



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

“Estandarización de modelo de senescencia celular inducido por estrés oxidativo en células HepG2”

Memoria para optar al título profesional de
Bioquímico(a)

Jose Bustamante Salazar

Director

Dr. Roberto Bravo Sagua

Profesor Asistente

Instituto de Nutrición y Tecnología de
los Alimentos

Universidad de Chile

Patrocinante

Dra. Valentina Parra Ortiz

Profesora Asociada

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

Octubre, 2024

I. Financiamiento

Proyecto FONDECYT de Iniciación 11201267, ANID (Roberto Bravo Sagua).

II. Índice de contenidos

1. Introducción.....	8
2. Propósito de investigación	16
3. Objetivos.....	16
4. Materiales y métodos	17
5. Resultados.....	20
6. Discusión.....	26
7. Conclusiones.....	32
8. Referencias	33

III. Índice de tablas y figuras

Figura 1. Síndrome metabólico total según sexo y edad, Encuesta Nacional de Salud 2016-2017.....	9
Figura 2. Localización de Ki67 a lo largo del ciclo celular.	15
Figura 3. Aumento del área celular tras tratamiento con H ₂ O ₂ en células HepG2.....	20
Figura 4. Evaluación del área nuclear en células HepG2 tratadas con H ₂ O ₂	22
Figura 5. Evaluación de la detención del ciclo celular mediante Ki67 en células HepG2 tratadas con H ₂ O ₂	23
Figura 6. Expresión de la proteína Ki67 en células HepG2 tratadas con H ₂ O ₂	24
Figura 7. Evaluación de la relación entre fluorescencia nuclear y extracelular de Ki67 en células HepG2 tratadas con H ₂ O ₂	25
Figura 8. Estudio de la citomegalia y de la β-galactosidasa en células HepG2 bajo condiciones de estrés oxidativo.	29
Figura 9. Niveles de proteína p16, p21, y p53, normalizados por β-actina, en células HepG2 tratadas con distintas concentraciones del agente oxidante H ₂ O ₂	30

I. Abreviaturas

AVAD: Años de vida ajustados por discapacidad.

ER: Endoplasmic reticulum, o retículo endoplásmico.

FBS: *Fetal bovine serum*, o suero bovino fetal.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

ICD10: *International Classification of Diseases, Tenth Revision*, o Clasificación Internacional de Enfermedades 10° revisión.

MEM: *Minimum Eagle medium*, o medio esencial mínimo.

NFκB: *Nuclear factor kappa B*, o Factor Nuclear kappa B.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

p16: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, o inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A.

p21: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, o quinasa dependiente de ciclina.

P38 MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*, o proteína quinasa activada por mitógenos.

p53: *Cell Tumor Antigen p53*, o Antígeno Tumoral Celular p53.

ROS: *Reactive oxygen species*, o especies reactivas de oxígeno.

RT-qPCR: *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*, o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa.

SASP: *Senescence-associated secretory phenotype*, o fenotipo secretor asociado a la senescencia celular.

SAβ-gal: *Senescence-associated β-galactosidase*, o β-galactosidasa asociada a la senescencia.

II. Resumen

La senescencia celular es un estado de detención del crecimiento irreversible donde las células permanecen metabólicamente activas y pueden exhibir un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Este proceso es crucial de estudiar debido a sus implicaciones en el envejecimiento, las enfermedades relacionadas con la edad y la prevención del cáncer. Comprender los mecanismos y la regulación de la senescencia celular es esencial para desarrollar terapias dirigidas a combatir las enfermedades relacionadas con la edad y el cáncer.

Este estudio estandarizó un modelo de senescencia celular inducido por estrés en la línea celular HepG2 mediante el uso del agente oxidante H_2O_2 . El propósito de investigación fue la estandarización de este modelo de estudio con el fin de que sea útil para futuras investigaciones en torno a los mecanismos de la senescencia celular.

En el estudio, se evaluaron los efectos del tratamiento con H_2O_2 a distintos tiempos y concentraciones del agente oxidante. Los resultados mostraron un aumento significativo en el aumento del área celular (citomegalia), un marcador del fenotipo senescente, después de 72 horas de que las células fueran tratadas durante una hora con H_2O_2 , este resultado se obtuvo tanto con una concentración de 50 μM como con una de 100 μM . Se evaluó también la translocación fuera del núcleo de la proteína Ki67, otro marcador de la senescencia celular, bajo las mismas condiciones, y no se observaron cambios significativos en la ubicación de esta proteína. Para el análisis, se incluyeron resultados de otros integrantes del laboratorio que tenían el mismo propósito de investigación, y los resultados que obtuvieron fueron que, bajo las mismas condiciones en las que se presentó citomegalia en este trabajo, hubo un aumento en los niveles de tinción de β -galactosidasa y en los niveles de proteína de p16, p21 y p53, los cuales son también marcadores del fenotipo senescente.

A pesar de algunas limitaciones, como la falta de mejores controles en algunos experimentos, y considerando los resultados del resto del equipo de investigación, el estudio validó el modelo de senescencia inducido por H_2O_2 en la línea celular HepG2. Este trabajo proporciona una base sólida para futuras investigaciones sobre la senescencia celular y los mecanismos bajo los cuales esta se produce.

Standardization of a Cellular Senescence Model Induced by Oxidative Stress in HepG2 Cells

III. Abstract

Cellular senescence refers to a permanent halt in cell division where cells stay metabolically active and can show a senescence-associated secretory phenotype (SASP). Investigating this process is vital because of its roles in aging, age-related diseases, and cancer prevention. Gaining insights into the mechanisms and control of cellular senescence is critical for creating targeted treatments for age-related conditions and cancer.

This study standardized a stress-induced cellular senescence model in the HepG2 cell line using the oxidizing agent H_2O_2 . The research purpose was to standardize this study model so that it could be useful for future research on the mechanisms of cellular senescence.

In the study, the effects of H_2O_2 treatment at different times and concentrations of the oxidizing agent were evaluated. The results showed a significant increase in cell area (cytomegaly), a marker of the senescent phenotype, 72 hours after the cells were treated for one hour with H_2O_2 . This result was obtained with both a concentration of 50 μM and 100 μM . The translocation of the protein Ki67 outside the nucleus, another marker of cellular senescence, was also evaluated under the same conditions, and no significant changes were observed in the location of this protein. For the analysis, results from other team members with the same research purpose were included. Their results showed that under the same conditions in which cytomegaly was observed in this study, there was an increase in the staining levels of β -galactosidase and in the protein levels of p16, p21, and p53, which are also markers of the senescent phenotype.

Despite some limitations, such as the lack of better controls in some experiments, and considering the results from other team members, the study validated the H_2O_2 -induced senescence model in the HepG2 cell line. This work provides a solid foundation for future research on cellular senescence and the mechanisms by which it occurs.

1. Introducción

Cambio demográfico en Chile: desafíos sociales y de salud ante el envejecimiento acelerado

En Latinoamérica, Chile es uno de los países que ha experimentado uno de los mayores incrementos de su población adulta mayor. El porcentaje de población chilena de 60 años o más el año 2009 era de 12.7%, mientras que el año 2019 la cifra aumentó a un 16.9%. De hecho, se proyecta que para el año 2040 alrededor de un 20% de la población supere los 60 años, y que un 6% alcance los 80 años ((AMUCH)., 2017; Chile., 2021). El plan de acción mundial sobre el envejecimiento y salud de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala la necesidad de generar evidencia para la elaboración de políticas públicas enfocadas en este grupo de la población (Organization, 2017). El estudio de Carga Global de Enfermedad, realizado en 195 países entre los años 1990 y 2017, determinó que de 293 enfermedades registradas en el sistema de Clasificación Internacional de Enfermedades (*International Classification of Diseases, Tenth Revision*, o ICD10), 92 estaban directamente vinculadas al envejecimiento (Leiva et al., 2020).

Por ejemplo, con el envejecimiento aumenta la prevalencia de demencia. En el año 2016 en Chile, 104.523 personas presentaron Alzheimer u otros tipos de demencia, siendo 70.944 años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), enfermedad, o mortalidad prematura atribuibles al envejecimiento como carga a esta enfermedad (Chang et al., 2019). Lo mismo ocurre con enfermedades metabólicas como el síndrome metabólico, el cual ha mostrado un aumento constante en su prevalencia. Un estudio realizado en la región de Valparaíso en Chile reveló que la prevalencia del síndrome metabólico fue del 9,3% en una primera evaluación realizada entre el año 2000 y el año 2002. Sin embargo, diez años después, entre el año 2010 y 2012, esta prevalencia aumentó significativamente al 27,6% (Bustos et al., 2014).

En la Encuesta Nacional de Salud del Ministerio de Salud de Chile realizada en los años 2016-2017 el 40.1% de la población presentaba síndrome metabólico, y existían diferencias estadísticamente significativas por edad según el modelo de ajuste, destacando los grupos de 45 a 65 años y el de 65 años y más, con un 58% y 60.8% respectivamente (Figura 1) (MINSAL (2018) *Segundos Resultados de Encuesta Nacional de Salud 2016-2017*. Accedido En [Http://Epi.Minsal.CI/Resultados-Encuestas/](http://Epi.Minsal.CI/Resultados-Encuestas/) El 16 de Marzo de 2024., n.d.).

Este marcado incremento en el síndrome metabólico y sus componentes tanto en el periodo 2000-2002 y 2010-2012, como en los años 2016-2017 resaltan la creciente preocupación sobre el riesgo cardiovascular en la población chilena, especialmente en relación con el envejecimiento.

