

¿Porqué envejecemos? Y otras historias

DR © 2016 por

Red Temática Envejecimiento, Salud y Desarrollo Social

CONACYT

Instituto Nacional de Geriátría

Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa

ISBN: 978-607-460-536-5

Primera Edición 2016.

Ciudad de México.

México.

La edición de este libro fue apoyada por los fondos de la Red Temática Envejecimiento, Salud y Desarrollo Social, CONACYT. No. 269261

Dr. Luis Miguel Gutiérrez Robledo

Director del Instituto Nacional de Geriátría.

Representante Legal de la Red Temática Envejecimiento Salud y Desarrollo Social.

CONACYT

Dra. María del Carmen García Peña

Directora de Investigación del Instituto Nacional de Geriátría.

Representante Técnico de la Red Temática Envejecimiento Salud y Desarrollo Social.

CONACYT

El libro fue avalado y aprobado por el Consejo Editorial de la Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. División Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS)

Dra. Edith Ponce Alquicira

Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Iztapalapa

Dra. Alda Rocío Ortíz Muñiz.

Coordinadora del Consejo Editorial de la División Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS)

Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Iztapalapa

COLABORADORES

Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Lerma

Toluca, Estado de México

Dr. Armando Aranda Anzaldo

Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma del Estado de México.

Estado de México

Dra. Susana Castro Obregón

Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad de México

M. en C. Ana Laura Colín-González

Laboratorio de Aminoácidos Excitadores

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Ciudad de México

Biol. Amb. Miguel Condés Carrillo

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Lerma

Estado de México

Dra. Elizabeth P. Crowe

Department of Pathology and Laboratory Medicine

Drexel University College of Medicine

Filadelfia, Pensilvania, EUA.

Dra. Laura del Bosque Plata

Laboratorio Nutrigenética y Nutrigenómica

Instituto Nacional de Ciencias Genómicas

Ciudad de México

Carmen de Mendizábal Abellán

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana.

Unidad Lerma

Estado de México

ÍNDICE

Capítulo 1. Historia de las Explicaciones al Envejecimiento y de los Intentos por Evitarlo.	1
Capítulo 2. Genociencia: la última frontera en salud.	23
Capítulo 3. El envejecimiento y las enfermedades comunes de nuestra sociedad.	43
Capítulo 4. Teoría del Envejecimiento por estrés oxidante, ¿Dónde estamos? Antioxidantes: ¿la fuente de la eterna juventud?	57
Capítulo 5. Envejecimiento y hormesis: enseñando al cuerpo a contrarrestar el estrés.	75
Capítulo 6. Las proteínas pueden agregarse. ¿Cómo nos afecta eso?	87
Capítulo 7. La inflamación como una de las causas de envejecimiento.	105
Capítulo 8. La célula senescente y su entorno.	115
Capítulo 9. Senescencia celular y envejecimiento del organismo: una reseña crítica.	135
Capítulo 10. Diabetes y envejecimiento.	159
Capítulo 11. Bebé saludable-vida saludable.	177
Capítulo 12. Enfermedades Neurodegenerativas durante la tercera edad.	205
Capítulo 13. Cambios biológicos que acompañan al cerebro durante el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas.	217
Capítulo 14. Músculo esquelético del nacimiento a la vejez, rutas hacia la falla mecánica y metabólica.	237
Capítulo 15. Restricción Calórica: comer o no comer ¿Viviremos más?	255
Capítulo 16. Regeneración y rejuvenecimiento ¿Será posible?	265
Capítulo 17. Realidades, expectativas y planificación para la vejez en México. Perspectivas de adultos pensando en su futura situación de adulto mayor.	277
Corolario. El privilegio de la vida y la vejez.	303

Capítulo 9

Senescencia celular y envejecimiento del organismo: una reseña crítica.

