D**

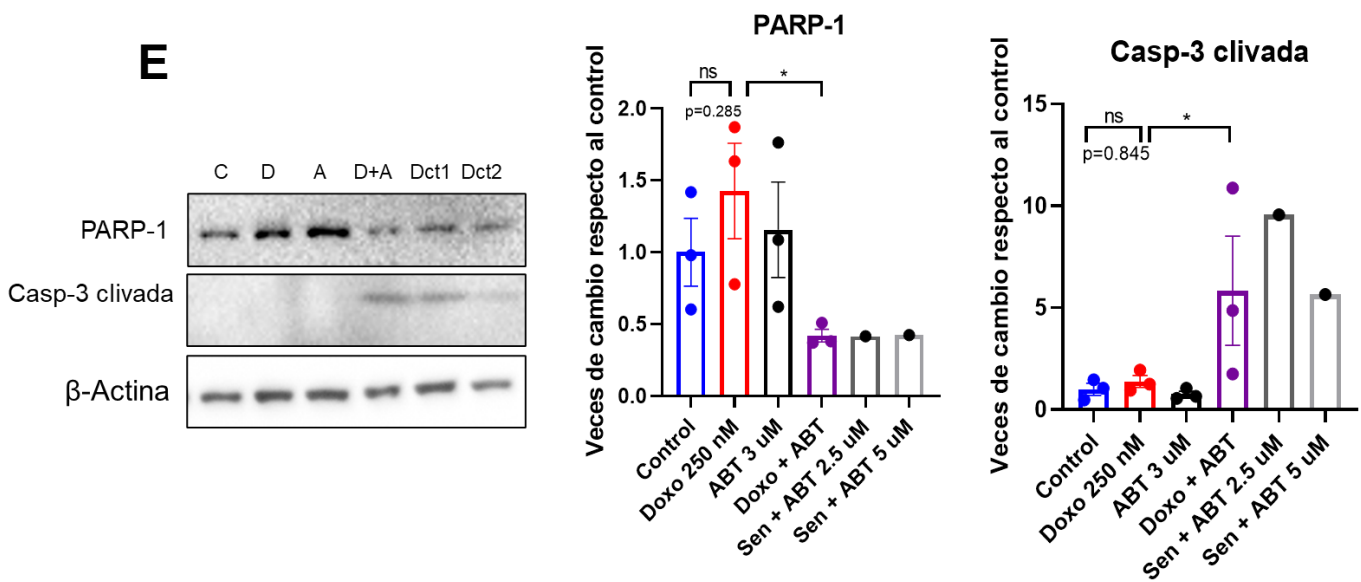


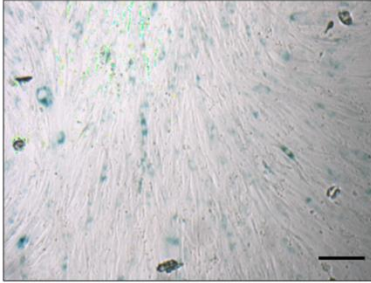
Figura 23. Disminución de niveles proteicos de Bcl-xL como también su inhibición, induce apoptosis modelo de senescencia temprana, 24 h luego de iniciado el tratamiento. (A) Citometría de flujo muestra que incrementó la muerte en etapas tempranas de TIS al tratar las células con Doxo+ABT, mientras que con siBcl-xL no presenta cambios significativos. Los datos muestran promedio \pm SEM. $N=3-8$. $*p \leq 0.05$, utilizando ANOVA y post test Sidak. **(B)** Ensayo de cristal violeta en una progresión de 6 días post inducción de TIS. al tratar las células con Doxo+ABT, disminuye la densidad celular. Además, se muestra una tendencia a la muerte con siBcl-xL. Los datos muestran promedio \pm SEM con $N=4$ y $**p \leq 0.01$, realizando el análisis comparativo en el día 6 utilizando ANOVA y post test Sidak. **(C)** MFI de TMRE medida muestra que disminuye el potencial en etapas tempranas de TIS añadiendo ABT-263. Los datos muestran promedio \pm SEM $N=3$ y $**p \leq 0.01$, utilizando ANOVA y post test Sidak. **(D)** Ensayo de supervivencia con citometría de flujo utilizando Z-VAD, inhibidor de pan-caspasas. Al tratar las células con Doxo+ABT desencadena apoptosis en etapas tempranas de TIS. Los datos muestran promedio \pm SEM. $N=3$ y $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$, utilizando ANOVA y post test Sidak. **(E)** Caracterización de proteínas involucradas en la apoptosis: PARP-1 y caspasa-3 clivada. Ambas muestran que se desencadena muerte en etapas tempranas de TIS usando ABT-263. C: control, D: doxorubicina 250 nM, A: ABT 3 μ M, D+A: doxorubicina + ABT-263 a concentraciones previamente mencionadas. Dct1: Control de muerte en modelo de senescencia 12 días utilizando ABT-263 2.5 μ M como senolítico. Dct2: Control de muerte 2, en modelo de senescencia 12 días utilizando ABT-263 5 μ M como senolítico. Los datos muestran promedio \pm SEM. $N=3$ y $*p \leq 0,05$, utilizando ANOVA y post test Sidak.

7.3.3 Determinación de marcador de senescencia celular (SA β -gal) en modelo de 12 días, incluyendo inhibidor ABT-263 e interferente de Bcl-xL

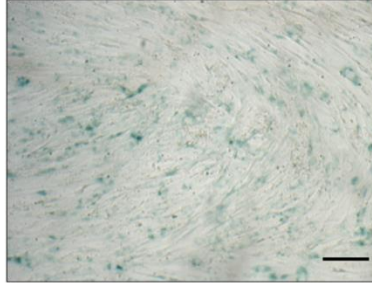
Luego de determinar el rol de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en la viabilidad celular, se realizaron experimentos para identificar si esto resultaba esencial para el desarrollo del fenotipo senescente. Por lo tanto, se utilizó el marcador de senescencia SA- β gal para identificar la progresión del fenotipo senescente en el modelo de 12 días, pero añadiendo ABT-263 o interferente para Bcl-xL en conjunto con doxorubicina al momento de inducir la senescencia por 24 h. En la **figura 24A**, se observó que el tratamiento incrementó las células positivas para SA β -gal (% de células positivas para SA β -gal: $78 \pm 0,04$) con doxorubicina en comparación al control (% de células positivas para SA β -gal: $45 \pm 0,05$) siendo este resultado no significativo. Esto último pudo ocurrir debido a que el control también presenta células positivas para SA β -gal, teniendo en cuenta que pudo ser desencadenado esto por otros factores. Por este motivo se agregó un control con todas las condiciones en el modelo de 24 h (**figura 24B**) el cual no presenta células positivas para SA β -gal, al ser este un marcador tardío.¹⁰² Por otra parte, al observar la condición de estudio ABT-263 en conjunto con doxorubicina, se observó que no quedaban células en la placa al final de los 12 días, siendo al menos una o dos las únicas que además mantenían el marcador de senescencia. Se observaron resultados similares a los descritos en la **figura 24C**, al utilizar la combinación del interferente de Bcl-xL y doxorubicina por 24 h, se observa que no hay presencia de células en la placa más que una o dos las cuales conservan el marcador.