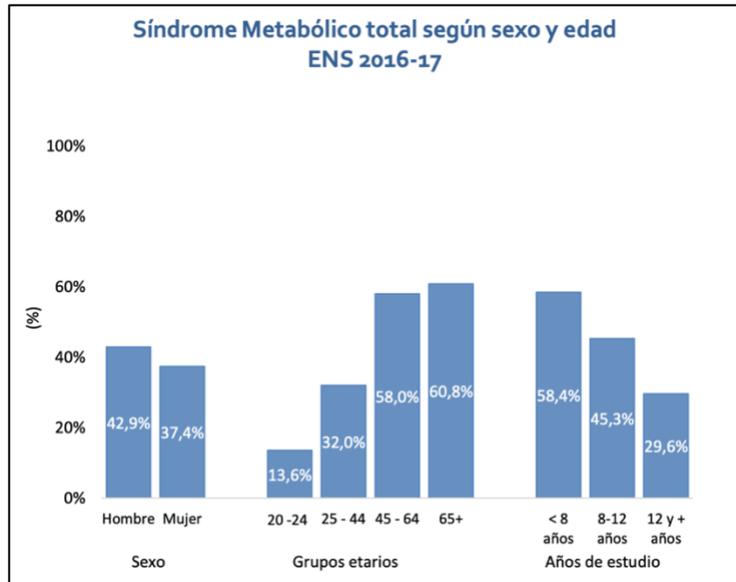


Figura 1. Síndrome metabólico total según sexo y edad, Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. (MINSAL (2018) Segundos Resultados de Encuesta Nacional de Salud 2016-2017. Accedido En [Http://Epi.Minsal.CI/Resultados-Encuestas/](http://Epi.Minsal.CI/Resultados-Encuestas/) El 16 de Marzo de 2024., n.d.).

Otra enfermedad relacionada al metabolismo es el hígado graso. La prevalencia de la enfermedad del hígado graso tiende a aumentar con la edad debido a diversos factores. A medida que las personas envejecen, se produce una disminución natural de la función hepática (Han et al., 2023), lo que hace que las personas mayores sean más susceptibles a desarrollar enfermedad del hígado graso en comparación con las personas más jóvenes. Además, la incidencia de la enfermedad del hígado graso es mayor en los grupos de mayor edad (Han et al., 2023).

La progresión de la enfermedad del hígado graso con la edad también está influenciada por factores metabólicos. La enfermedad del hígado graso está estrechamente relacionada con el síndrome metabólico y su gravedad tiende a aumentar en paralelo con otras características de este síndrome (Liu et al., 2010). Además, la enfermedad del hígado graso se reconoce cada vez más como una manifestación hepática del síndrome metabólico, que

se vuelve más frecuente a medida que las personas envejecen (Liu et al., 2010).

Los componentes del síndrome metabólico que tienden a empeorar con la edad y están estrechamente relacionados con la gravedad de la enfermedad del hígado graso incluyen hiperglucemia, hipertrigliceridemia, colesterol bajo de lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertensión, obesidad central y resistencia a la insulina. Estas anomalías metabólicas, cuando se combinan con cambios relacionados con la edad, contribuyen al aumento de la prevalencia y la gravedad de la enfermedad del hígado graso en personas mayores (Silva et al., 2022).

El daño oxidativo extenso conduce a la senescencia celular inducida por el estrés

El envejecimiento y las enfermedades asociadas no solo tienen un impacto a nivel poblacional, sino que también se manifiestan a nivel celular y molecular. El envejecimiento es un proceso complejo caracterizado por la pérdida progresiva de la función de los tejidos y órganos con el tiempo, que se cree que es el resultado del daño acumulativo (Liguori et al., 2018). Uno de estos órganos es el hígado, y, por lo tanto, la función hepática.

El hígado sufre cambios relacionados con la edad que pueden provocar daño oxidativo, inflamación y trastornos metabólicos debido a factores como una disminución de la función hepática y alteraciones en la arquitectura hepática, reducción de la actividad autofágica y cambios en la función mitocondrial (Hardy et al., 2015; Poggiogalle et al., 2017).

Uno de los procesos que contribuyen al envejecimiento es el daño oxidativo, el cual ocurre como resultado del estrés oxidativo (Sohal & Weindruch, 1996). El daño oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (*Reactive oxygen species*, o ROS) y los mecanismos de defensa antioxidantes del cuerpo (Liguori et al., 2018). Las ROS son moléculas altamente reactivas que pueden causar daño a componentes celulares como el ADN, las proteínas y los lípidos (Berlett & Stadtman, 1997). Este daño puede acumularse con el tiempo y contribuir al proceso de envejecimiento y al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (Beckman & Ames, 1998).

A nivel celular, el daño oxidativo afecta la estructura y la función celular y, debido a posibles alteraciones del ADN, conlleva un grave peligro para la tumorigénesis de las células proliferativas. Las células dañadas pueden alterar el funcionamiento normal del tejido en el

que se encuentran, contribuyendo a disfunciones tisulares y enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Luego, las células adquieren un fenotipo de senescencia inducido por estrés, caracterizado por expansión celular y nuclear (citomegalia y cariomegalia, respectivamente), reorganización de la cromatina, detención del ciclo celular y secreción de citocinas proinflamatorias (Franceschi et al., 2017).

La adquisición de un fenotipo secretor asociado a la senescencia celular (*Senescence-associated secretory phenotype*, o SASP) promueve la inflamación, la eliminación de las células senescentes por parte del sistema inmunitario y la reparación de tejidos (Franceschi et al., 2017). Este fenotipo, SASP, puede ser causado por daño del ADN nuclear, el cual es el desencadenante de la senescencia celular mejor estudiado. Este daño conduce a la fosforilación y activación del factor de transcripción *Cell tumor antigen p53* (o p53), el principal regulador de la senescencia celular (Herranz & Gil, 2018).

El factor de transcripción p53 induce al inhibidor 1 de la quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, o p21), una proteína que inhibe transitoriamente el ciclo celular (Childs et al., 2014; Herranz & Gil, 2018). Además, la red transcripcional de p53 promueve la reparación del ADN y la apoptosis (Reinhardt & Schumacher, 2012), una forma de muerte celular programada que resulta en la eliminación ordenada y eficiente de células dañadas, como las que tienen daño en el ADN (Pistritto et al., 2016). La evidencia indica que, si la reparación del ADN tiene éxito, la activación de p53 y la senescencia celular son solo transitorias. En cambio, si el daño es agudo pero irreversible, la activación leve de p53 induce la senescencia celular. Sin embargo, si el daño persiste, activa en gran medida a p53, lo que lleva a la apoptosis (Childs et al., 2014; McHugh & Gil, 2018).

El daño irreversible del ADN y la activación mediada por ROS de la proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-activated protein kinase*, o p38 MAPK) inducen al inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, o p16), que conduce a la detención permanente del ciclo celular y a la senescencia celular (Childs et al., 2014; Iwasa et al., 2003). Finalmente, las señales asociadas a la senescencia celular, como el daño en el ADN y p38 MAPK, convergen en la activación del factor de transcripción *Nuclear factor kappa B* (NFκB), que es un promotor de SASP (Herranz & Gil, 2018).

Hepatocitos y línea celular HepG2 como modelo de estudio

La acumulación de células senescentes conduce a enfermedades relacionadas con la edad (Franceschi et al., 2017), como el síndrome metabólico, que se asocia con la obesidad y se caracteriza por la acumulación de lípidos en diferentes tejidos e hiperglucemia debido a la resistencia a la insulina (Schafer et al., 2017). Múltiples tipos de células participan en esta fisiopatología, como las células β -pancreáticas, miocitos, adipocitos, las neuronas y los hepatocitos.

Los hepatocitos son la principal fuente de proteínas circulantes, y por lo tanto, su retículo endoplásmico (*Endoplasmic reticulum*, o ER) está constantemente sintetizando y plegando proteínas, lo que los hace proclives al estrés de ER, y por ello, a la disfunción mitocondrial (Dara et al., 2011). La disfunción mitocondrial es típica de la enfermedad hepática y se correlaciona con la acumulación de lípidos (Peng et al., 2018). La acumulación de lípidos es un inductor del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en el hígado (Cui et al., 2012). A diferencia de los otros tipos de células mencionados, los hepatocitos proliferan y, en consecuencia, son los únicos que pueden experimentar la senescencia celular convencional (Herranz & Gil, 2018).

Usar una línea celular para estudiar la senescencia proporciona un sistema controlado y reproducible para investigar procesos celulares, vías de señalización y otros aspectos relevantes. El uso de células HepG2, una línea celular bien establecida derivada del carcinoma hepatocelular humano, ofrece varias ventajas para estudiar la senescencia. Son un modelo relevante para investigar el papel de la senescencia de los hepatocitos en la enfermedad hepática crónica, lo que las convierte en un recurso comúnmente utilizado en los estudios de senescencia celular (Wijayasiri et al., 2022). Además, las células HepG2 son fáciles de cultivar, mantener y manipular en entornos de laboratorio, lo que proporciona un sistema conveniente y confiable para estudiar procesos relacionados con la senescencia (Wijayasiri et al., 2022).

Por lo tanto, este proyecto propone utilizar la línea celular HepG2 como modelo de estudio, específicamente la línea celular HepG2.

Importancia del estudio de la senescencia celular y métodos de estudio

El estudio de la senescencia celular es de gran importancia debido a sus implicaciones en varios procesos biológicos y enfermedades. La senescencia celular se refiere a un estado de arresto irreversible del ciclo celular, acompañado de cambios en la morfología celular y la secreción de moléculas proinflamatorias (Ogrodnik et al., 2017). Comprender los mecanismos y las características de la senescencia celular es esencial para desarrollar estrategias que retrasen las enfermedades relacionadas con la edad y potencialmente modulen los mecanismos fundamentales del envejecimiento (Tchkonia et al., 2013).