*Dr. Armando Aranda Anzaldo
Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma del Estado de México.
Toluca, Estado de México*

En las primeras décadas del siglo veinte, en el Instituto Rockefeller de la ciudad de Nueva York, el médico e investigador de origen francés Alexis Carrel desarrolló con éxito un método para cultivar células de pollo en el laboratorio. Carrel gozaba de enorme prestigio internacional pues había recibido en 1912 el premio Nobel de Medicina por sus trabajos sobre cirugía vascular y ahora quería desarrollar métodos que hicieran posible el transplante de tejidos con fines terapéuticos. Por esta razón estaba experimentando con células en cultivo. Las células de pollo parecían proliferar en forma indefinida sin mostrar cambios observables que sugirieran una alteración mayor de sus propiedades fenotípicas o sea de sus propiedades morfológicas y fisiológicas observables. Carrel transfirió la responsabilidad del cultivo de las células a uno de sus ayudantes, Albert Ebeling, que al final de su carrera científica afirmó haber cultivado dichas células durante 34 años consecutivos sin observar pérdida de la capacidad proliferante de las mismas. En 1943 Earle demostró que células de ratón transformadas experimentalmente a un fenotipo tumoral maligno podían ser cultivadas en forma indefinida, lo que parecía corroborar la propiedad inmortal de las células en general. Así, surgió en la comunidad científica un consenso o paradigma en el sentido de que los organismos mortales estaban constituidos de células potencialmente inmortales. Con base en dicho paradigma era obvio que el problema del envejecimiento del organismo tenía que ser abordado desde una perspectiva orgánica y no celular. Por lo tanto, durante la primera mitad del siglo veinte, estuvieron de moda y fueron sujeto de elaboración experimental las teorías biológicas del envejecimiento que privilegiaban un enfoque sistémico o fisiológico como lo evidencia el descubrimiento, por McCay y colaboradores, de que la restricción sistemática de calorías en la dieta resulta en un incremento de la longevidad promedio y de la longevidad máxima en ratas de laboratorio, observación que ha sido confirmada a lo largo de los años en diversos modelos animales tanto vertebrados como invertebrados, aunque no en el caso de los primates.

En 1961, Hayflick y Moorhead publicaron, no sin gran dificultad, un extenso

artículo científico que ponía en duda el paradigma dominante, pues trabajando con fibroblastos de embriones humanos y utilizando técnicas mejoradas de cultivo, establecieron que las células normales presentaban un límite de su potencial proliferante equivalente a unas 50 divisiones celulares, mismo que una vez agotado conducía a las células a un estado de quiescencia o arresto proliferativo permanente. Para 1965 existía ya amplia evidencia que apoyaba las observaciones de Hayflick y Moorhead y así surgió el concepto del límite de Hayflick como una propiedad intrínseca de las células de mamífero y quizá de los vertebrados en general, mismo que correspondía a un número determinado y consistente de divisiones celulares, de acuerdo al tipo celular y organismo de origen, que constituía un límite absoluto al potencial proliferante de las células normales. Con base en la evidencia experimental y estableciendo un contraste con el comportamiento "inmortal" de las células malignas en cultivo, se empezó a utilizar el término operacional de senescencia celular o senescencia replicativa (SR) para referirse al arresto permanente de las células en cultivo que habían llegado a su límite de Hayflick.

La introducción del concepto de senescencia celular sugirió, por analogía, que existía una relación entre la senescencia de las células y la senescencia del organismo. Desde la perspectiva de la lógica esta analogía permitía eliminar una paradoja incómoda que estaba en la base del antiguo paradigma: organismos mortales compuestos de células inmortales. En el nuevo contexto cabía la hipótesis de que el envejecimiento del organismo pudiera estar vinculado al agotamiento progresivo del potencial proliferante de las células en los tejidos. Por otra parte, considerando la evidencia de que la incidencia de cáncer se incrementa en función de la edad, el nuevo contexto también daba lugar a otra hipótesis interesante: en su origen el cáncer sería una consecuencia de alteraciones que permitieran a las células rebasar el límite de Hayflick y alcanzar la condición inmortal, como paso inicial e indispensable para el desarrollo de los tumores. Ambas hipótesis eran atractivas y elegantes pero además, ambas hipótesis hacían posible investigar tanto el envejecimiento como la carcinogénesis in vitro,

bajo rigurosas condiciones de laboratorio, analizando lo que ocurría con las células en cultivo llevadas a la SR o a la inmortalización bajo la influencia de diversos factores y estímulos. Implícita en ambas hipótesis estaba la necesidad de que existiera un sensor intracelular capaz de conservar la memoria del número previo de divisiones celulares. Así, la búsqueda y caracterización molecular de tal "replicómetro" era uno de los objetivos principales de estas hipótesis.