A

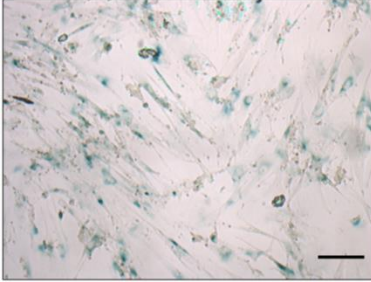
CT



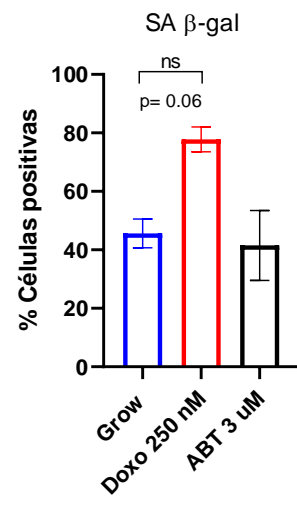
ABT



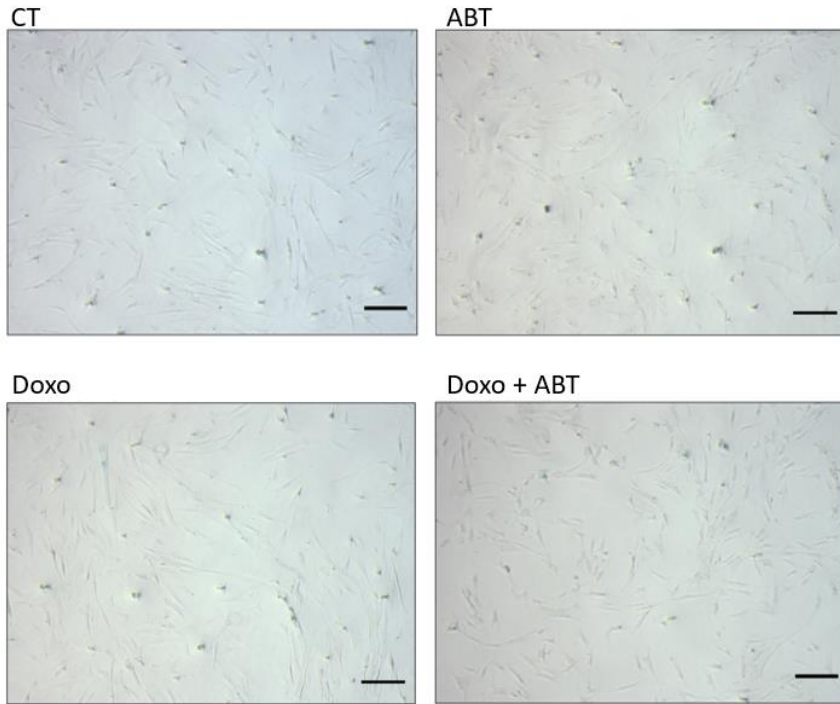
Doxo



Doxo+ABT

**B**

C



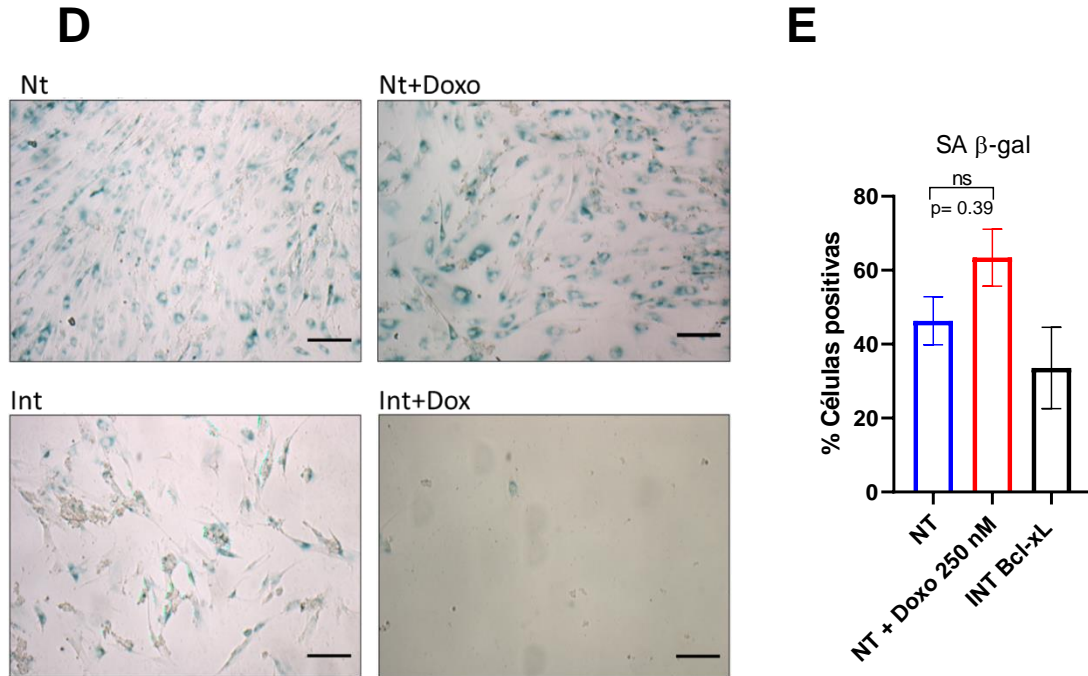


Figura 24. Cuantificación de células positivas para la tinción para SA-βGal en células IMR90 con inductores de senescencia 12 días luego de iniciado el tratamiento. Se muestran imágenes de las tinciones para: **(A)** Control (CT), células senescentes inducidas por doxorubicina 250 nM (Doxo), células inducidas con ABT-263 3 μM (ABT) y células inducidas con doxorubicina y ABT-263 a concentraciones previamente descritas (Doxo+ABT); en modelo de 12 días. **(B)** Cuantificación de A en porcentaje. **(C)** Control (CT), células senescentes inducidas por doxorubicina 250 nM (Doxo), células inducidas con ABT-263 3 μM (ABT) y células inducidas con doxorubicina y ABT-263 a concentraciones previamente establecidas (Doxo+ABT); en modelo de 24 h. **(D)** Non target (Nt), Non target + doxorubicina 250 nM (Nt+Doxo), interferente de Bcl-xL (Int) e interferente de Bcl-xL + doxorubicina 250 nM (Int+Doxo); en modelo de 12 días. **(E)** Cuantificación de D en porcentaje. Las células cuantificadas son las evidentemente azules. La barra negra en cada imagen representa una distancia de 10 μm. Se cuantificaron 100 células por cada N biológico, con un N de 3, por condición. Los datos muestran promedio ± SEM, utilizando ANOVA y post test Dunnet.

8. DISCUSIÓN

El envejecimiento de la población es un fenómeno que ha ido en incremento a nivel mundial,² siendo uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades crónicas.⁵ Uno de los sellos destacados del envejecimiento es la senescencia celular,⁹ siendo descrita la acumulación de células senescentes en los tejidos como una de las principales causas del envejecimiento.¹³ Por esta razón, se ha señalado su eliminación selectiva como uno de los principales campos de investigación respecto a la gerociencia.¹⁰³ Lograr una comprensión de los mecanismos que permiten la viabilidad de las células senescentes es trascendental para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos en la actualidad.

El fenotipo de células senescentes se caracteriza por la detención estable e irreversible del ciclo celular, junto a expresión de vías de señalización asociadas a daño al ADN, desarrollo de SASP, alteraciones morfológicas y fisiológicas, entre otras.¹⁷ Dentro de estas últimas encontramos cambios asociados a la mitocondria, particularmente el Ca^{2+} mitocondrial,¹⁰⁴ del cual se ha descrito que existe una acumulación.⁷⁴ Además, los flujos de Ca^{2+} desde el RE hacia la mitocondria cumplen un rol en la mantención de células senescentes.⁸⁴ Otra característica destacada de las células senescentes es su incremento en la expresión de proteínas antiapoptóticas. Se han identificado como esenciales para su supervivencia principalmente a aquellas pertenecientes a la familia Bcl-2: Bcl-2, Bcl-w y Bcl-xL.⁶⁶ Curiosamente la proteína Bcl-xL ha sido involucrada, en un contexto de células cancerígenas, en la regulación de la captación de Ca^{2+} mitocondrial mediada por VDAC1. Su función sería la de prevenir el desarrollo de apoptosis por sobrecarga de Ca^{2+} en la célula.⁸⁹ Este rol es desconocido en el fenotipo senescente.

8.1 Respecto al modelo celular

Para el desarrollo de este estudio, se estableció un modelo de etapas tempranas de senescencia celular inducida por quimioterapéuticos, más específicamente mediante doxorubicina durante 24 h. Es relevante mencionar que los controles utilizados correspondían a células en crecimiento, a pesar de que en la literatura también se describe como control a células quiescentes. El fundamento de utilizar células quiescentes sería su característica de arresto del ciclo celular, al igual que las células senescentes, pero sin presentar acumulación de daño en el ADN,¹⁰⁵ ni tampoco un secretoma proinflamatorio⁴². Sin embargo, la evidencia muestra que tanto la senescencia como la quiescencia comparten varias características comunes.^{106,107} Además, se ha descrito que el estado quiescente presenta una plasticidad tal que puede desencadenar senescencia.¹⁰⁸ Esto último representaría una desventaja de utilizar quiescencia como control. Es necesario considerar que, en un organismo vivo, las células no se encuentran en constante división como en una placa, y que no hay evidencia que exista una gran acumulación de células quiescentes, a pesar de que se ha descrito el fenómeno de inhibición por contacto entre ellas.¹⁰⁹ Por otro lado, otra desventaja es que para inducir el modelo de células quiescentes se requiere de privación de nutrientes, siendo este un estímulo adicional a las células, diferente a la inducción por quimioterapéuticos. Finalmente, en condiciones experimentales, las células están en constantemente división, por lo que tanto la quiescencia como la senescencia serían un posible destino celular.¹¹⁰ Por estos motivos, se decidió utilizar células en crecimiento como controles para el presente trabajo.