Por ejemplo, comprender los mecanismos y características de la senescencia celular puede ofrecer información valiosa para desarrollar estrategias contra la enfermedad del hígado graso. Las investigaciones han demostrado que la senescencia celular desempeña un papel importante en el impulso de la esteatosis hepática, una característica clave de la enfermedad del hígado graso (Ogrodnik et al., 2017). Al apuntar a las células senescentes, se pueden desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para reducir la esteatosis y mitigar la progresión de la enfermedad del hígado graso (Ogrodnik et al., 2017). Además, la senescencia ha sido relacionada con la patogénesis y la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), lo que sugiere que las intervenciones dirigidas a las células senescentes podrían ser beneficiosas para controlar estas afecciones (Papatheodoridi et al., 2020).

Los estudios *in vitro* proporcionan un enfoque valioso para investigar la senescencia celular. Ofrecen condiciones experimentales controladas, lo que permite a los investigadores manipular y observar factores específicos que contribuyen a la senescencia (González-Gualda et al., 2021). Estos estudios pueden ayudar a identificar firmas moleculares y vías implicadas en la senescencia, lo que puede llevar al descubrimiento de posibles objetivos terapéuticos o biomarcadores (González-Gualda et al., 2021). Además, los modelos *in vitro* permiten investigar estímulos específicos que inducen la senescencia, como fármacos inductores de daño en el ADN, los cuales pueden ser difíciles de controlar en un entorno *in vivo* (González-Gualda et al., 2021).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que estudiar la senescencia celular únicamente *in vitro* tiene limitaciones. Para comprender completamente el papel de la senescencia en el envejecimiento y la progresión de enfermedades, es crucial validar los hallazgos en

modelos *in vivo* (González-Gualda et al., 2021). Los estudios *in vivo* proporcionan una comprensión más completa de las complejas interacciones entre diferentes tipos celulares y tejidos, así como de las consecuencias funcionales de la senescencia (González-Gualda et al., 2021).

Marcadores del fenotipo de la senescencia celular inducida por estrés

Como se mencionó anteriormente, las células en estado de senescencia celular inducida por estrés ven modificado su fenotipo, y, por lo tanto, es posible comprobar el estado de senescencia celular a través del estudio de estos cambios de fenotipo.

Entre algunos de los cambios que se pueden medir se encuentran: la citomegalia y cariomegalia con un microscopio de campo claro (Aravinthan et al., 2014a); el aumento de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA β -gal), que es un marcador típico de la senescencia de células HepG2 el cual se puede estudiar con un kit colorimétrico y un microscopio de campo claro (Aravinthan et al., 2014a); los niveles de ARN mensajero de p21, p16 y p53 mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR) (Aravinthan et al., 2014a); la detención del ciclo celular a través de la proteína Ki67, una proteína que mantiene la estructura cromosómica durante la mitosis, por lo que su translocación fuera del núcleo es un marcador de detención del ciclo celular, la cual se puede medir a través de inmunofluorescencia (Irvine et al., 2014); entre otros métodos.

La proteína Ki67 está ausente en las células quiescentes (G0) y se expresa universalmente en las células en proliferación. Existe una expresión variada de Ki67 a lo largo del ciclo celular con baja expresión durante la fase G1 y S temprana y un aumento progresivo en la expresión con expresión máxima durante la mitosis (Figura 2) (Pathmanathan & Balleine, 2013). Específicamente, Ki67 es necesario para la formación de la capa pericromosómica mitótica (Booth et al., 2014; Sobecki et al., 2016), una envoltura proteica que recubre los cromosomas mitóticos (Hooser et al., 2005). En esta capa, el gran tamaño de Ki67 y su composición de aminoácidos altamente cargados positivamente mantienen los cromosomas mitóticos dispersos en lugar de agregarse tras la desintegración del envoltorio nuclear, asegurando así la cinética normal de la progresión de la anafase (Cuylen et al., 2016).

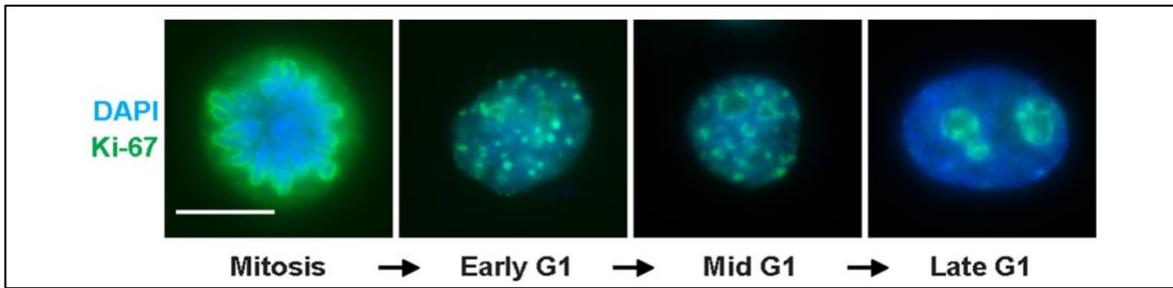


Figura 2. Localización de Ki67 a lo largo del ciclo celular. Las células HeLa S3 fueron teñidas con DAPI para visualizar el ADN (azul) y con anticuerpos contra Ki67 (verde) para demostrar los patrones de tinción de Ki67 a lo largo del ciclo celular (Matheson & Kaufman, 2017).

Si bien se necesita estudiar esta serie de cambios mencionados anteriormente para poder afirmar que las células HepG2 se encuentran en un estado de senescencia celular inducida por estrés, el estudio de la citomegalia y cariomegalia, junto con la medición de la translocación de Ki67 fuera del núcleo, son una buena primera aproximación a la estandarización de este modelo de estudio.

A pesar de que la línea celular HepG2 ha sido ampliamente utilizada en investigaciones previas para estudiar la senescencia celular, se considera necesario estandarizar nuevamente este modelo experimental antes de comenzar a utilizar el modelo experimental en el proyecto de investigación en el que se enmarca este trabajo. Esta medida se adopta con el fin de garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos, así como para adaptar el modelo a las especificidades y objetivos del proyecto de investigación.

Dado que el propósito principal de este trabajo es la estandarización de un modelo ya existente utilizando la línea celular HepG2 para el estudio de la senescencia celular, es importante destacar que esta tesis no presenta novedad científica. Más bien, se trata de una propuesta técnica destinada a establecer un protocolo experimental estandarizado para futuras investigaciones en este campo. Por lo tanto, debido a la naturaleza técnica de este trabajo y su falta de contribución a la generación de nuevas hipótesis, no se plantea una hipótesis específica.

2. Propósito de investigación

El tratamiento agudo con el agente oxidante peróxido de hidrógeno (H_2O_2) provoca citomegalia y detención del ciclo celular en la línea celular HepG2.

3. Objetivos

Objetivo General

Estandarizar un modelo de investigación para inducir senescencia celular evaluada como citomegalia y detención del ciclo celular en la línea celular HepG2 utilizando H_2O_2 .

Objetivos Específicos

1. Evaluar si el tratamiento agudo con el agente oxidante H_2O_2 provoca citomegalia en la línea celular HepG2.
2. Evaluar si el tratamiento agudo con el agente oxidante H_2O_2 provoca detención del ciclo celular en la línea celular HepG2.

4. Materiales y métodos

Modelo de estudio

Se utilizó la línea celular HepG2 derivada de carcinoma hepatocelular humano (ATCC HB-8065). Las células se cultivaron siguiendo las instrucciones del proveedor, es decir, en Minimum Eagle Medium (MEM) con suero bovino fetal (*fetal bovine serum*, o FBS) al 10%, penicilina a una concentración de 100 U/mL y estreptomycin a una concentración de 100 U/mL, y fueron mantenidas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

Senescencia celular inducida por estrés

Para la inducción del fenotipo de células HepG2 en estado de senescencia celular inducida por estrés se utilizó el estrés oxidativo provocado con tratamiento de H₂O₂, a distintas concentraciones y a distintos tiempos de tratamiento (11). El H₂O₂ fue usado en medio MEM sin FBS, debido a los antioxidantes presentes en el FBS.

Diseño experimental

Las células HepG2 fueron sembradas el primer día del experimento a una densidad celular de 4.500 células por cm², el segundo día se sometieron al inductor de senescencia celular H₂O₂ en medio MEM sin FBS durante 1 y 2 horas a las siguientes concentraciones: 0, 25, 50, 100, 200, 400, 500 y 1000 µM. La inducción de senescencia celular con H₂O₂ en medio MEM se hizo sin FBS debido a que este último es una fuente de antioxidantes importante para la protección antioxidante celular (Lewinska et al., 2007), y, por lo tanto, hubiera interferido con el daño oxidativo causado por el H₂O₂. La evidencia muestra que las condiciones óptimas podrían estar entre 100-500 µM de H₂O₂ durante 1 h de tratamiento (Aravinthan et al., 2015). Luego se cultivaron durante 1 y 3 días en medio MEM con FBS para permitirles adquirir el fenotipo senescente. El fenotipo senescente se evaluó a 1 y 3 días después del tratamiento, y se comparó con la condición control, que eran células HepG2 en ausencia de H₂O₂.