Durante dos décadas (1965-1985) diversos autores a lo largo y ancho del mundo documentaron evidencia que apoyaba la correlación entre envejecimiento orgánico y senescencia celular. Por ejemplo, numerosos estudios documentaron una correlación negativa entre el potencial proliferante de las células y la edad cronológica de los donadores de tales células, lo que parecía cimentar la idea de que envejecemos porque nuestras células pierden la capacidad de dividirse y por lo tanto de renovar nuestros tejidos. Por otra parte, una multitud de estudios de laboratorio establecieron que existen múltiples y diversos agentes físicos, químicos y biológicos (ej: virus) capaces de inducir la inmortalización de células en cultivo y su subsecuente transformación a un fenotipo similar al exhibido por las células de tumores malignos en condiciones de cultivo. Así, los resultados de ambas líneas de investigación parecían converger y afirmar las bases moleculares y celulares del envejecimiento y la carcinogénesis.

Sin embargo, también existe otra evidencia que fue sistemáticamente ignorada en el proceso que llevó a la consolidación del paradigma científico que establecía a la senescencia celular como fundamento de la senescencia orgánica. Dicha evidencia consiste en el hecho de que órganos y tejidos muy importantes están constituidos en buena medida por células quiescentes, que son incapaces de proliferar y dividirse. Tales células, como las neuronas del cerebro, los cardiomiocitos del corazón y los miotubos del músculo estriado, pueden permanecer quiescentes por décadas, desarrollando sus funciones especializadas que son fundamentales para el organismo. En el humano el músculo estriado es el mayor componente tisular del cuerpo, las neuronas corresponden al 82% de

masa del cerebro y los cardiomiocitos constituyen la parte mayor de la masa del corazón. Sin embargo, estos tres tipos de células pierden la capacidad de dividirse desde etapas embrionarias o en etapas postnatales muy tempranas, asumiendo la condición post-mitótica en forma estable y permanente. La evidencia disponible desde hace mucho tiempo indica que estos tres tipos celulares no requieren de la división celular como condición necesaria para permanecer funcionales por largo tiempo y por lo tanto, el envejecimiento de estos tejidos u órganos no puede explicarse en función de una pérdida de la capacidad de proliferación celular en células que ya de por sí son post-mitóticas.

Por otra parte, estudios poblacionales del envejecimiento, utilizando como modelo a la mosca *Drosophila melanogaster*, pusieron en evidencia que la longevidad podía ser sujeto de selección bajo condiciones de laboratorio de manera que existen cepas de moscas longevas y cepas de moscas con vidas medias reducidas. Sin embargo, esos estudios también permitieron establecer que el envejecimiento, medido como incremento en la tasa de mortalidad en función del tiempo, varía en forma estocástica aún entre individuos genéticamente idénticos. Las moscas adultas están constituidas fundamentalmente por células post-mitóticas incapaces de dividirse y sin embargo, al igual que el humano presentan el fenómeno de envejecimiento orgánico que ocurre en forma inexorable pero también aleatoria. Por otra parte, desde hace mucho tiempo se sabe que el proceso natural de diferenciación celular, mediante el cual células pluripotenciales e indiferenciadas son capaces de dar origen a distintos tipos o estirpes celulares especializados, se correlaciona con la pérdida progresiva de la capacidad proliferativa de las células, de manera que la propiedad compartida por todas las células que han concluido su programa de diferenciación (células terminalmente diferenciadas) es la condición post-mitótica que sin embargo es compatible con largos periodos de vida celular activa, como lo demuestra el caso de neuronas y cardiomiocitos. Desde los años setenta del siglo pasado existe evidencia de que la pérdida permanente de capacidad proliferativa de las células normales in vitro no es obligatoriamente equivalente a una condición

senescente sino más bien a una recapitulación en cultivo del proceso normal de diferenciación celular in vivo.

La evidencia que establece la correlación negativa entre diferenciación y capacidad de proliferación celular está detrás de la necesidad teórica de postular la existencia de células troncales o células madre en los tejidos renovables de animales postnatales. Dichas células deben estar dotadas de un potencial proliferante muy amplio o indefinido y de la capacidad de división celular asimétrica, en el sentido de que después de la división celular una de las células resultantes retiene el potencial proliferativo y la condición indiferenciada mientras que la otra adquiere un fenotipo diferenciado final o parcial que se asocia con un potencial proliferante nulo o limitado. Actualmente existe evidencia de que hay pequeñas poblaciones de células madre en los tejidos de organismos adultos y que tales células son fundamentales para los procesos de recambio y reparación de los tejidos.