Para el modelo de senescencia celular a etapas tempranas, se decidió utilizar células IMR90. Este tipo celular corresponde a fibroblastos de origen pulmonar,¹¹¹ y está dentro de los modelos más ampliamente usados en la descripción de senescencia celular. Su uso es relevante debido a que es una línea celular que mantiene muchas características

de una célula normal, tales como la capacidad de inhibición por contacto y desarrollo de fenotipo senescente, conservando las principales vías de inhibición del ciclo celular, control de daño al ADN y mecanismos de reparación.¹¹²⁻¹¹⁴ A pesar de que estas células se utilizan frecuentemente como un modelo de senescencia, se debe destacar que los resultados obtenidos dentro de esta memoria deben ser extrapolados solo a fibroblastos, y más específicamente, solo a la senescencia inducida por quimioterapéuticos. Esto debido a que existe evidencia de que, a pesar de compartir características de transcriptoma y proteoma, existen diferencias en el fenotipo senescente dependiendo de los distintos tipos celulares usados, como también en la forma de inducir senescencia.^{42,115}

Sobre el uso de quimioterapéuticos como modelo de senescencia, se escogió doxorubicina debido a que existe una gran cantidad de literatura que describe su uso.^{67,116} Si bien este quimioterapéutico ha sido principalmente usado como inductor de apoptosis, la evidencia muestra que también puede actuar como inductor de senescencia, pero a concentraciones más bajas de las usadas para inducir apoptosis.¹¹⁷ Para este trabajo se utilizó una concentración de 250 nM descrita por la literatura⁶⁷. Por otro lado, es relevante el uso de doxorubicina para inducir senescencia puesto que en el laboratorio se trabaja actualmente con células de cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF7, entre otras), siendo la doxorubicina utilizada para tratamientos de este tipo de cáncer en particular.¹¹⁸ Como consecuencia, es de nuestro interés conocer su efecto como inductor de senescencia en células normales, como son los fibroblastos IMR90, destacando su origen femenino.¹¹¹ Por otro lado, también es de gran relevancia que la senescencia celular puede contribuir a los efectos adversos de la quimioterapia y a la recidiva de tumores,³⁰ por lo que es fundamental su estudio en este contexto.

En relación con el tiempo de inducción de senescencia, se estableció un modelo de etapas tempranas siendo caracterizado en las primeras 24 h de inducción con doxorubicina

(**figura 5**). Esto debido a que las células se someten a una acumulación de daño, una vez expuestas al quimioterapéutico,¹¹⁹ volviéndose relevante dilucidar los mecanismos que permiten la supervivencia celular durante las primeras horas de inducción; hecho clave en el posterior desarrollo del fenotipo senescente.

Con respecto a los marcadores utilizados al inducir senescencia a 24 h, se utilizó principalmente p21 y p53 (**figura 7**) obteniéndose resultados significativos en el modelo propuesto. Se utilizó el marcador p21 y no se incluyó p16 debido a que, según la literatura, p16 no incrementaría su transcripción durante las primeras 24 h en comparación a p21.¹²⁰ Se ha caracterizado además a p21 como un factor presente en el inicio de la senescencia, mientras que p16 permitiría la mantención del arresto del ciclo celular en etapas posteriores.³⁹ Por otra parte, hay que añadir que los marcadores se compararon con respecto a un modelo de senescencia de 12 días establecido previamente en el laboratorio (**figura 4**).

8.2 Uso de ABT-263 como disruptor de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1

En primer lugar, es necesario mencionar que se propuso para esta memoria, que Bcl-xL estaría interactuando con VDAC1, cumpliendo un rol regulatorio en los flujos de Ca^{2+} y, con ello, determinando la supervivencia celular en el desarrollo del fenotipo senescente. Varios estudios previos señalan que este mecanismo permite la supervivencia de células tumorales.⁸⁹ Debido a que las células cancerígenas expresan altos niveles de proteínas antiapoptóticas, al igual que las células senescentes,¹²¹ se sugiere que esta regulación podría permitir la resistencia a la apoptosis presente en la senescencia. Además, recientemente se describió que la inhibición de Bcl-xL, mediante ABT-263, podría redirigir el fenotipo senescente a apoptosis en células cancerígenas,⁹⁷ aportando un nuevo antecedente al presente trabajo.

Para establecer la relevancia de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en el modelo de estudio propuesto, fue necesario establecer si ocurría interacción entre estas dos proteínas. Para esto se utilizó la herramienta PLA que permitió identificar la cercanía de estas proteínas en las condiciones de inducción de senescencia en etapas tempranas (**figura 11**). Sin embargo, esta herramienta permite evidenciar proteínas en una cercanía de hasta 40 nm,¹²² pero no interacción física directa entre ambos. Esta herramienta fue la más adecuada dentro de las que se tenían en el laboratorio y colabora en entender posibles interacciones. Sin embargo, debe ser complementada con inmunoprecipitación u otra técnica que permita clarificar si existe verdaderamente interacción entre ambas proteínas.

Posterior a esto se decidió utilizar el inhibidor de Bcl-xL, ABT-263. Se escogió debido a que al actuar como inhibidor de Bcl-xL induce apoptosis, siendo un mecanismo asociado a esta la sobrecarga de Ca²⁺ a nivel mitocondrial, por lo tanto, posiblemente estaría interfiriendo con la interacción descrita entre Bcl-xL y VDAC1. Al interferir esto, se vería reflejado tanto en la localización de Bcl-xL, como en la proximidad con VDAC1, lo cual pudo describirse en las **figuras 18 y 19**. Además, la regulación de la captación de Ca²⁺ mitocondrial mediada por VDAC1 se vería alterada, siendo esto lo descrito en la investigación de Geert Bultynck y sus colaboradores.⁸⁹ Esto fue lo que efectivamente se logró dilucidar en la **figura 20**. Finalmente, y como consecuencia de esta interrupción, ocurriría una disminución en la viabilidad celular, descrito también en la **figura 22**. Lo que nos permitió caracterizar funcionalmente el rol de esta interacción en el desarrollo del fenotipo senescente.

Previo a la utilización de ABT-263 fue necesario realizar un *docking* molecular para evaluar si estructuralmente esta interrupción entre Bcl-xL y VDAC1 sería plausible. Para esto, mediante una colaboración con la Universidad de Talca junto a la Doctora Ariela Vergara y su estudiante Roberto Rosales, se estableció el modelo propuesto en la **figura**

16. En este trabajo se pudo describir que los aminoácidos potencialmente partícipes de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 correspondían a TYR101, ASN136, ARG139, LEU194 y TYR195. Estos aminoácidos estarían situados en las regiones de interacción del compuesto ABT-263. Por otra parte, resulta paradójico que en el modelo propuesto por el grupo de Geert Bultynck,⁸⁹ el dominio de interacción descrito entre Bcl-xL y VDAC1 correspondía al BH4, mientras que en el *docking* establecido en la **figura 16**, los aminoácidos claves no pertenecían a este dominio. Además, el compuesto ABT-263 se encuentra descrito como inhibidor de Bcl-xL,¹²³ siendo el dominio BH3 aledaño a los aminoácidos descritos en esta memoria. En búsqueda de una explicación, se pudo hallar en la literatura que existe otro dominio de interacción descrito entre Bcl-xL y VDAC1 entre los aminoácidos 94 al 156, caracterizado como un dominio primario de interacción.¹²⁴ En cambio, el dominio BH4 de Bcl-xL se ha descrito como clave en la regulación de la funcionalidad de VDAC1,¹²⁵ añadiendo que se ha caracterizado que su unión ocurriría mediante el N-terminal de VDAC1.¹²⁶ Hay que destacar que algunos de los aminoácidos caracterizados en esta memoria coinciden con la región de los aminoácidos caracterizados en este dominio primario de interacción. Esto podría explicar que la inhibición de Bcl-xL mediada por ABT-263 podría estar generando la interrupción entre Bcl-xL y VDAC1 mediante este dominio primario previamente descrito, y así generando los efectos de interferencia en la funcionalidad mencionados previamente. Por lo tanto, se puede inferir que la interacción primaria estaría siendo necesaria para el establecimiento de la segunda interacción mediante el dominio BH4, considerando que esta última ha sido caracterizada como esencial para la funcionalidad de VDAC1.^{89,125}