Evaluación de la citomegalia en la línea celular HepG2

La aparición de senescencia celular inducida por estrés fue evaluada a través de la observación de la morfología celular, esto es, ver si es que hay citomegalia en un microscopio de contraste de fases (Aravinthan et al., 2014a). La evaluación de la presencia de citomegalia se llevó a cabo a través de la comparación del área de las células en las distintas condiciones experimentales.

Evaluación de la detención del ciclo celular

Se llevó a cabo una inmunofluorescencia de la proteína Ki67, esta técnica permitió una evaluación más precisa y cuantitativa de la senescencia celular en las células HepG2 tratadas con H₂O₂ al medir la translocación fuera del núcleo de la proteína. En la inmunofluorescencia, para marcar Ki67 se hibridó con un anticuerpo primario de ratón y un anticuerpo secundario anti-mouse IgG Alexa 488, además, se utilizó el marcador de ADN Hoechst para marcar los núcleos. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioskop. Para este experimento de translocación de Ki67 al núcleo no han sido determinadas condiciones de control.

Evaluación de la cariomegalia en la línea celular HepG2

Como se mencionó anteriormente, una característica del fenotipo de senescencia celular inducido por estrés es la expansión nuclear, o cariomegalia. Aprovechando el marcador de ADN Hoechst en el experimento de la evaluación de la detención del ciclo celular a través de Ki67, se midió también el área de los núcleos en las distintas condiciones del experimento.

Análisis de imágenes

Para el experimento de evaluación de citomegalia se midió en las imágenes obtenidas con el microscopio de contraste de fases el área de 60 células aleatorias en cada una de las condiciones experimentales con la herramienta manual *freehand selection* del software de procesamiento digital ImageJ.

El mismo software fue utilizado para evaluar los niveles de fluorescencia dentro y fuera del núcleo en cada una de las células. Este análisis fue realizado con un macro desarrollado para ImageJ dentro del laboratorio.

Para la medición del área de los núcleos en el experimento de Ki67 se utilizó la herramienta de ImageJ *analyze particles*, que, tras definir y eliminar de manera manual un umbral basal de fluorescencia en cada imagen, mide el área de cada uno de los objetos identificados, que en este caso son los núcleos celulares.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los experimentos fue hecho en el software de bioestadística y visualización de datos científicos GraphPad Prism 10. Tanto para el análisis de la evaluación del cambio en la morfología celular (citosol y núcleos) como en la evaluación de la detención del ciclo celular se utilizó el test estadístico One-way ANOVA junto con el test Dunnett de comparaciones múltiples. Los datos fueron graficados con su Mean \pm SEM, y para el cálculo de significancia se consideraron los siguientes p-values: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparados al control.

5. Resultados

Evaluación de la citomegalia en la línea celular HepG2

La evaluación de la presencia de citomegalia en la línea celular HepG2 después de haber sido tratada con el agente oxidante H_2O_2 se observa en la Figura 3. Después de 24 horas del tratamiento con H_2O_2 , si bien se observa una tendencia al crecimiento del área celular a medida que aumenta la concentración del tratamiento, no existen diferencias significativas de este crecimiento respecto al control (Figura 3A). Luego de 72 horas de haber removido el tratamiento de H_2O_2 a distintas concentraciones, se observa que hay una diferencia significativa en el área celular de las células que fueron tratadas con concentraciones de 50 μM de H_2O_2 y 100 μM de H_2O_2 en comparación al control, siendo esta última concentración la más significativa (Figura 3B). Por lo tanto, luego de 72 horas, el tratamiento con el agente oxidante H_2O_2 a 50 y 100 μM durante 1 hora provoca en la línea celular HepG2 un aumento significativo en el área celular, siendo este aumento mayor con la concentración de 100 μM .

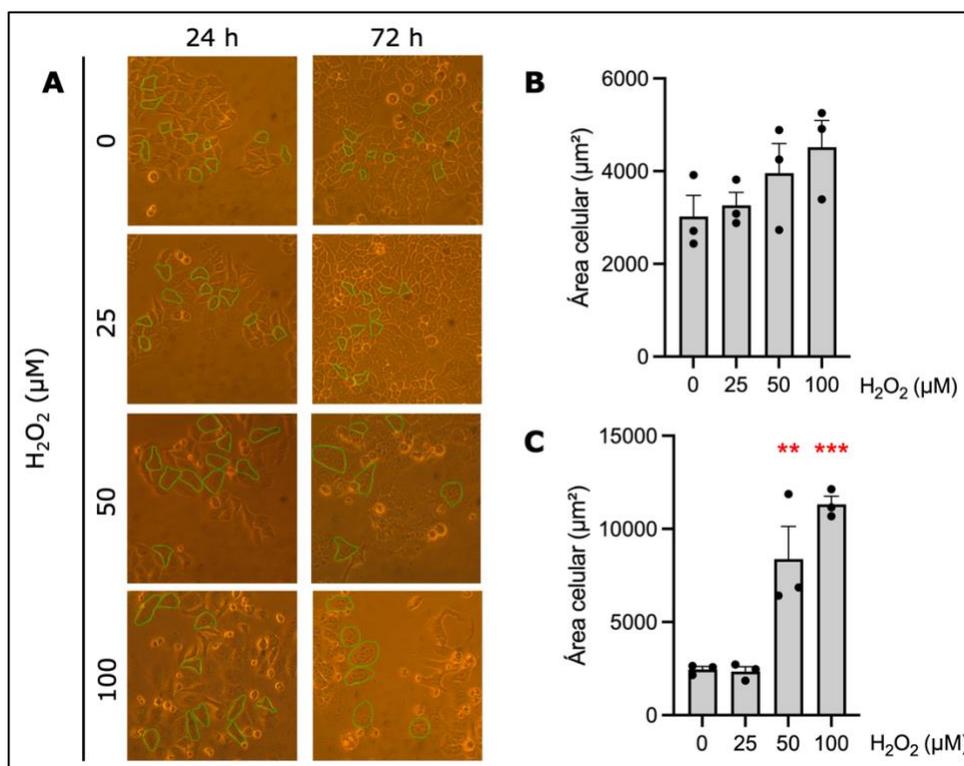


Figura 3. Aumento del área celular tras tratamiento con H_2O_2 en células HepG2. A. Fotografías tomadas con el microscopio de contraste de fases (aumento 20x). B. Células tratadas a distintas concentraciones de H_2O_2 durante una hora y fotografiadas 24 horas después de haber quitado el tratamiento. C. Células tratadas a distintas concentraciones

de H₂O₂ durante una hora y fotografiadas 72 horas después de haber quitado el tratamiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar cada grupo tratado con el grupo control. Los gráficos de barras se expresan como media ± SEM, con tres (n=3) cultivos independientes. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$) comparadas con el grupo control.

Evaluación de la cariomegalia en la línea celular HepG2

La evaluación de la presencia de cariomegalia en la línea celular HepG2 después de haber sido tratada con el agente oxidante H₂O₂ se observa en la Figura 4. Luego de 24 horas de haber sido tratadas por 1 hora a distintas concentraciones de H₂O₂ se puede ver una leve tendencia hacia el aumento del área nuclear a medida que aumenta la concentración de H₂O₂ (Figura 4A). Luego de 72 horas del tratamiento por 1 hora a distintas concentraciones de H₂O₂ no parece haber una tendencia al cambio del área nuclear (Figura 4B). Luego de 72 horas después de haber sido tratadas durante 1 y 2 horas con distintas concentraciones de H₂O₂ (Figuras 4C y 4D, respectivamente), no se observa una tendencia hacia un cambio de área nuclear.

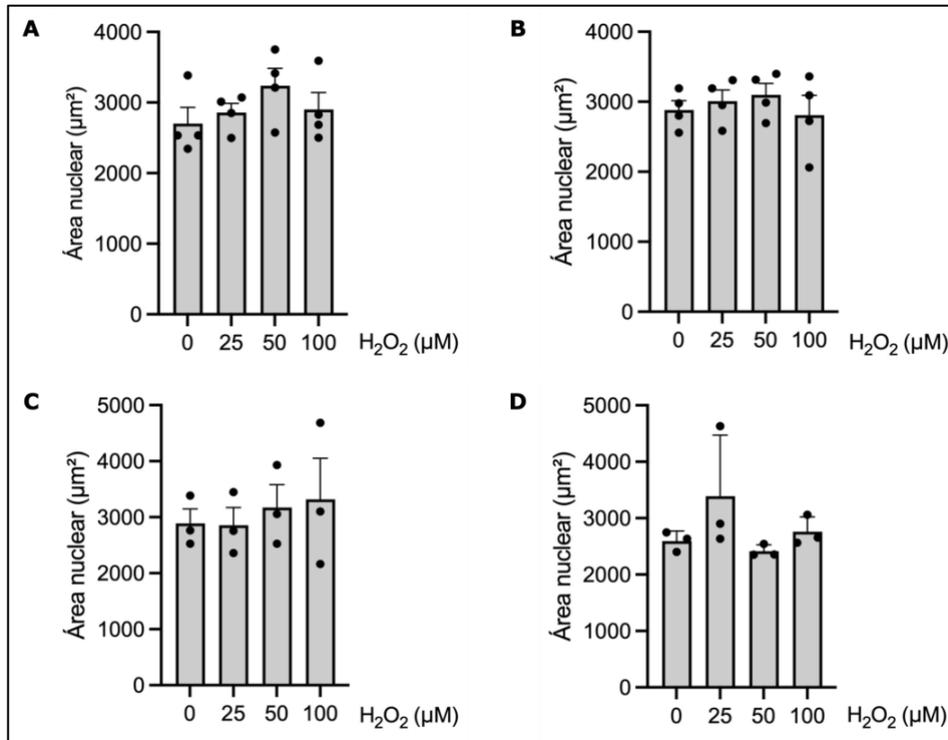


Figura 4. Evaluación del área nuclear en células HepG2 tratadas con H₂O₂. A. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante una hora y fijadas 24 horas después de remover el tratamiento. B. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante dos horas y fijadas 24 horas después de remover el tratamiento. C. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante una hora y fijadas 72 horas después de remover el tratamiento. D. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante dos horas y fijadas 72 horas después de remover el tratamiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar cada grupo tratado con el grupo control. Los gráficos de barras se expresan como media ± SEM, con cuatro (n=4) cultivos independientes para A y B y con tres (n=3) para C y D. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las distintas condiciones experimentales. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Evaluación de la detención del ciclo celular