A principios de los años setenta del siglo pasado Hayflick intentó reproducir sus experimentos originales que habían conducido al nuevo paradigma de la senescencia celular como una propiedad genérica de las células normales. En los nuevos experimentos Hayflick añadió el control de una variable muy importante que había pasado desapercibida: estableció clonas celulares o sea poblaciones de células genéticamente idénticas, cada población o clona derivada a partir de un solo fibroblasto en particular, y procedió a evaluar la capacidad proliferante de tales clonas en cultivo. Estos experimentos le permitieron apreciar que células provenientes de una misma célula ancestral poseían sin embargo capacidades replicativas (proliferantes) completamente diversas e impredecibles, de manera que algunas células solamente podían dividirse unas cuantas veces antes de llegar a la SR mientras que otras podían alcanzar decenas de divisiones celulares. Luego entonces, el límite de Hayflick no correspondía al promedio de divisiones celulares alcanzable por la mayoría de células en una población de fibroblastos, sino que corresponde al número máximo de divisiones celulares alcanzable por

aquellas células dotadas, en forma completamente aleatoria, de un mayor potencial proliferante. Estos resultados pusieron en evidencia la existencia de un senescencia celular estocástica (SE) que no guarda relación con el número previo de divisiones celulares. Por lo tanto, el subcultivo y pasaje seriado de células en el laboratorio implica una selección involuntaria de las células que retienen una capacidad proliferante, pues las células que se encuentran en senescencia replicativa ya no pueden contribuir individuos a la generación siguiente. Hayflick asumió estos nuevos resultados que contradecían sus antiguas conclusiones y por lo tanto se dio cuenta de que la heterogeneidad del potencial proliferante observada en células genéticamente idénticas, impedía establecer correlaciones claras entre los cambios fenotípicos (a nivel bioquímico y morfológico) previamente asociados con un supuesto envejecimiento celular in vitro y la capacidad de tales células para proliferar. Así, cualquier mecanismo molecular responsable de establecer o determinar el potencial proliferante de las células in vitro no podía estar basado simplemente en el número previo de divisiones celulares, de manera que era innecesaria si no es que inútil continuar la búsqueda del elusivo "replicómetro".

Semejantes resultados propiciaron que diversos investigadores decidieran reexaminar la evidencia que sugería un vínculo entre la fenomenología observada en las células que perdían su capacidad proliferativa en cultivo y el envejecimiento del organismo entero. La hipótesis de la senescencia celular como correlato causal del envejecimiento implica que las células de individuos jóvenes o de individuos añosos deben poseer ya diferencias fenotípicas apreciables, producto de su historial previo de división celular in vivo, que recapitulan los cambios observados en células de origen embrionario pero cultivadas en forma seriada in vitro. Estos cambios que conforman el fenotipo de la senescencia o envejecimiento celular en cultivo son: incremento del volumen celular, adopción de una morfología irregular, incremento y desbalance de la cantidad de proteína y ácidos nucleicos, presencia de numerosos y diversos cuerpos de inclusión al interior de las células y un incremento de la actividad secretora de

las mismas. Así, nuevos experimentos realizados bajo condiciones más rigurosas de seguimiento y propagación de las células en cultivo permitieron establecer que los cambios fenotípicos observados en función del número de divisiones celulares en cultivo no se observan o no están presentes en la misma magnitud en células que provienen de donadores con edades cronológicas supuestamente equivalentes a pocos o muchos pasajes en cultivo. Sin embargo, se encontró que los cambios fenotípicos se correlacionan con el número de pasajes celulares en cultivo, independientemente de si las células originales provienen de un embrión, de un adolescente o de un viejo.

En 1990 aparecieron dos artículos en la influyente revista *Nature* que revitalizaron la antigua hipótesis del replicómetro y la noción de que el envejecimiento del organismo tiene una base en la senescencia celular. Uno de los trabajos presentaba evidencia de que en fibroblastos humanos los telómeros muestran un acortamiento de su longitud en función del número de divisiones celulares en cultivo. Cabe señalar que los telómeros son estructuras ubicadas en los extremos de los cromosomas y que impiden la separación de las dos hebras o filamentos entrelazados que constituyen la larga molécula de ADN correspondiente a cada cromosoma. El otro trabajo presentaba evidencia de que en células humanas postnatales la longitud de los telómeros es más corta en comparación a la longitud dichos telómeros en células del embrión y que la magnitud de tal acortamiento es directamente proporcional a la edad del individuo donador. De manera que en células de ancianos el acortamiento de los telómeros llegaba a valores críticos que posiblemente ponían en riesgo la estabilidad estructural de los cromosomas. Este hallazgo sugería que al fin se había encontrado el elusivo replicómetro que no era otra cosa que la longitud de los telómeros que se iban acortando gradualmente en función del número previo de divisiones celulares.