En relación con los efectos de ABT-263 en el modelo de estudio propuesto, observamos en la **figura 17** que, al tratar las células con ABT-263 en conjunto con doxorrubicina por 24 h, los niveles proteicos de Bcl-xL disminuyen, en comparación a la

inducción de senescencia temprana con doxorubicina. Esto resulta bastante curioso, puesto que podríamos atribuir algunos de los efectos observados de ABT-263 también a esta disminución basal de la proteína Bcl-xL. Ahora bien, una posible explicación de este fenómeno podría ser que ABT-263, al interrumpir la interacción entre Bcl-xL y VDAC1, generaría una liberación de la proteína Bcl-xL al citoplasma, es decir, sin unirse a la mitocondria. Esto podría inducir la degradación de Bcl-xL o su regulación de manera transcripcional o traduccional.⁶⁶

Existe una herramienta novedosa denominada PROTAC, la cual consiste en pequeñas moléculas bivalentes que reconocen a una proteína blanco que se encuentra unida a un dominio E3 ligasa.¹²⁷ Al incorporar un inhibidor de Bcl-xL (ABT-263) que marque a Bcl-xL a una E3 ligasa, esta herramienta se ha descrito como posible tratamiento anticancerígeno en casos de trombocitopenia, en los cuales se encuentra expresada mínimamente Bcl-xL en las plaquetas.¹²⁸ Así, Bcl-xL sería marcada por ABT-263 para generar su degradación. Esto aporta un antecedente para una posible función de ABT-263 asociada a la degradación de Bcl-xL, siendo esto desconocido actualmente. Por otra parte, otros estudios caracterizan que el aumento de expresión de Bcl-xL ocurriría mediante regulaciones transcripcionales como también por traducción cap-independiente.⁶⁶ Esta última podría ser inhibida en respuesta a varias formas de estrés celular.¹²⁹ Lo cual corresponde a un indicio de que ABT-263 podría estar interfiriendo con la regulación traduccional de Bcl-xL.

En la presente investigación se pudo describir por primera vez que en células normales existe esta interacción descrita entre Bcl-xL y VDAC1, además situado en un contexto de senescencia celular. Por otro lado, resulta novedoso que parte del mecanismo de senolisis mediado por ABT-263, pudiera ser esta interrupción en la interacción de Bcl-xL y VDAC1.

8.3 Sobre el rol de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en la captación de Ca²⁺ mitocondrial

Como se pudo evidenciar en la **figura 20A**, al añadir ABT-263 junto con doxorubicina, se observa un incremento en la captación de Ca²⁺ probablemente debido a la interrupción de ABT-263 en la interacción entre Bcl-xL y VDAC1. Sin embargo, ABT-263 por sí solo no genera un aumento en la captación de Ca²⁺ mitocondrial con respecto al control. Más bien, se puede observar una tendencia a la baja. Esto podría explicarse por un hallazgo encontrado en melanocitos senescentes que presentaban resistencia a tratamientos con ABT-263. En este modelo, se determinó que ABT-263 estaría incrementando la traducción mediada por mTOR de otra proteína antiapoptótica, Mcl-1.¹³⁰ Esta proteína ha sido descrita previamente con un rol inhibitorio de las señalizaciones de Ca²⁺ hacia la mitocondria, sin alterar la expresión de IP3R.¹³¹ Por lo tanto, este resultado podría representar un efecto alternativo que genera ABT-263 en células en crecimiento.

Por otro lado, se puede observar en la **figura 20C** que, al utilizar ABT-263 en conjunto con doxorubicina, existe una disminución significativa de la liberación de Ca²⁺ mitocondrial inducida por FCCP. Esto resulta contradictorio considerando que se había observado un aumento significativo en la captación de Ca²⁺ mitocondrial bajo esta misma condición en la **figura 20A**. Algo a considerar es que las células estimuladas con ABT-263 en conjunto con doxorubicina presentaban heterogeneidad al momento de realizar el experimento, puesto que a las 24 h de estos estímulos ya existía muerte celular. Este hecho quedó evidenciado mediante las citometrías y los ensayos cristal violeta de las **figuras 23A y 23B**. Por este motivo, se puede inferir que las mediciones de los flujos de Ca²⁺ para esas condiciones también resultarían heterogéneas. Como se mencionó anteriormente, al estar ocurriendo muerte celular luego de 24 h de inducción de senescencia por doxorubicina en conjunto a ABT-263, se consideró que el potencial mitocondrial estaría disminuyendo en

aquellas células.¹³² Por lo tanto, se planteó caracterizar esta posibilidad de manera global mediante citometría de flujo con la sonda TMRE (**figura 23C**). Los resultados sugieren que este fenómeno podría ser un indicador de que los flujos de Ca^{2+} disminuidos podrían deberse a una caída del potencial mitocondrial¹³³ en tiempos previos al estímulo con FCCP.

Por otra parte, también es necesario mencionar que la proteína de interés Bcl-xL, ha sido descrita con un rol inhibitorio de IP3R, para evitar la apoptosis por sobrecarga de Ca^{2+} en células cancerígenas.⁸⁷ Por otro lado, también se ha descrito que Bcl-xL podría generar una sensibilización de IP3R, generando oscilaciones de Ca^{2+} asociadas a la supervivencia celular.⁹¹ Sin embargo, en la **figura 21A** se observa que no hay cambios significativos de las isoformas de IP3R. Además, en la **figura 20B** se observa que los flujos de Ca^{2+} mediados por IP3R inducidos por histamina, no cambian en la condición de inducción de senescencia a etapas tempranas, en las cuales se describió un aumento de Bcl-xL con respecto al control (**figura 10A**). Por lo tanto, es posible sugerir que Bcl-xL no estaría inhibiendo IP3R, al menos bajo estas condiciones. De cualquier forma, se hace necesario estudiar la interacción entre Bcl-xL e IP3R para dar información complementaria a los ensayos funcionales.

Finalmente, para refinar la investigación, podría generarse la inhibición directa de VDAC1 y evaluar los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria en el modelo de inducción de senescencia temprana. De este modo este experimento permitiría evaluar la implicancia de VDAC1 en los flujos de Ca^{2+} que ingresan a la mitocondria. Siguiendo esta misma idea, sería posible impedir la interacción funcional entre VDAC1 y Bcl-xL utilizando un péptido sintético del N-terminal de VDAC1, de esta forma interrumpiendo la actividad inhibitoria de Bcl-xL sobre VDAC1 y estableciendo el rol fundamental de esta interacción.⁸³

Por otro lado, como control también sería posible inhibir IP3R mediante Xestospongina B,¹³⁴ nuevamente para confirmar que la salida de Ca²⁺ que identificamos experimentalmente proviene de IP3R.

8.4 Sobre el rol de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en la supervivencia celular

Con respecto a los experimentos de muerte celular presentados en las **figuras 23A y 23B**, se pudo caracterizar que la interrupción de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1, mediante inhibición de Bcl-xL con ABT-263, desencadena en muerte celular en el modelo de inducción de senescencia temprana. Por otro lado, con respecto al uso del interferente de Bcl-xL, se puede observar una tendencia a la muerte solamente en la **figura 23B**, al realizar la comparación de los resultados en el día 6, mas no en la **figura 23A** en la cual el resultado no es significativo. Es importante considerar que ABT-263 no es selectivo para Bcl-xL. Pese a presentar una alta afinidad por esta proteína, es capaz de unirse también a Bcl-2 y presentar uniones más débiles con otras proteínas tales como Bcl-w y Mcl-1.¹³⁵ Esto sugiere que Bcl-xL por sí solo no sería suficiente para generar una muerte significativa a las 24 h de inducción de senescencia. Debido a que se alcanzó la significancia solamente al utilizar ABT-263, posiblemente este inhibidor estaría interactuando con otra proteína antiapoptótica clave. Con respecto a esto último, se ha caracterizado previamente que la inhibición conjunta de Bcl-xL y Bcl-w por ABT-737, induciría apoptosis en células senescentes.⁶⁶ Por esta razón una posibilidad sería que ABT-263 podría actuar inhibiendo ambas proteínas, siendo estas relevantes en la supervivencia y posterior desarrollo de células senescentes.