Ki67 es una proteína que mantiene la estructura cromosómica durante la mitosis, promoviendo la división celular. La translocación fuera del núcleo de Ki67 es un marcador de detención celular. En las diferentes condiciones experimentales estudiadas, esto es, distintas concentraciones de H_2O_2 (0, 25, 50 y 100 μM), distintas duraciones del tratamiento (1 y 2 horas), y distintos tiempos de medición tras el retiro del tratamiento (24 y 72 horas), no se observan diferencias significativas en el cambio de fluorescencia nuclear de Ki67 (Figura 5A-D) ni tampoco es posible establecer una tendencia de la ubicación de Ki67 en las distintas condiciones visualmente (Figura 6).

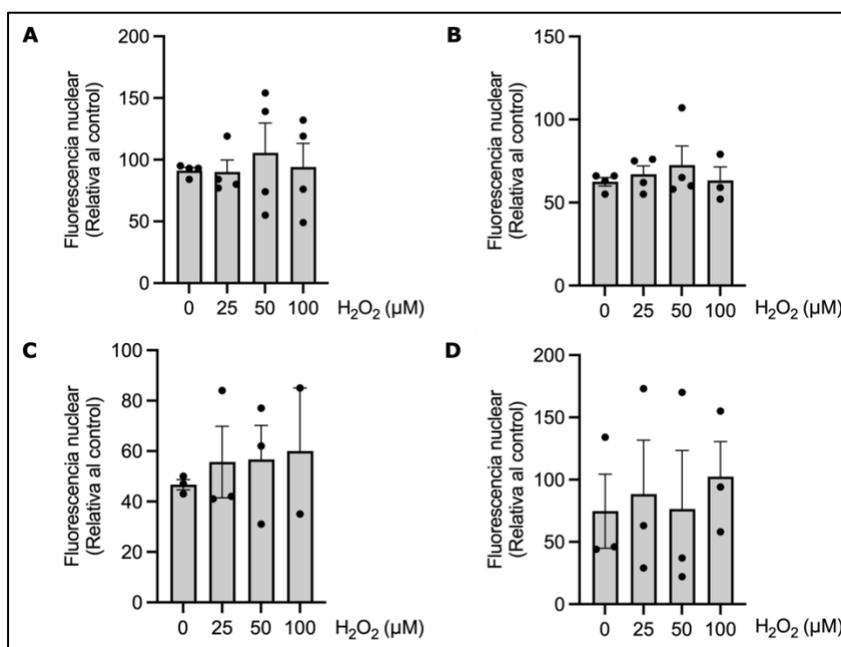


Figura 5. Evaluación de la detención del ciclo celular mediante Ki67 en células HepG2 tratadas con H_2O_2 . A. Células tratadas a distintas concentraciones de H_2O_2 durante una hora y fijadas 24 horas después de remover el tratamiento. B. Células tratadas a distintas concentraciones de H_2O_2 durante dos horas y fijadas 24 horas después de remover el tratamiento. C. Células tratadas a distintas concentraciones de H_2O_2 durante una hora y fijadas 72 horas después de remover el tratamiento. D. Células tratadas a distintas concentraciones de H_2O_2 durante dos horas y fijadas 72 horas después de remover el tratamiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar cada grupo tratado con el grupo control. Los gráficos de barras se expresan como media \pm SEM, con cuatro ($n=4$) cultivos

independientes para A y B y con tres (n=3) para C y D. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las distintas condiciones experimentales. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

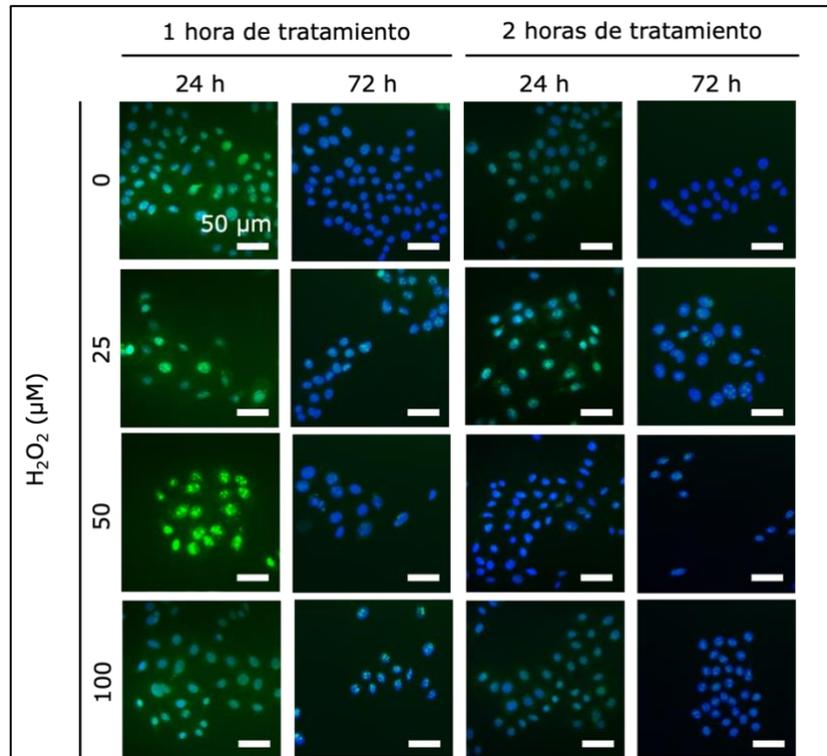


Figura 6. Expresión de la proteína Ki67 en células HepG2 tratadas con H₂O₂. En color verde se muestra la proteína Ki67, y en color azul se muestran los núcleos.

La razón entre la fluorescencia nuclear y la fluorescencia extracelular de Ki67 es una medida de la translocación de la proteína, a medida que disminuye este valor se puede decir que más se acentúa la diferencia en los niveles de Ki67 fuera del núcleo en comparación a sus niveles dentro del núcleo, siendo los primeros niveles lo más altos. Por lo tanto, esta razón funciona como indicador de la translocación de Ki67 fuera del núcleo, y, por consecuencia, de la detención del ciclo celular.

En las diferentes condiciones experimentales estudiadas, esto es, distintas concentraciones de H₂O₂ (0, 25, 50 y 100 μM), distintas duraciones del tratamiento (1 y 2 horas), y distintos tiempos de medición tras el retiro del tratamiento (24 y 72 horas), no se observan diferencias significativas en la razón entre la fluorescencia nuclear y la fluorescencia extracelular de Ki67 (Figura 7A-D).

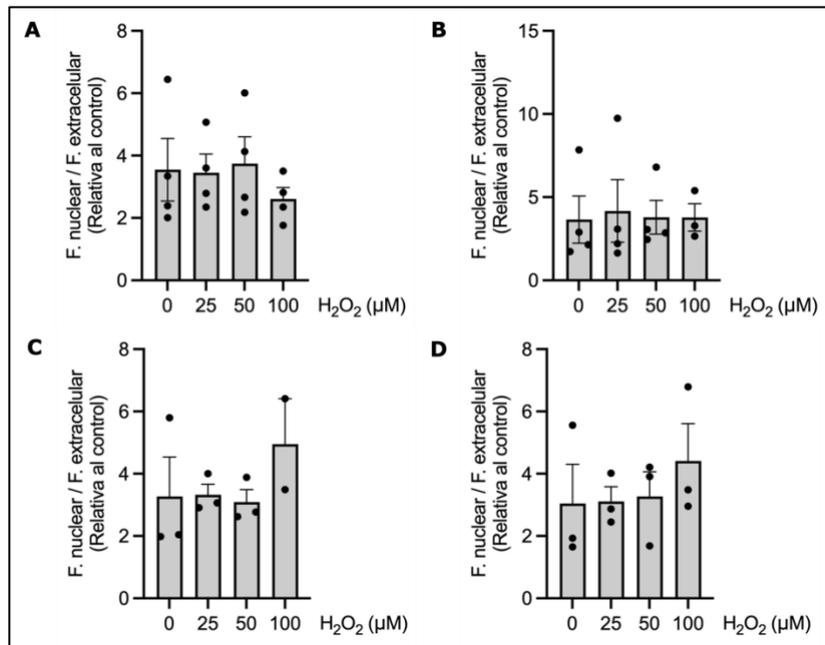


Figura 7. Evaluación de la relación entre fluorescencia nuclear y extracelular de Ki67 en células HepG2 tratadas con H₂O₂. A. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante una hora y fijadas 24 horas después de remover el tratamiento. B. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante dos horas y fijadas 24 horas después de remover el tratamiento. C. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante una hora y fijadas 72 horas después de remover el tratamiento. D. Células tratadas a distintas concentraciones de H₂O₂ durante dos horas y fijadas 72 horas después de remover el tratamiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett para comparar cada grupo tratado con el grupo control. Los gráficos de barras se expresan como media ± SEM, con cuatro (n=4) cultivos independientes para A y B y con tres (n=3) para C y D. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las distintas condiciones experimentales. Se consideraron diferencias significativas cuando p < 0.05.