En 1985 Blackburn y Greider publicaron el primero de una serie de artículos que permitieron la caracterización de la enzima telomerasa. La telomerasa es la responsable de sintetizar los telómeros de los cromosomas, constituidos por

por múltiples copias de una secuencia de seis pares de bases, el número de copias, repetidas en tándem, varía de cientos a miles de veces dependiendo de la especie. Dicha secuencia y la forma como se replica por acción de la telomerasa permite formar estructuras en forma de bucle. Estos bucles teloméricos actúan como protección para el ADN cromosómico pues de esta manera no presenta extremos libres que puedan ser fusionados accidentalmente o degradados por las nucleasas celulares. Sin embargo, en ausencia de esta enzima los telómeros se acortan progresivamente con cada división celular ya que no pueden ser sintetizados por las ADN polimerasas encargadas de replicar el resto del cromosoma. Trabajos posteriores establecieron que en las células de los tejidos somáticos de humanos postnatales la actividad de la telomerasa es prácticamente inexistente, lo que en principio conlleva al acortamiento progresivo de los telómeros durante las divisiones celulares que ocurran en el periodo postnatal. Por el contrario, en las células embrionarias, en las células germinales así como también en las células madre o células precursoras presentes en los tejidos adultos, la actividad de la telomerasa está continuamente presente lo que permite que estas células se dividan sin presentar acortamiento de los telómeros. Todo esto se integró en un nuevo paradigma: las células dotadas de capacidad proliferativa indefinida deben poseer una telomerasa activa y solamente las células sin telomerasa activa pueden presentar el límite de Hayflick. Por otra parte, las células cancerosas que manifiestan un fenotipo inmortal deberían reactivar la telomerasa o tener algún mecanismo alternativo para reponer los telómeros. La evidencia de que en tumores malignos avanzados es frecuente la reactivación de la enzima telomerasa parecía confirmar este paradigma. Estos resultados estimularon la investigación para identificar las vías y mecanismos moleculares por los cuales el acortamiento de los telómeros induce la SR.

La erosión de los telómeros constituye una perturbación importante de la estructura del ADN cromosómico y hay sensores moleculares que detectan dicha erosión como evidencia de estrés genómico, pues existe el riesgo de que la ausencia del bucle terminal protector o la reducción crítica de la longitud del

telómero sean consideradas como equivalentes a una ruptura de las dos hebras del ADN. Este tipo de lesiones, que son las más graves que puede sufrir un cromosoma, se reparan mediante el mecanismo de recombinación no homóloga que resulta en la fusión entre fragmentos de ADN a partir de sus extremos libres. Por lo tanto, la erosión de los telómeros en cromosomas vecinos puede resultar en la fusión de tales cromosomas mediante el mecanismo de recombinación no homóloga y esto puede tener serias consecuencias para la fisiología celular. Por otra parte, si el daño genómico es potencialmente mayor a la capacidad de los sistemas de reparación entonces los sensores moleculares pueden activar procesos que resultan en la muerte celular programada (apoptosis). Así, la inhibición estable de la progresión del ciclo celular y por lo tanto de la mitosis (senescencia celular) resultado de vías moleculares activadas por los sensores de estrés genómico y celular, permite preservar la vida celular a expensas de la capacidad proliferante de la célula afectada.

Para la segunda mitad del siglo veinte el ratón de laboratorio se había convertido ya en el modelo más utilizado para los estudios experimentales relevantes a la biología de los mamíferos. Por lo tanto, fueron numerosos los trabajos que estudiaron el fenómeno de la SR en células de ratón. La evidencia mostraba que los fibroblastos de ratón en cultivo tienen un potencial proliferante significativamente menor al de los fibroblastos humanos, pues alcanzaban la senescencia replicativa después de un número reducido (< 20) de duplicaciones de la población celular (PDs por sus siglas en inglés) y esto se interpretaba como un fenómeno congruente con el hecho de que los ratones tienen una vida muy corta (2 a 3 años en condiciones de laboratorio) en comparación al ser humano. Sin embargo, en los ratones de las cepas utilizadas en laboratorio los repetidos teloméricos de los cromosomas respectivos son mucho más largos que los observados en células de humano y a pesar de ello las células de ratón en cultivo presentan una senescencia prematura en comparación a las células humanas. Por otra parte, se encontró que la enzima telomerasa permanece activa en los tejidos somáticos del ratón por lo cual los telómeros no sufren un acortamiento