El tipo de muerte atribuido a estos resultados experimentales fue la apoptosis.¹³⁶ El experimento clave que permitió dilucidar esto fue el de la **figura 23D**, al utilizar Z-VAD como inhibidor de pan-caspasas, lo cual revirtió la muerte celular inducida por ABT-263 en

conjunto a doxorubicina por 24 h. Para complementar la información entregada por la **figura 23**, un experimento posible a realizar sería detectar la liberación del citocromo c, aportando una mejor caracterización de la apoptosis mediada por vía intrínseca en el modelo propuesto.⁵⁹ Además también se requiere descartar vías necroptóticas, considerando que este tipo de muerte celular también es dependiente de caspasas.¹³⁷

Por otra parte, los ensayos de SA β -gal de la **figura 24**, reflejan que la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 es clave para la regulación de la captación de Ca^{2+} mitocondrial mediada por VDAC1, lo cual permite la supervivencia celular y el desarrollo del fenotipo senescente. Si esta interacción es interrumpida por ABT-263, la progresión del fenotipo se redirige a apoptosis. En la **figura 24A** es posible observar que, al utilizar ABT-263 en la condición de inducción de senescencia temprana por 24 h y luego esperar 12 días de progresión, las células mueren casi en su totalidad. Esto sugiere que gran parte de estas sufrieron apoptosis (**figura 23A**). Curiosamente, al utilizar el interferente de Bcl-xL al momento de inducir senescencia, como se muestra en la **figura 24C**, también puede observarse que luego de los 12 días ya casi no se encontraron células en la placa. Esto último entrega indicios de que Bcl-xL podría estar cumpliendo un rol relevante en la progresión del fenotipo senescente en el modelo de 12 días.

De forma interesante, se puede observar que el marcador de SA β -gal se encuentra cercano a la significancia, para inducción de senescencia en modelo de 12 días, con respecto al control; como también, que las células control dan positivo para este marcador (**figura 24A**). Este hecho puede explicarse debido a que las células se mantuvieron proliferando durante 12 días, lo cual pudo desencadenar en inhibición por contacto y posterior quiescencia.¹⁰⁹ Este fenómeno también puede dar positivo para SA β -gal ya sea en células quiescentes inducidas por privación de nutrientes o desencadenada por una alta confluencia.⁴⁶ Por esta razón, es relevante la incorporación de controles a las 24 h (**figura**

24B). Además, es posible observar que las células tanto Nt como interferentes de Bcl-xL también dan positivo para el marcador SA β -gal, ya sea debido a los efectos de la confluencia o por la posible implicancia de Bcl-xL en el mantenimiento de la integridad celular (**figura 24C**).

Se puede concluir con esta memoria, que se estableció el rol esencial de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 para la sobrevivencia celular en el contexto de senescencia temprana (24 h), puesto que al interrumpir esta interacción al utilizar un inhibidor de Bcl-xL (ABT-263), se genera disminución en la viabilidad de las células. Además, si se evalúa la progresión del fenotipo senescente bajo estas mismas condiciones en el modelo de 12 días, se describió que las células al disminuir su viabilidad no son capaces de desarrollar el fenotipo puesto que se encuentran en apoptosis según lo expuesto en la **figura 23**. Esto último incluyendo además el uso de un interferente de Bcl-xL. Por lo tanto, se puede establecer la posibilidad de redirigir el destino de la senescencia en etapas tempranas, a un desarrollo de apoptosis, mediante la interrupción de la interacción propuesta entre Bcl-xL y VDAC1 (**figura 25**). Esto resulta clave para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos de senolisis, en contextos bajo los cuales se requiera evitar la acumulación de células senescentes; como por ejemplo bajo tratamientos quimioterapéuticos, siendo una posibilidad de optimizar aquellos tratamientos.

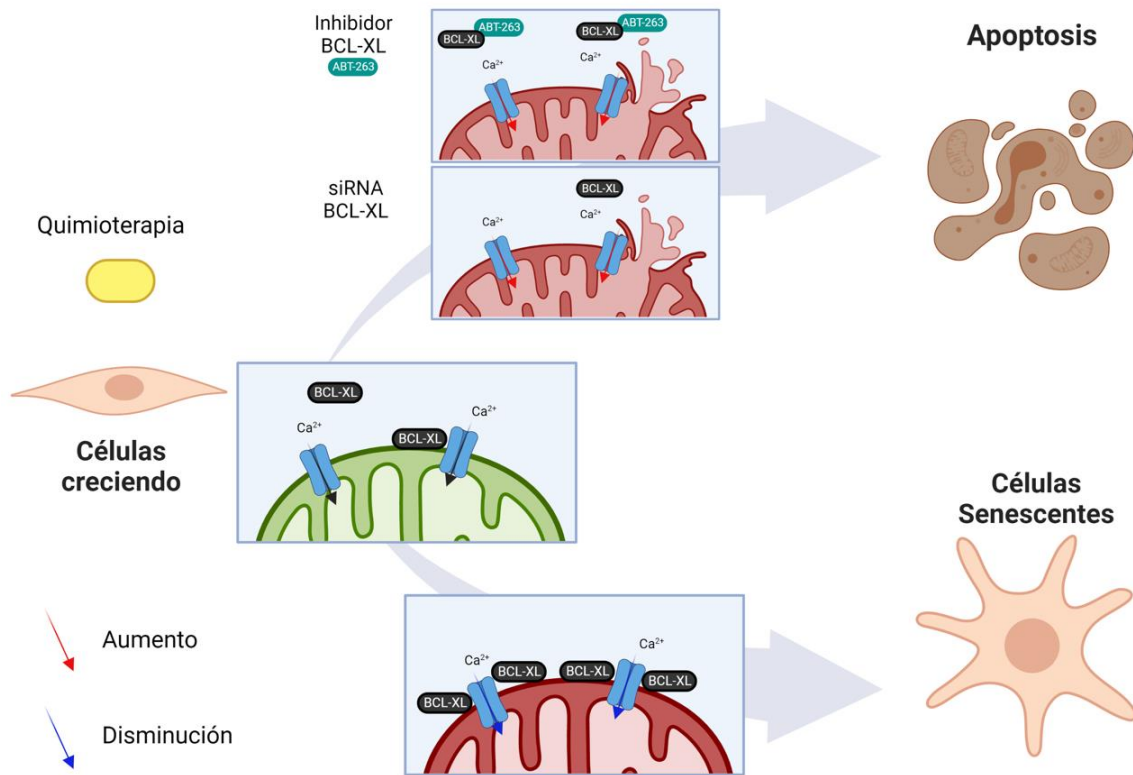


Figura 25. Esquema representativo del rol de la interacción entre Bcl-xL con VDAC1 en la progresión del fenotipo senescente. Según el modelo de inducción de senescencia temprana propuesto, la interacción entre Bcl-xL y VDAC1 es clave para la regulación de la captación de Ca^{2+} mitocondrial mediada por VDAC1 lo cual permite la supervivencia celular y el desarrollo del fenotipo senescente. Si esta interacción es interrumpida, ya sea por uso de inhibidores o interferentes de Bcl-xL, la progresión del fenotipo se estaría redirigiendo a apoptosis.

9. PROYECCIONES

En primer lugar, es de relevancia generar una caracterización completa de las proteínas asociadas a los flujos de Ca^{2+} mitocondriales. Para ello se requiere evaluar NCLX (intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial) mediante Western blot, en el modelo de senescencia temprana, para descartar que los resultados obtenidos en esta memoria no están siendo mediados por cambios en su expresión. Además, se deben evaluar las razones de MICU1/MCU por Western blot, considerando que se ha descrito que la estequiometría de estas proteínas corresponde a un parámetro determinante en el umbral para la captación de Ca^{2+} mitocondrial.¹³⁸ Esto podría evaluarse tanto en el modelo senescente de 24 h como en el modelo de 12 días para determinar si la regulación de los flujos de Ca^{2+} depende de diversos mecanismos según la temporalidad del establecimiento del fenotipo senescente. Como control mitocondrial se añadirá también Western blot de TFAM.¹³⁹

Por otra parte, la acumulación previa de Ca^{2+} mitocondrial puede ser otra razón para la disminución de flujo de Ca^{2+} hacia la mitocondria a las 24 h de inducción de senescencia. Para probar esta posibilidad se podría evaluar, mediante microscopía electrónica, la presencia de cristales de hidroxapatita en las mitocondrias; siendo éstas estructuras en las cuales se encuentra Ca^{2+} mitocondrial precipitado junto a fosfato inorgánico.¹⁴⁰

También se puede desarrollar la evaluación de la cercanía entre IP3R – VDAC1 mediante el ensayo PLA a 24 h y 12 días post inducción de senescencia, para identificar si IP3R juega un rol en la regulación de la captación de Ca^{2+} mitocondrial, de manera espacial.