6. Discusión

En este estudio, se realizaron experimentos para estandarizar un modelo de senescencia en la línea celular HepG2 con el agente oxidante H_2O_2 mediante el análisis morfológico de las células y la translocación fuera del núcleo de una proteína que participa en la detención del ciclo celular.

Los resultados obtenidos en el experimento de evaluación de citomegalia muestran un incremento significativo en el aumento del tamaño del área celular después de 72 horas de haber sido tratadas con H_2O_2 durante 1 hora a concentraciones de 50 y 100 μM , siendo el aumento del área celular más significativo a 100 μM . Este resultado es consistente con el trabajo de Aravinthan, et al., donde también observaron un aumento en la morfología de estas células bajo condiciones de estrés oxidativo (Aravinthan et al., 2014b). Este resultado permite comprobar el objetivo específico 1 de este estudio.

A pesar del resultado que comprueba el objetivo específico número 1, en este experimento del estudio de la citomegalia de las células tras haber sido expuestas a condiciones de estrés oxidativo podría obtenerse más información contando, por ejemplo, cuántas células mueren después de haber sido tratadas, y cuál es el porcentaje de cambio en el tamaño de las células.

Otro factor importante es que las células a las que se les midió su área fueron elegidas a simple vista en las fotografías, y si bien siempre la intención en este caso era aleatorizar la elección de las células que se medían, siempre puede haber sesgos que puedan alterar los resultados. Esto último debiera mejorar si es que se recurriera a otra herramienta, distinta al criterio de quien hace el experimento, que mida el área de las células, por ejemplo, una posible solución para reducir estos sesgos es el uso de microscopía de fluorescencia y de calceína. La calceína es una sonda fluorescente que se distribuye uniformemente en todo el citoplasma de las células vivas, y su intensidad de fluorescencia es proporcional a la actividad proliferativa de las células (Kennedy et al., 2019). Al utilizar calceína, se pueden tomar fotografías de los campos celulares y luego utilizar un software de análisis de imágenes para medir automáticamente el área de todas las células en cada campo. Este enfoque no solo reduciría el sesgo humano en la selección de células, sino que también permitiría un análisis más eficiente y reproducible de los cambios en la morfología celular bajo condiciones de estrés oxidativo.

Los resultados obtenidos tanto en el estudio del tamaño de los núcleos como en el estudio de la proteína Ki67 en condiciones de estrés oxidativo no muestran un cambio significativo ni en su tamaño ni en su translocación fuera del núcleo, respectivamente. Este resultado es contrario a lo que se observa en otros trabajos (Irvine et al., 2014), en el que mencionan que confirmaron la presencia de un modelo de senescencia en estas células después de, entre otros parámetros, observar una disminución en la expresión de la proteína Ki67. Ahora bien, tanto las concentraciones como los días post-tratamiento después de la medición de este estudio son distintos a los del trabajo de Irvine et al., y en este estudio no fue estudiada la expresión de la proteína, sino más bien su presencia fuera o dentro del núcleo, dado su papel en la mantención de la estructura de los cromosomas durante la división celular.

Algo importante de mencionar también es que hasta ahora para este experimento de translocación de Ki67 no se han determinado controles, como un control positivo de detención del ciclo celular y un control de estímulo de proliferación, lo que podría estar afectando las conclusiones que se obtienen a partir del experimento. Un control positivo para estudiar la detención del ciclo celular podría involucrar el uso de doxorrubicina, un agente quimioterapéutico conocido por inducir la detención del ciclo celular y el daño en el ADN (Tanaka et al., 2013). Para un control de estímulo de proliferación, aumentar la concentración de suero fetal bovino (FBS) en el medio de cultivo celular puede ser una opción adecuada. El FBS contiene factores de crecimiento y nutrientes que promueven la proliferación celular, proporcionando una condición de control de estímulo de proliferación para comparar con otros tratamientos o condiciones que afectan las tasas de proliferación celular.

Por último, en este experimento no se realizaron blancos, los cuales sí debieron haber sido hechos, como el de autofluorescencia, es decir, la muestra sin el anticuerpo secundario, y el de la fluorescencia basal, que es la muestra sin el anticuerpo primario. Los resultados de este experimento no permiten comprobar el objetivo específico número 2 de este trabajo.

Extender el tiempo de exposición de las células a H_2O_2 a 96 horas podría permitir observar una detención efectiva del ciclo celular, dado que la exposición crónica al estrés oxidativo puede inducir senescencia en los hepatocitos (Nakajima et al., 2010). Además, el uso de citometría de flujo podría ser una herramienta valiosa para estudiar la senescencia y la

dinámica del ciclo celular. Esta técnica permite la identificación y cuantificación de células senescentes basándose en la actividad de la β -galactosidasa asociada a la senescencia y la expresión de p16 (Bertolo et al., 2019; Malavolta et al., 2022). La citometría de flujo también puede evaluar los cambios en la progresión del ciclo celular mediante el análisis del contenido de ADN, identificando células detenidas en etapas específicas del ciclo (Biran et al., 2017; Takács-Buia et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, hay otros marcadores que sirven para estudiar el fenotipo secretor asociado a la senescencia, como el aumento de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA β -gal), y los niveles de mRNA de p21, p16 y p53 mediante RT-qPCR. Otros integrantes del laboratorio, con el mismo fin de estandarizar un modelo de senescencia en la línea celular HepG2 con el agente oxidante H₂O₂, llevaron a cabo estudios de estos marcadores.

En este trabajo se observó un cambio en el área de las células significativamente mayor (citomegalia) luego de haber sido tratadas con H₂O₂ a concentraciones de 50 y 100 μ M, siendo el aumento del área celular más significativo a 100 μ M. El mismo resultado fue observado por otro integrante del equipo de investigación, Lautaro Magaña, en el contexto de su tesis “Estudio de las proteínas de comunicación RE-mitocondria en el proceso de senescencia celular” (Figura 8A-B). La tinción histoquímica de la β -galactosidasa es otra forma de detectar células senescentes en el hígado, o, en este caso, en la línea celular HepG2, ya que esta es un marcador enzimático asociado a la senescencia replicativa (Irvine et al., 2014). Después de 72 horas del tratamiento con H₂O₂ a concentraciones de 50 y 100 μ M las células HepG2 muestran un aumento significativo en el área de tinción de β -galactosidasa, en comparación a la condición control (Figura 8C-D). Estos resultados avalan los resultados de este trabajo al proporcionar evidencia adicional de que el tratamiento con H₂O₂ induce características de senescencia celular en la línea celular HepG2.

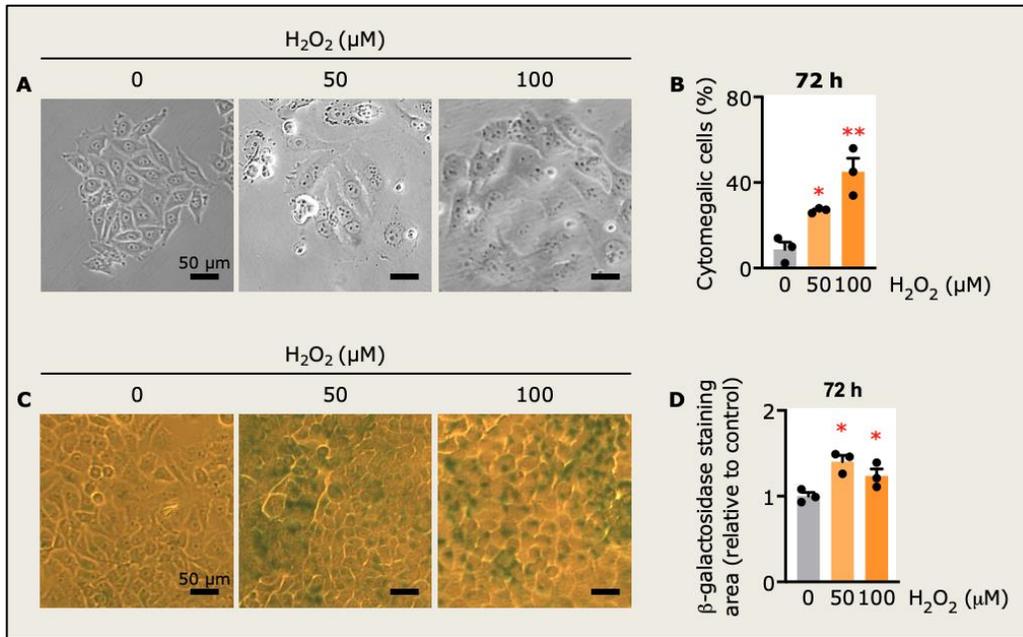


Figura 8. Estudio de la citomegalia y de la β -galactosidasa en células HepG2 bajo condiciones de estrés oxidativo. A. Fotografías de microscopio de campo claro de las células. B. Porcentaje de células citomegálicas en distintas concentraciones de H₂O₂. C. Fotografías de las células HepG2 con el kit colorimétrico del ensayo de β -galactosidasa. D. Área de de la tinción de β -galactosidasa presente en las células en comparación al grupo control, a distintas concentraciones de H₂O₂. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del test Holm-Sidak's. Los gráficos de barras se expresan como media \pm SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ comparados al control. Estos resultados corresponden a una recolección de datos obtenidos en conjunto por Lautaro Magaña, en el contexto de la memoria de título "Estudio de las proteínas de comunicación RE-mitocondria en el proceso de senescencia celular" y por Xavier Vielma, en el contexto de la tesis de magíster titulada "Participación de la comunicación entre retículo endoplásmico y mitocondria en el desarrollo de disfunción mitocondrial durante la senescencia celular inducida por estrés oxidativo".