significativo previo a cada división celular. Por lo tanto, el acortamiento de los telómeros no podía ser la explicación de la senescencia de las células de ratón en cultivo. Así, la inactivación experimental del gen de la enzima telomerasa desde etapas embrionarias no tuvo efecto en la longevidad de los ratones resultantes. Fue hasta la sexta generación de ratones que descendían a su vez de ratones con telomerasa inactiva cuando aparecieron signos de envejecimiento prematuro y eventualmente una reducción de la longevidad en los ratones afectados. Estudios posteriores demostraron que la longitud de los telómeros es muy variable, aún entre los cromosomas de individuos de la misma especie, y su longitud también varía en función del cromosoma y del tipo celular. Otros estudios permitieron establecer que los ratones silvestres tienen telómeros mucho más cortos que los ratones de laboratorio y esto no tiene ningún impacto en la longevidad de los animales, ya que bajo condiciones de laboratorio las cepas de ratones con telómeros cortos tienen longevidades muy similares a las de cepas de ratones con telómeros largos.

En 1998 el grupo de Cristofalo publicó un importante trabajo en el cual se hacía una reevaluación rigurosa de la relación entre la edad cronológica de los donadores y la capacidad replicativa de sus células en cultivo. Los resultados fueron contundentes y no se encontró ninguna correlación entre la capacidad replicativa (número potencial de divisiones celulares) de fibroblastos humanos y la edad cronológica de sus donadores, poniendo una vez más en duda que la senescencia celular es la base del envejecimiento del organismo. Sin embargo, un problema importante para evaluar la presencia de células senescentes es la falta de marcadores moleculares que sean específicos del estado senescente. En 1995 Dimiri y colaboradores reportaron que en células senescentes en cultivo se podía detectar actividad de la enzima beta-galactosidasa en condiciones ácidas (pH 6.0) mediante el uso de un sustrato (X-gal) que resulta en color azul cuya intensidad es proporcional a la actividad de la enzima. Este proceso permite identificar a las células senescentes por su color azul, de manera que se acuñó el término SA-beta-gal (*senescence-associated beta galactosidase*) para referirse

a esta actividad enzimática que se suponía específica del estado senescente. Así, durante diez años este marcador fue ampliamente utilizado para identificar células senescentes tanto en cultivo como en biopsias de tejidos. Sin embargo, algunos autores ya habían hecho notar que en los lisosomas celulares es normal encontrar una beta-galactosidasa que funciona óptimamente en el ambiente ácido propio de los lisosomas, y que la actividad de esta enzima aumenta en las células quiescentes. En 2005-2006 quedó plenamente demostrado que SA-beta-gal era en realidad la beta-galactosidasa lisosomal cuyo pH óptimo es 4.5 y cuya actividad aumenta en cualquier tipo de célula que se encuentre en un estado quiescente y por lo tanto no corresponde a un marcador específico de la senescencia celular.

Sin embargo, en la década previa, diversos estudios que utilizaron SA-beta-gal como marcador de senescencia habían permitido establecer que diversos factores causales de estrés celular como son: daño al ADN, estrés oxidativo, exceso de mitógenos (factores que estimulan la proliferación celular), deficiencia de nutrientes en el medio de cultivo y el cultivo forzado de células en suspensión en lugar de cultivarlas adheridas a una superficie sólida, eran capaces de inducir un arresto celular permanente que ocurría en forma independiente al número previo de divisiones celulares. Dado que las células expuestas a estos agentes manifiestan un fenotipo similar al de las células en SR y además expresan el marcador SA-beta-gal, se decidió nombrar a esta condición como senescencia prematura inducida por estrés (SIPS por sus siglas en inglés). Por otra parte, la expresión forzada y muy elevada de algunos genes que en modelos experimentales se asocian con el desarrollo de cáncer (oncogenes) también ocasiona un arresto celular permanente y fenotípicamente similar a la SR por lo cual se acuñó el término senescencia inducida por oncogenes (OIS por sus siglas en inglés). La caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en estos procesos estableció que varios sensores y efectores moleculares, producto de genes específicos, eran compartidos por la SR, la SIPS y la OIS, indicando que existe una red molecular común encargada de operar el fenómeno de la senescencia