Siguiendo con esta idea, sería interesante evaluar cómo estarían los contactos RE-mitocondria en el modelo de estudio mediante la herramienta SPLICS,¹⁴¹ para identificar si están más o menos favorecidos y establecer un posible correlato entre este antecedente y las dinámicas en los flujos de Ca^{2+} . Agregando que estas mediciones también se realizarán

mediante análisis de distancia y perímetro, correspondientes a imágenes de microscopías electrónicas bajo nuestras condiciones experimentales.

Con respecto al estudio de interacción entre Bcl-xL y VDAC1, se realizarán las inmunoprecipitaciones correspondientes para obtener un resultado más concreto. Por otra parte, algo a considerar en nuestro modelo propuesto es el incremento de Bcl-xL a etapas tempranas de inducción de senescencia (24 h), siendo necesario también caracterizarla en el modelo de 12 días para evaluar su temporalidad. Debido a que genera un incremento a tiempos cortos, se ha planteado la idea de que su regulación estaría determinada por los flujos de Ca^{2+} de entrada hacia la mitocondria. Esta regulación temprana podría ser de tipo traduccional o transcripcional, siendo descrito en la literatura que Bcl-xL presenta mayores niveles de regulación traduccional cap-independiente.⁶⁶ Una alternativa, sería una posible regulación traduccional mediada por la interacción dependiente de Ca^{2+} , entre calmodulina y la subunidad 80S de los ribosomas.¹⁴² Una herramienta para evaluar esto, sería realizar pulsos de puromicina en paralelo a nuestro estímulo de inducción de senescencia con doxorrubicina. De este modo, se obtendrían péptidos de Bcl-xL puromicilados, los cuales se podrían seleccionar mediante inmunoprecipitación y finalmente detectar mediante Western blot para anti-puromicina.¹⁴³

Finalmente, el establecimiento del *docking* molecular entre Bcl-xL y VDAC1 otorga muchas ventajas y posibilidades experimentales, en las cuales se tiene contemplado, además de identificar los aminoácidos clave en la interacción primaria establecida entre Bcl-xL y VDAC1,¹²⁴ establecer también los aminoácidos clave en la interacción descrita como funcional entre el dominio BH4 y el N-terminal de VDAC1.^{125,126} De este modo se podría generar una mutante de ese sitio de interacción, inhibiendo la actividad del canal mas no la interacción primaria de estas proteínas. También se adquirirá un péptido sintético del N-terminal de VDAC1,¹²⁶ en base a la misma idea anterior, para generar una inhibición

alternativa de Bcl-xL con respecto a su funcionalidad, sin interrumpir su interacción primaria con VDAC1. El uso de estas herramientas será relevante para establecer la posibilidad de nuevas estrategias farmacológicas para el desarrollo de senolíticos.

Algo interesante que se halló en la literatura fue que VDAC1 posee dominios de unión a Ca^{2+} .¹⁴⁴ Teniendo en cuenta esto, se desarrollará una mutante en estos dominios de unión a Ca^{2+} para caracterizar si estos influyen en la interacción entre Bcl-xL y VDAC1. Además, considerando que se describió que el N-terminal de VDAC1 es el dominio que estaría en contacto con Bcl-x,¹²⁵ y que VDAC1 requiere de una translocación para exponer este dominio al exterior del poro,¹⁴⁵ esta estrategia experimental permitiría establecer si el Ca^{2+} estaría involucrado en esta translocación que permitiría una posterior interacción con Bcl-xL.

10. CONCLUSIONES

- Bcl-xL incrementa su expresión, su colocalización con la mitocondria y su proximidad con VDAC1 en etapas tempranas de TIS.
- El Ca^{2+} mitocondrial incrementa en etapas tempranas de TIS, mientras que el flujo de Ca^{2+} hacia la mitocondria se ve disminuido. Esto podría estar relacionado con un mecanismo de supervivencia celular, evitando una muerte por sobrecarga de Ca^{2+} .
- ABT-263 revierte los efectos de doxorubicina en etapas tempranas de TIS, incluyendo una modificación de los flujos de Ca^{2+} hacia la mitocondria mostrando un incremento de estos. Por lo tanto, es posible relacionar este incremento en los flujos de Ca^{2+} con la interrupción de la interacción de Bcl-xL con VDAC1 generada por ABT-263. La probabilidad de esto se testeó mediante un docking molecular de estas estructuras.
- La interrupción de la interacción entre Bcl-xL y VDAC1, al inhibir Bcl-xL con ABT-263, reduce la viabilidad de células en etapas tempranas de TIS y por lo tanto previene la aparición del fenotipo senescente.
- **Finalmente se puede concluir que se aprueba la hipótesis propuesta: “La interacción entre Bcl-xL y VDAC1 en etapas tempranas de TIS inducida por doxorubicina en células IMR90 genera una disminución en la captación de Ca^{2+} mitocondrial, permitiendo la supervivencia de las células y el establecimiento del fenotipo senescente”.**

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Naciones Unidas. Estudio Económico y Social Mundial 2007.
2. World Population Prospects The 2017 Revision.
3. Nacional Estadísticas, I. DE. SÍNTESIS DE RESULTADOS CENSO 2017. (2018).
4. Leiva, A. M. *et al.* Personas mayores en Chile: el nuevo desafío social, económico y sanitario del Siglo XXI. *Rev. Med. Chil.* **148**, 799–809 (2020).
5. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194 (2013).
6. Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud resumen.
7. Albala, C. EL ENVEJECIMIENTO DE LA POBLACIÓN CHILENA Y LOS DESAFÍOS PARA LA SALUD Y EL BIENESTAR DE LAS PERSONAS MAYORES. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **31**, 7–12 (2020).
8. Gardner, T. S. The Biology of Senescence. Alex Comfort. Rinehart, New York, 1956. xiii + 257 pp. \$4. *Science* (80-.). **124**, 446–446 (1956).
9. Varela-Eirín, M. & Demaria, M. Cellular senescence. *Curr. Biol.* **32**, R448–R452 (2022).
10. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* **28**, 436–453 (2018).
11. Storer, M. *et al.* XSenescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119 (2013).
12. Khosla, S., Farr, J. N., Tchkonja, T. & Kirkland, J. L. The role of cellular senescence

- in ageing and endocrine disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2020 165 **16**, 263–275 (2020).
13. Xu, M. *et al.* Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.* 2018 248 **24**, 1246–1256 (2018).
 14. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16 Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. (2011) doi:10.1038/nature10600.
 15. Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J. & Robbins, P. D. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J.* (2022) doi:10.1111/FEBS.16350.
 16. Niedernhofer, L. J. & Robbins, P. D. Senotherapeutics for healthy ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018 175 **17**, 377–377 (2018).
 17. Gorgoulis, V. *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *João F. Passos* **15**, 14 (2019).
 18. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nat.* 2006 4447119 **444**, 638–642 (2006).
 19. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).
 20. Victorelli, S. & Passos, J. F. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* **21**, 14–20 (2017).
 21. Ben-Porath, I. & Weinberg, R. A. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **113**, 8–13 (2004).
 22. Han, J. *et al.* ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* **15**, 481 (2013).