Todas las señales que inducen senescencia involucran a p53 y/o a p16, y abarcan vías complejas de integración y procesamiento de señales de estrés para inducir y mantener la senescencia. p21, un objetivo transcripcional de p53 y un potente inhibidor del ciclo celular, desempeña un papel crítico en la vinculación de esas dos vías y del mantenimiento de la senescencia (Ben-Porath & Weinberg, 2005; Campisi & Fagagna, 2007). Otros integrantes del laboratorio, Lautaro Magaña y Xavier Vielma en sus tesis "Estudio de las proteínas de comunicación RE-mitocondria en el proceso de senescencia celular" y "Participación de la

comunicación entre el retículo endoplásmico y mitocondria en el desarrollo de disfunción mitocondrial durante la senescencia celular inducida por estrés oxidativo”, respectivamente, con el mismo fin de estudiar marcadores de senescencia celular en HepG2 bajo condiciones de estrés oxidativo, observaron que después de 24 y 72 horas de haber sido tratadas las células HepG2 con distintas concentraciones de H₂O₂, se midieron los niveles de proteínas de p16, p21, y p53, estandarizadas por β-actina, y se encontró que había un aumento significativo de las proteínas p16 y p21 después de las 24 horas (figura 9A-C), y un aumento significativo de p16, p21, y 53 a las 72 horas (figura 9E-H).

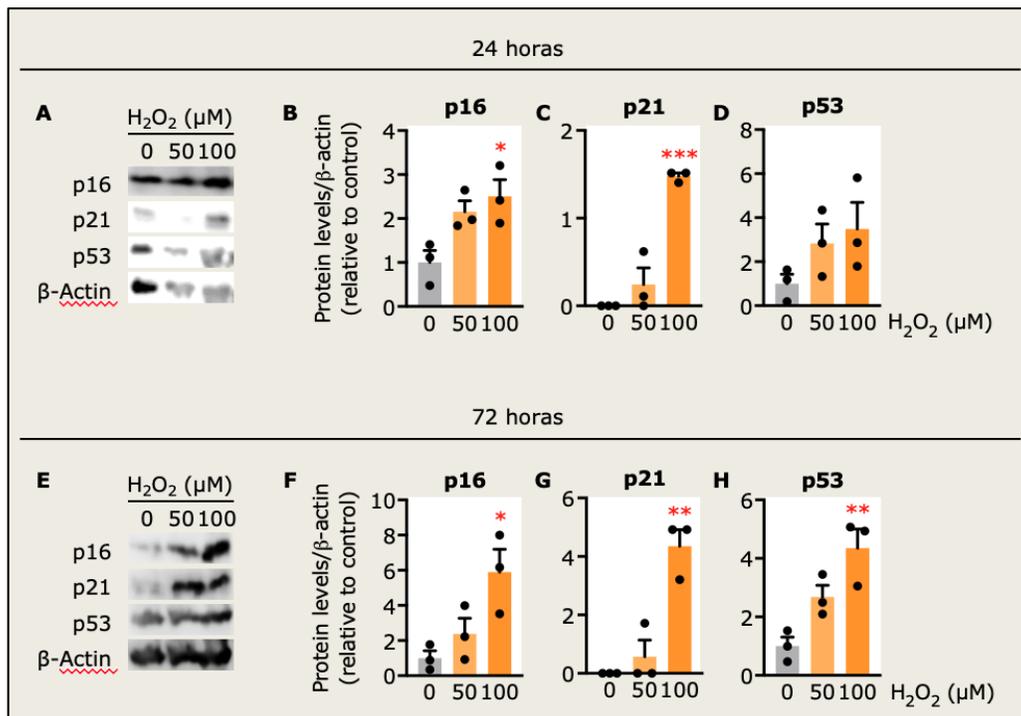


Figura 9. Niveles de proteína p16, p21, y p53, normalizados por β-actina, en células HepG2 tratadas con distintas concentraciones del agente oxidante H₂O₂. A-D. Western blot de proteínas (y sus cuantificaciones) p16, p21, p53 y β-actina 24 horas después de haber sido tratadas durante 1 hora con distintas concentraciones de H₂O₂. E-H. Western blot de proteínas (y sus cuantificaciones) p16, p21, p53 y β-actina 72 horas después de haber sido tratadas durante 1 hora con distintas concentraciones de H₂O₂. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía, seguido del test Holm-Sidak's. Los gráficos de barras se expresan como media ± SEM. * p<0.05 ** p< 0.01 comparados al control. Estos resultados corresponden a una recolección de datos obtenidos en conjunto por Lautaro Magaña, en el contexto de la memoria de título de médico veterinario "Estudio de las

proteínas de comunicación RE-mitocondria en el proceso de senescencia celular" (en desarrollo) y por Xavier Vielma, en el contexto de la tesis de magíster en fisiología titulada "Participación de la comunicación entre retículo endoplásmico y mitocondria en el desarrollo de disfunción mitocondrial durante la senescencia celular inducida por estrés oxidativo" (terminada), ambas desarrolladas en la Universidad de Chile.

En resumen, todos los marcadores de senescencia celular, a excepción de Ki67, que se han estudiado (incluyendo los de este trabajo y los del resto del equipo de investigación) dan cuenta de la presencia de un fenotipo senescente en las células HepG2 después de 72 horas de haber sido tratadas durante 1 hora con el agente oxidante H_2O_2 a concentraciones de 50 y 100 μM , especialmente en esta última concentración, y, por lo tanto, permiten concluir que el propósito de investigación de este trabajo se cumplió.

Para futuras investigaciones, resultaría ideal incorporar controles más rigurosos y explorar otras metodologías de evaluación de senescencia celular. Además, la implementación de otras técnicas en los experimentos realizados, como la cuantificación de muerte celular y el uso de herramientas automatizadas para medir el área celular, podrían resultar en datos más robustos y con menos sesgo.

En el contexto del proyecto de investigación en el que se enmarca este trabajo, el hecho de tener estandarizado el modelo de estudio permitirá hacer los experimentos propuestos para el proyecto, con los cuales se busca esclarecer las señales y los mecanismos que regulan la senescencia celular.

Aunque este trabajo no aporta nuevo conocimiento científico, proporciona una base sólida para la investigación en el campo de la senescencia celular.

7. Conclusiones

Respecto al trabajo planeado en esta memoria de título, los resultados respecto a los objetivos propuestos fueron: (1) se comprobó que el tratamiento con H_2O_2 a concentraciones de 50 y 100 μM durante 1 hora induce citomegalia en células HepG2 después de 72 horas (Objetivo Específico 1); (2) Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la translocación de la proteína Ki67, lo que no permitió confirmar la detención del ciclo celular (Objetivo Específico 2).

En conjunto, los resultados mostrados permiten concluir que el objetivo general de estandarizar un modelo de senescencia celular inducido por H_2O_2 en la línea celular HepG2 fue parcialmente cumplido. El propósito de investigación, que planteaba que el tratamiento agudo con H_2O_2 provocaría tanto citomegalia como detención del ciclo celular, fue parcialmente confirmado, ya que se logró evidenciar la citomegalia como un marcador morfológico de senescencia celular, pero no se pudo confirmar la detención del ciclo celular mediante la translocación de Ki67 en las condiciones experimentales utilizadas.

8. Referencias

- Alessio, N., Aprile, D., Cappabianca, S., Peluso, G., Bernardo, G. D. & Galderisi, U. (2021). Different Stages of Quiescence, Senescence, and Cell Stress Identified by Molecular Algorithm Based on the Expression of Ki67, RPS6, and Beta-Galactosidase Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3102. <https://doi.org/10.3390/ijms22063102>
- (AMUCH)., A. de M. de C. (2017). *Los Adultos Mayores en las Comunas de Chile: Actualidad y Proyecciones*. http://www.amuch.cl/wp-content/uploads/2017/05/ESTUDIO-ADULTO-MAYOR-EN-LAS-COMUNAS-DE-CHILE_-PROYECCIONES.pdf
- Aravinthan, A., Challis, B., Shannon, N., Hoare, M., Heaney, J. & Alexander, G. J. M. (2015). Selective insulin resistance in hepatocyte senescence. *Experimental Cell Research*, 331(1), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.025>
- Aravinthan, A., Shannon, N., Heaney, J., Hoare, M., Marshall, A. & Alexander, G. J. M. (2014a). The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease. *Experimental Gerontology*, 60, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.09.011>
- Aravinthan, A., Shannon, N., Heaney, J., Hoare, M., Marshall, A. & Alexander, G. J. M. (2014b). The senescent hepatocyte gene signature in chronic liver disease. *Experimental Gerontology*, 60, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.09.011>
- BECKMAN, K. B. & AMES, B. N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*, 78(2), 547–581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
- Ben-Porath, I. & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.013>
- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
- Bertolo, A., Baur, M., Guerrero, J., Pötzel, T. & Stoyanov, J. (2019). Autofluorescence is a Reliable in vitro Marker of Cellular Senescence in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Scientific Reports*, 9(1), 2074. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38546-2>
- Biran, A., Zada, L., Karam, P. A., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z. & Krizhanovsky, V. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*, 16(4), 661–671. <https://doi.org/10.1111/acel.12592>
- Booth, D. G., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C. P., Tollervey, D., Earnshaw, W. C. & Vagnarelli, P. (2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *ELife*, 3, e01641. <https://doi.org/10.7554/elife.01641>