celular sin importar el agente causal original. En los hechos las principales proteínas involucradas en el fenómeno de senescencia celular ya habían sido previamente caracterizadas como participantes en la detección de daño genómico, la estimulación de los mecanismos de reparación del ADN, el control de la progresión del ciclo celular y la inducción de la muerte celular programada (apoptosis) bajo condiciones de daño genómico severo. Dichas proteínas y los productos secundarios de su actividad podían ser detectados en las células afectadas y así, empezaron a definir una batería de marcadores moleculares de la senescencia celular, de manera que además de SA-beta-gal se empezaron a utilizar "cocteles" de marcadores moleculares para establecer la condición senescente de las células ya sea en el laboratorio o en biopsias de tejido.

Mediante el uso combinado de tales marcadores se estableció que durante el desarrollo de tumores malignos, inducidos en ratones de laboratorio mediante la expresión artificial y muy elevada de ciertos oncogenes, aparecían células senescentes en las lesiones tempranas previas a la aparición de los tumores invasores que a su vez se caracterizaban por la ausencia de células senescentes. Por otra parte, estudios con fibroblastos murinos permitieron establecer que el supuesto límite de Hayflick, exhibido por tales células en condiciones estándar de cultivo en presencia de 20% de oxígeno (que equivale a la concentración atmosférica del gas), desaparece cuando las células son cultivadas en 3% de oxígeno (una concentración similar a la presente en los tejidos internos del organismo). De modo que a bajas concentraciones de oxígeno los fibroblastos murinos proliferan en forma indefinida. Estos resultados indican que el límite de Hayflick no es una condición intrínseca de las células de ratón y que la senescencia de tales células en cultivo es consecuencia del estrés oxidativo por exceso de oxígeno ambiental. Experimentos similares con fibroblastos humanos mostraron que a 3% de oxígeno las células humanas rebasan el típico límite de Hayflick de 50-60 PDs y alcanzan fácilmente 80-90 PDs, indicando que en buena medida el arresto celular vinculado con la SR se debe al estrés oxidativo y no a una pérdida intrínseca de la capacidad proliferante de las células.

Por lo cual se puede sugerir que el estado senescente no es un reflejo directo de la historia proliferativa de las células sino más bien una respuesta a condiciones de estrés celular. Por otra parte, biopsias de piel de monos criados en laboratorio fueron evaluadas, utilizando un conjunto de marcadores moleculares, para establecer la presencia de células senescentes in vivo. Los resultados mostraron que en monos ancianos se puede detectar hasta un 15% de fibroblastos positivos a los marcadores de senescencia celular. Este dato pareció significativo a los autores del estudio, pero en general fue interpretado como evidencia de la pobre correlación entre la edad del organismo y la senescencia celular.

En 2005 Lorenzini y colaboradores publicaron un breve pero muy importante trabajo demostrando que la capacidad proliferante de las células de un organismo se correlaciona con la masa corporal y no con la longevidad. Por lo tanto, dicha capacidad proliferante corresponde a la necesidad de generar un número de células congruente con el tamaño del organismo y con las necesidades de recambio tisular del mismo. Desde esta perspectiva, la SR o los otros tipos de senescencia celular solamente contribuyen de manera indirecta al envejecimiento del organismo, en la medida en que las células senescentes no pueden participar en los procesos de recambio y reparación de tejidos. En 2007 Maier y colaboradores publicaron un estudio en el cual se analizó sistemáticamente la capacidad de proliferación en cultivo de fibroblastos de un grupo considerable de ancianos nonagenarios y se comparó dicha capacidad con la de células de individuos jóvenes. Los resultados mostraron que los ancianos poseen células que tienen una capacidad de división celular reiterada que no es menor ni diferente a la observada en células de individuos jóvenes que a su vez también tienen células que muestran una limitada o deficiente capacidad proliferativa en cultivo.