23. Zheng, L. *et al.* Fumarate induces redox-dependent senescence by modifying glutathione metabolism. *Nat. Commun.* 2015 61 **6**, 1–12 (2015).
24. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev.* **24**, 2463–2479 (2010).
25. Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J. & Van Deursen, J. M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy HHS Public Access. *Nat Med* **21**, 1424–1435 (2015).
26. Wu, P. C., Wang, Q., Grobman, L., Chu, E. & Wu, D. Y. Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy. *Exp. Oncol.* **34**, 298–305 (2012).
27. Lozano-Torres, B. *et al.* The chemistry of senescence. *Nat. Rev. Chem.* 2019 37 **3**, 426–441 (2019).
28. Wyld, L. *et al.* Senescence and cancer: A review of clinical implications of senescence and senotherapies. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–20 (2020).
29. Borkowska, A. *et al.* High Hemin Concentration Induces Escape from Senescence of Normoxic and Hypoxic Colon Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. **14**, (2022).
30. Demaria, M. *et al.* Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov.* **7**, 165–176 (2017).
31. Chang, J. *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* 2015 221 **22**, 78–83 (2015).
32. Celeste, A. *et al.* Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science (80-.)*. **296**, 922–927 (2002).
33. Oda, T. *et al.* DNA damage-induced cellular senescence is regulated by 53BP1 accumulation in the nuclear foci and phase separation. *Cell Prolif.* 1–12 (2023)

doi:10.1111/cpr.13398.

34. Pospelova, T. V. *et al.* Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle* **8**, 4112–4118 (2009).
35. Khosla, S., Farr, J. N. & Kirkland, J. L. Inhibiting Cellular Senescence: A New Therapeutic Paradigm for Age-Related Osteoporosis. (2018) doi:10.1210/jc.2017-02694.
36. Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 397–408 (2015).
37. Eronique Gire, V. & Duli C, V. Senescence from G2 arrest, revisited. (2015) doi:10.1080/15384101.2014.1000134.
38. Beauséjour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222 (2003).
39. Ito, Y., Hoare, M. & Narita, M. Spatial and Temporal Control of Senescence. *Trends Cell Biol.* **27**, 820–832 (2017).
40. Calls, A. *et al.* Cisplatin-induced peripheral neuropathy is associated with neuronal senescence-like response. *Neuro. Oncol.* **23**, 88–99 (2021).
41. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. doi:10.1371/journal.pbio.0060301.
42. Basisty, N. *et al.* A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol.* **18**, e3000599 (2020).
43. Cevenini, E., Monti, D. & Franceschi, C. Inflamm-ageing. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **16**, 14–20 (2013).

44. Freund, A., Laberge, R. M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2066–2075 (2012).
45. Davalos, A. R. *et al.* p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J. Cell Biol.* **201**, 613–629 (2013).
46. Cho, S. & Hwang, E. S. Status of mTOR Activity May Phenotypically Differentiate Senescence and Quiescence. *Mol. Cells* **33**, 597–604 (2012).
47. Zhang, W. *et al.* Role of Lysosomal Acidification Dysfunction in Mesenchymal Stem Cell Senescence. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 128 (2022).
48. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195 (2006).
49. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–9367 (1995).
50. Correia-Melo, C. & Passos, J. F. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1847**, 1373–1379 (2015).
51. Tai, H. *et al.* Autophagy impairment with lysosomal and mitochondrial dysfunction is an important characteristic of oxidative stress-induced senescence. *Autophagy* **13**, 99–113 (2017).
52. Passos, J. F. *et al.* Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* **5**, 1138–1151 (2007).
53. Lee, S. *et al.* Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J. Biol. Chem.* **282**, 22977–22983 (2007).
54. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 621–632 (2010).

55. Yuan, S. & Akey, C. W. Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. *Structure* **21**, 501–515 (2013).
56. Saurabh, K. *et al.* Dissecting the in vivo leukemogenic potency of BCLxl. *J. Leuk. (Los Angeles, Calif.)* **2**, 158 (2014).
57. Luna-Vargas, M. P. A. & Chipuk, J. E. The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane. *FEBS J.* **283**, 2676–2689 (2016).
58. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014 151 15**, 49–63 (2013).
59. Soto-Gamez, A., Quax, W. J. & Demaria, M. Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions. *J. Mol. Biol.* **431**, 2629–2643 (2019).
60. Sarosiek, K. A. & Letai, A. Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics – recent successes, current challenges and future promise. *FEBS J.* 3523–3533 (2016) doi:10.1111/FEBS.13714.
61. García-Sáez, A. J. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ.* **19**, 1733–1740 (2012).
62. Abu-Hamad, S. *et al.* The VDAC1 N-terminus is essential both for apoptosis and the protective effect of anti-apoptotic proteins. *J. Cell Sci.* **122**, 1906–1916 (2009).
63. Morris, J. L., Gillet, G., Prudent, J. & Popgeorgiev, N. Molecular Sciences Bcl-2 Family of Proteins in the Control of Mitochondrial Calcium Signalling: An Old Chap with New Roles. (2021) doi:10.3390/ijms22073730.
64. Gabellini, C., Trisciuglio, D. & Bufalo, D. Del. Non-canonical roles of Bcl-2 and Bcl-

- xL proteins: Relevance of BH4 domain. *Carcinogenesis* **38**, 579–587 (2017).
65. Kale, J., Osterlund, E. J. & Andrews, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018 251 **25**, 65–80 (2017).
 66. Yosef, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* 2016 71 **7**, 1–11 (2016).
 67. Hernandez-Segura, A. *et al.* Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr. Biol.* **27**, 2652-2660.e4 (2017).
 68. Robbins, P. D. *et al.* Senolytic Drugs: Reducing Senescent Cell Viability to Extend Health Span. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-050120-105018> **61**, 779–803 (2021).
 69. Rossi, A., Pizzo, P. & Filadi, R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1866**, 1068–1078 (2019).
 70. Gellerich, F. N. *et al.* The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1797**, 1018–1027 (2010).
 71. Glancy, B. & Balaban, R. S. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* **51**, 2959–2973 (2012).
 72. Kowaltowski, A. J. *et al.* Mitochondrial morphology regulates organellar Ca²⁺ uptake and changes cellular Ca²⁺ homeostasis. *FASEB J.* **33**, 13176–13188 (2019).
 73. Cardenas, C. *et al.* Cancer cells with defective oxidative phosphorylation require endoplasmic reticulum-to-mitochondria Ca²⁺ transfer for survival. *Sci. Signal.* **13**, (2020).
 74. Wiel, C. *et al.* Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads

- to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat. Commun.* 2014 51 **5**, 1–10 (2014).
75. Csordás, G., Weaver, D. & Hajnóczky, G. Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends Cell Biol.* **28**, 523–540 (2018).
 76. Giacomello, M. & Pellegrini, L. The coming of age of the mitochondria–ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* 2016 239 **23**, 1417–1427 (2016).
 77. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 139 **13**, 566–578 (2012).
 78. Williams, G. S. B., Boyman, L., Chikando, A. C., Khairallah, R. J. & Lederer, W. J. Mitochondrial calcium uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 10479–10486 (2013).
 79. De Stefani, D., Rizzuto, R. & Pozzan, T. Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034216> **85**, 161–192 (2016).
 80. Mammucari, C., Gherardi, G. & Rizzuto, R. Structure, Activity Regulation, and Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Health and Disease. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
 81. Sánchez-Vázquez, V. H. *et al.* Heterogeneity of the endoplasmic reticulum Ca(2+) store determines colocalization with mitochondria. *Cell Calcium* **109**, 102688 (2023).
 82. Borodkina, A. V. *et al.* Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Aging (Albany NY)* **8**, 3400 (2016).
 83. van Vliet, A. R., Verfaillie, T. & Agostinis, P. New functions of mitochondria associated

- membranes in cellular signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 2253–2262 (2014).
84. Ziegler, D. V. *et al.* Calcium channel ITPR2 and mitochondria–ER contacts promote cellular senescence and aging. *Nat. Commun.* 2021 121 **12**, 1–12 (2021).
 85. Tse, C. *et al.* ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor. *Cancer Res.* **68**, 3421–3428 (2008).
 86. Zhu, Y. *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* **15**, 428–435 (2016).
 87. Rosa, N. *et al.* Bcl-xL acts as an inhibitor of IP3R channels, thereby antagonizing Ca²⁺-driven apoptosis. *Cell Death Differ.* 2021 294 **29**, 788–805 (2021).
 88. Rong, Y. P. *et al.* Targeting Bcl-2-IP3 Receptor Interaction to Reverse Bcl-2's Inhibition of Apoptotic Calcium Signals. *Mol. Cell* **31**, 255–265 (2008).
 89. Monaco, G. *et al.* The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of pro-apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **290**, 9150–9161 (2015).
 90. Huang, H. *et al.* An Interaction between Bcl-x L and the Voltage-dependent Anion Channel (VDAC) Promotes Mitochondrial Ca²⁺ Uptake *. (2013) doi:10.1074/jbc.M112.448290.
 91. White, C. *et al.* The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-XL modulation of the InsP3R. *Nat. Cell Biol.* 2005 710 **7**, 1021–1028 (2005).
 92. Vervliet, T. *et al.* Modulation of Ca²⁺ signaling by anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 proteins at the endoplasmic reticulum-mitochondrial interface. *Front. Oncol.* **7**, 75 (2017).