Bustos, P., Amigo, H., Vsquez, A. & Vargas, C. (2014). Evolucion del sndrome metablico y de sus componentes en un seguimiento de 10 aos en adultos de la Regin de Valparaso. *Revista Mdica de Chile*, 142(5), 579–586. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872014000500005>

Campisi, J. & Fagagna, F. d'Adda di. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>

Chang, A. Y., Skirbekk, V. F., Tyrovolas, S., Kassebaum, N. J. & Dieleman, J. L. (2019). Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet. Public Health*, 4(3), e159–e167. [https://doi.org/10.1016/s2468-2667\(19\)30019-2](https://doi.org/10.1016/s2468-2667(19)30019-2)

Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11), 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>

Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J. & Deursen, J. M. van. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>

Chile., I. N. de Estadísticas. (2021). *Anuario de estadísticas vitales, 2019. Período de información: 2019*. https://www.ine.cl/docs/default-source/nacimientos-matrimonios-y-defunciones/publicaciones-y-anuarios/anuarios-de-estad%C3%ADsticas-vitales/anuario-de-estad%C3%ADsticas-vitales-2019.pdf?sfvrsn=97729b7b_5

Cui, H., Kong, Y. & Zhang, H. (2012). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Journal of Signal Transduction*, 2012, 646354. <https://doi.org/10.1155/2012/646354>

Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A. A. & Gerlich, D. W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature18610>

Dara, L., Ji, C. & Kaplowitz, N. (2011). The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology*, 53(5), 1752–1763. <https://doi.org/10.1002/hep.24279>

Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M. & Salvioli, S. (2017). Inflammaging and 'Garb-aging.' *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.09.005>

González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Muñoz-Espín, D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal*, 288(1), 56–80. <https://doi.org/10.1111/febs.15570>

Han, Q., Guo, J., Gong, L., Liu, C. & Zhang, F. (2023). Analysis of the detection rate and related factors of fatty liver disease in physical examination of healthy population in Chengdu district. *Medicine*, 102(36), e35087. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000035087>

Hardy, T., Oakley, F., Anstee, Q. M. & Day, C. P. (2015). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), 1–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044224>

Herranz, N. & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1172/jci95148>

Hooser, A. A. V., Yuh, P. & Heald, R. (2005). The perichromosomal layer. *Chromosoma*, 114(6), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0021-9>

Irvine, K. M., Skoien, R., Bokil, N. J., Melino, M., Thomas, G. P., Loo, D., Gabrielli, B., Hill, M. M., Sweet, M. J., Clouston, A. D. & Powell, E. E. (2014). Senescent human hepatocytes express a unique secretory phenotype and promote macrophage migration. *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), 17851–17862. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17851>

Iwasa, H., Han, J. & Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells*, 8(2), 131–144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00620.x>

Kennedy, D., Cronin, U. P., Piterina, A. & Wilkinson, M. G. (2019). Heat and Chemical Treatments Affect the Viability, Morphology, and Physiology of *Staphylococcus aureus* and Its Subsequent Antibody Labeling for Flow Cytometric Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(17). <https://doi.org/10.1128/aem.01006-19>

Leiva, A. M., Troncoso-Pantoja, C., Martnez-Sanguinetti, M. A., Nazar, G., Concha-Cisternas, Y., Martorell, M., Ramirez-Alarcón, K., Petermann-Rocha, F., Cigarroa, I., Daz, X. & Celis-Morales, C. (2020). Personas mayores en Chile: el nuevo desafío social, económico y sanitario del Siglo XXI. *Revista Médica de Chile*, 148(6), 799–809. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872020000600799>

Lewinska, A., Wnuk, M., Slota, E. & Bartosz, G. (2007). TOTAL ANTI-OXIDANT CAPACITY OF CELL CULTURE MEDIA. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34(8), 781–786. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04637.x>

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757–772. <https://doi.org/10.2147/cia.s158513>

Liu, Q., Bengmark, S. & Qu, S. (2010). The role of hepatic fat accumulation in pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in Health and Disease*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1476-511x-9-42>

Malavolta, M., Giacconi, R., Piacenza, F., Strizzi, S., Cardelli, M., Bigossi, G., Marcozzi, S., Tiano, L., Marcheggiani, F., Matakchione, G., Giuliani, A., Olivieri, F., Crivellari, I., Beltrami, A. P., Serra, A., Demaria, M. & Provinciali, M. (2022). Simple Detection of Unstained Live Senescent Cells with Imaging Flow Cytometry. *Cells*, 11(16), 2506. <https://doi.org/10.3390/cells11162506>

Matheson, T. D. & Kaufman, P. D. (2017). The p150N domain of chromatin assembly factor-1 regulates Ki-67 accumulation on the mitotic perichromosomal layer. *Molecular Biology of the Cell*, 28(1), 21–29. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-09-0659>

McHugh, D. & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65–77. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708092>

MINSAL (2018) *Segundos resultados de Encuesta Nacional de Salud 2016-2017*. Accedido en <http://epi.minsal.cl/resultados-encuestas/> el 16 de marzo de 2024. (n.d.).

Nakajima, T., Nakashima, T., Okada, Y., Jo, M., Nishikawa, T., Mitsumoto, Y., Katagishi, T., Kimura, H., Itoh, Y., Kagawa, K. & Yoshikawa, T. (2010). Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: Comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry. *Pathology International*, 60(3), 175–183. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2009.02504.x>

Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonja, T., Tiniakos, D., Wilson, C. L., Lahat, A., Day, C. P., Burt, A., Palmer, A., Anstee, Q. M., Grellescheid, S. N., Hoeijmakers, J. H. J., Barnhoorn, S., Mann, D. A., Bird, T. G., Vermeij, W. P., Kirkland, J. L., Passos, J. F., Zglinicki, T. von & Jurk, D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications*, 8(1), 15691. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>

Organization, W. H. (2017). *Global strategy and action plan on ageing and health*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329960/9789241513500-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Papatheodoridi, A., Chrysavgis, L., Koutsilieris, M. & Chatzigeorgiou, A. (2020). The Role of Senescence in the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Progression to Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, 71(1), 363–374. <https://doi.org/10.1002/hep.30834>

Pathmanathan, N. & Balleine, R. L. (2013). Ki67 and proliferation in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 66(6), 512. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201085>

Peng, K.-Y., Watt, M. J., Rensen, S., Greve, J. W., Huynh, K., Jayawardana, K. S., Meikle, P. J. & Meex, R. C. R. (2018). Mitochondrial dysfunction-related lipid changes occur in nonalcoholic fatty liver disease progression. *Journal of Lipid Research*, 59(10), 1977–1986. <https://doi.org/10.1194/jlr.m085613>

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

Poggiogalle, E., Donini, L. M., Lenzi, A., Chiesa, C. & Pacifico, L. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease connections with fat-free tissues: A focus on bone and skeletal muscle. *World Journal of Gastroenterology*, 23(10), 1747–1757. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i10.1747>

Reinhardt, H. C. & Schumacher, B. (2012). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in Genetics*, 28(3), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.12.002>

Roger, L., Tomas, F. & Gire, V. (2021). Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13173. <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>

Schafer, M. J., Miller, J. D. & LeBrasseur, N. K. (2017). Cellular senescence: Implications for metabolic disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 455, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.047>

Silva, I. dos S., Souza, L. P., Pereira, P. G., Carvalho, J. J. de, Moreno, A. M., Castro-Faria-Neto, H. C., Siqueira, R. de A., d'Avila, J. da C. & Carlos, A. S. (2022). Combination of a Glucagon-Like Peptide 1 Analog and a Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Improves Lipid Metabolism Compared to the Monotherapies in Experimental Metabolic Syndrome. *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 12(6), 168–177. <https://doi.org/10.14740/jem843>

Sobecki, M., Mrouj, K., Camasses, A., Parisis, N., Nicolas, E., Llères, D., Gerbe, F., Prieto, S., Krasinska, L., David, A., Eguren, M., Birling, M.-C., Urbach, S., Hem, S., Déjardin, J., Malumbres, M., Jay, P., Dulic, V., Lafontaine, D. L., ... Fisher, D. (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *ELife*, 5, e13722. <https://doi.org/10.7554/elife.13722>

Sohal, R. S. & Weindruch, R. (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science*, 273(5271), 59–63. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.59>

Takács-Buia, L., Iordachel, C., Efimov, N., Caloianu, M., Montreuil, J. & Bratosin, D. (2008). Pathogenesis of osteoarthritis: Chondrocyte replicative senescence or apoptosis? *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 74B(6), 356–362. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20428>

Tanaka, T., Okada, M., Hozumi, Y., Tachibana, K., Kitanaka, C., Hamamoto, Y., Martelli, A. M., Topham, M. K., Iino, M. & Goto, K. (2013). Cytoplasmic localization of DGK ζ exerts a protective effect against p53-mediated cytotoxicity. *Journal of Cell Science*, 126(13), 2785–2797. <https://doi.org/10.1242/jcs.118711>

Tchkonia, T., Zhu, Y., Deursen, J. van, Campisi, J. & Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 966–972. <https://doi.org/10.1172/jci64098>

Wijayasiri, P., Astbury, S., Kaye, P., Oakley, F., Alexander, G. J., Kendall, T. J. & Aravinthan, A. D. (2022). Role of Hepatocyte Senescence in the Activation of Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis Progression. *Cells*, 11(14), 2221. <https://doi.org/10.3390/cells11142221>