93. Kanemaru, K., Suzuki, J., Taiko, I. & Iino, M. Red fluorescent CEPIA indicators for visualization of Ca²⁺ dynamics in mitochondria. *Sci. Reports* 2020 101 **10**, 1–9 (2020).
94. Ahumada-Castro, U. Postdoctoral project: BCL-XL/BCL-W REGULATES MITOCHONDRIAL CA²⁺ UPTAKE AS SURVIVAL MECHANISM IN THERAPY-INDUCED SENESENCE AND THERAPY-INDUCED SENESENCE-LIKE PHENOTYPE. at (2021).
95. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & Deursen, J. M. van. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–1153 (2014).
96. Aneillas, C. *et al.* Early SRC activation skews cell fate from apoptosis to senescence. *Sci. Adv.* **8**, 756 (2022).
97. Bharti, V. *et al.* BCL-xL inhibition potentiates cancer therapies by redirecting the outcome of p53 activation from senescence to apoptosis. *Cell Rep.* **41**, (2022).
98. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods* 2022 196 **19**, 679–682 (2022).
99. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nat.* 2021 5967873 **596**, 583–589 (2021).
100. Capell, B. C. *et al.* MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. *Genes Dev.* **30**, 321–336 (2016).
101. Park, D. *et al.* Noninvasive imaging of cell death using an Hsp90 ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 2832–2835 (2011).
102. Severino, J., Allen, R. G., Balin, S., Balin, A. & Cristofalo, V. J. Is β -Galactosidase

- Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Exp. Cell Res.* **257**, 162–171 (2000).
103. Calimport, S. R. G. *et al.* To help aging populations, classify organismal senescence. *Science (80-.)*. **366**, 576–578 (2019).
104. Martin, N. & Bernard, D. Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium* **70**, 16–23 (2018).
105. Matsumoto, M. *et al.* Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *J. Cell Sci.* **120**, 1104–1112 (2007).
106. Leontieva, O. V. & Blagosklonny, M. V. Gerosuppression in confluent cells. *Aging (Albany NY)* **6**, 1010 (2014).
107. Ogrodnik, M., Salmonowicz, H., Jurk, D. & Passos, J. F. Expansion and Cell-Cycle Arrest: Common Denominators of Cellular Senescence. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 996–1008 (2019).
108. Fujimaki, K. & Yao, G. Cell dormancy plasticity: Quiescence deepens into senescence through a dimmer switch. *Physiol. Genomics* **52**, 558–562 (2020).
109. Marthandan, S. *et al.* Long-Term Quiescent Fibroblast Cells Transit into Senescence. *PLoS One* **9**, e115597 (2014).
110. Terzi, M. Y., Izmirlı, M. & Gogebakan, B. The cell fate: senescence or quiescence. *Mol. Biol. Rep.* **43**, 1213–1220 (2016).
111. Nichols, W. W. *et al.* Characterization of a New Human Diploid Cell Strain, IMR-90. *Science (80-.)*. **196**, 60–63 (1977).
112. Sherwood, S. W., Rush, D., Ellsworth, J. L. & Schimke, R. T. Defining cellular

- senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 9086–9090 (1988).
113. Casella, G. *et al.* Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res.* **47**, 7294–7305 (2019).
114. Teo, Y. V. *et al.* Notch Signaling Mediates Secondary Senescence. *Cell Rep.* **27**, 997–1007.e5 (2019).
115. Dierick, J. F. *et al.* Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1011–1017 (2002).
116. Schafer, M. J. *et al.* Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* **8**, 1–11 (2017).
117. Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M. & Mirkin, B. L. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* **22**, 2805–2811 (2003).
118. Argenziano, M. *et al.* Improvement in the anti-tumor efficacy of doxorubicin nanosponges in in vitro and in mice bearing breast tumor models. *Cancers (Basel)*. **12**, 1–19 (2020).
119. Elmore, L. W., Di, X., Dumur, C., Holt, S. E. & Gewirtz, D. A. Evasion of a Single-Step, Chemotherapy-Induced Senescence in Breast Cancer Cells: Implications for Treatment Response. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2637–2643 (2005).
120. López-Domínguez, J. A. *et al.* *Cdkn1a* transcript variant 2 is a marker of aging and cellular senescence. *Aging (Albany. NY)*. **13**, 13380–13392 (2021).
121. Basu, A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family

- proteins as targets for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **230**, 107943 (2022).
122. Alam, M. S. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr. Protoc. Immunol.* **123**, e58 (2018).
 123. Saleh, T. *et al.* Clearance of therapy-induced senescent tumor cells by the senolytic ABT-263 via interference with BCL-XL–BAX interaction. *Mol. Oncol.* **14**, 2504–2519 (2020).
 124. Malia, T. J. & Wagner, G. NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-XL. *Biochemistry* **46**, 514–525 (2007).
 125. Shimizu, S., Konishi, A., Kodama, T. & Tsujimoto, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3100–3105 (2000).
 126. Arbel, N., Ben-Hail, D. & Shoshan-Barmatz, V. Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein. *J. Biol. Chem.* **287**, 23152–23161 (2012).
 127. Deshaies, R. J. Prime time for PROTACs. *Nat. Chem. Biol.* **2015 119** **11**, 634–635 (2015).
 128. Khan, S. *et al.* A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat. Med.* **2019 2512** **25**, 1938–1947 (2019).
 129. Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005 64** **6**, 318–327 (2005).
 130. Kohli, J. *et al.* Targeting anti-apoptotic pathways eliminates senescent melanocytes and leads to nevi regression. *Nat. Commun.* **2022 131** **13**, 1–12 (2022).

131. Minagawa, N. *et al.* The anti-apoptotic protein Mcl-1 inhibits mitochondrial Ca²⁺ signals. *J. Biol. Chem.* **280**, 33637–33644 (2005).
132. Gottlieb, E., Armour, S. M., Harris, M. H. & Thompson, C. B. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.* **2003 106 10**, 709–717 (2003).
133. Montero, M., Alonso, M. T., Albillos, A., García-Sancho, J. & Alvarez, J. Mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediated by the Ca²⁺ uniporter. *Mol. Biol. Cell* **12**, 63–71 (2001).
134. Jaimovich, E. *et al.* Xestospongins B, a competitive inhibitor of IP₃-mediated Ca²⁺ signalling in cultured rat myotubes, isolated myonuclei, and neuroblastoma (NG108-15) cells. *FEBS Lett.* **579**, 2051–2057 (2005).
135. Levenson, J. D. *et al.* Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).
136. Zhang, L. *et al.* Contribution of caspase-independent pathway to apoptosis in malignant glioma induced by carbon ion beams. *Oncol. Rep.* **37**, 2994–3000 (2017).
137. Kim, S. O. & Han, J. Pan-caspase inhibitor zVAD enhances cell death in RAW246.7 macrophages. *J. Endotoxin Res.* **7**, 292–296 (2001).
138. Paillard, M. *et al.* Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca²⁺ Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell Rep.* **18**, 2291–2300 (2017).
139. Quadalti, C. & Garone, C. mtDNA maintenance: Disease and therapy. *Hum. Mitochondrial Genome From Basic Biol. to Dis.* 411–442 (2020) doi:10.1016/B978-0-

12-819656-4.00016-4.

140. Weinbach, E. C. & von Brand, T. Formation, isolation and composition of dense granules from mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **148**, 256–266 (1967).
141. Cieri, D. *et al.* SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death Differ.* **25**, 1131–1145 (2017).
142. Behnen, P. *et al.* Calcium-Dependent Interaction of Calmodulin with Human 80S Ribosomes and Polyribosomes. *Biochemistry* **51**, 6718–6727 (2012).
143. Diaz-Cuadros, M. *et al.* Metabolic regulation of species-specific developmental rates. *Nat.* **613**, 550–557 (2023).
144. GINCEL, D., ZAID, H. & SHOSHAN-BARMATZ, V. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem. J.* **358**, 147–155 (2001).
145. Shoshan-Barmatz, V. *et al.* VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol. Aspects Med.* **31**, 227–285 (2010).