Al comenzar el siglo veintiuno, los varios y numerosos resultados derivados del estudio de la senescencia celular fueron integrados en un nuevo paradigma partiendo de la noción de que la SR es resultado del acortamiento gradual de

los telómeros (previo a cada división celular) en células que no expresan la telomerasa. Por lo tanto, las células de ratón no manifiestan límite de Hayflick ya que siempre mantienen activa a la enzima telomerasa. Por otra parte, dado que la hiper-expresión de genes que inducen cáncer en animales de laboratorio también ocasiona un fenotipo senescente que es detectable tanto en las células en cultivo como en lesiones tempranas con riesgo de progresar hacia el cáncer, se propuso que la senescencia celular no es un factor primario del envejecimiento orgánico sino un mecanismo supresor de tumores o sea, un mecanismo que evolucionó con el fin de evitar que las células puedan proliferar en forma indefinida, condición al parecer necesaria para que surja un tumor maligno. La mayoría de los ratones de laboratorio que llegan a edad avanzada (2 a 3 años) mueren de cáncer espontáneo, pero los ratones silvestres nunca llegan a la vejez y la gran mayoría muere por depredación o por frío antes de cumplir un año. Con base en lo anterior se dedujo que desde la perspectiva de la evolución sería innecesario apagar la telomerasa en los tejidos somáticos del ratón ya que bajo condiciones naturales ningún ratón vive lo suficiente para desarrollar cáncer.

Estudios comparativos demostraron que roedores de gran talla y mayor longevidad como el castor o el capivara desactivan a la enzima telomerasa en sus tejidos somáticos, lo que parecía confirmar la hipótesis de que la senescencia celular es un mecanismo supresor de tumores necesario en animales con un gran número de células. Una gran masa celular implica un mayor número de divisiones celulares y por lo tanto un mayor riesgo de adquirir mutaciones, ya que previo a la mitosis se debe copiar el genoma y dicho proceso está sujeto a errores que resultan en mutaciones espontáneas que con baja frecuencia afectan ciertos genes que una vez alterados podrían desencadenar un proceso conducente al cáncer. Por otra parte, la senescencia prematura inducida por factores de estrés celular sería también un mecanismo supresor de tumores, ya que todos esos factores pueden causar directa o indirectamente mutaciones en el genoma o favorecer la inmortalización de las células. Según la hipótesis o teoría genética del cáncer, el riesgo de las mutaciones espontáneas o inducidas por factores

ambientales se incrementa en forma directamente proporcional a la masa celular del organismo, por lo que con base en esta teoría parece razonable pensar que las células de animales masivos han desarrollado mecanismos que hacen menos probable que adquieran o propaguen mutaciones potencialmente oncogénicas.

El esquema anterior ha sido y continúa siendo muy difundido, sin embargo presenta numerosas inconsistencias. Por ejemplo, las aves de rapiña que son de las más grandes y longevas tienen telomerasa activa en sus células somáticas y no existe evidencia de que el cáncer sea una causa frecuente de muerte en estos animales. Estudios comparativos más amplios mostraron que dos especies de roedor pequeñas pero muy longevas (25 a 35 años en promedio): la rata topo ciega y la rata topo desnuda (o ratopín rasurado), mantienen funcionando a la telomerasa en sus células somáticas y sin embargo, no se han registrado tumores malignos espontáneos en este tipo de ratas. Por otra parte, el cerdo, un mamífero que alcanza una gran masa corporal, mantiene activa su telomerasa somática a pesar de que sus células en cultivo muestran una elevada tendencia hacia la inmortalización o proliferación indefinida y sin embargo presenta una incidencia de cáncer mucho menor a la observada en ratones de laboratorio y una longevidad mucho mayor.

Curiosamente, las células senescentes pueden sobrevivir por tiempo indefinido en esa condición de arresto o quiescencia celular permanente. Sin embargo, una propiedad notable de las células senescentes es el desarrollo de un fenotipo hiper-secretor (SASP por sus siglas en inglés) que condiciona la liberación de una gran diversidad de proteínas y otro tipo de moléculas al medio circundante. Paradójicamente, tanto las células transformadas en cultivo como las células derivadas de tumores malignos proliferan mejor y adquieren un fenotipo más agresivo cuando son expuestas a un medio enriquecido con moléculas y factores secretados por las células senescentes. Muchas de estas moléculas están asociadas con estados de inflamación crónica y también se detectan en el líquido intersticial y el plasma sanguíneo de pacientes aquejados por enfermedades

crónico-degenerativas como la diabetes o que padecen obesidad. Luego entonces la senescencia celular que supuestamente es un freno para evitar la aparición del cáncer desemboca en un fenotipo secretor que es muy favorable al desarrollo y progresión del cáncer.

A pesar de la evidencia contundente de que SA-beta-gal no es un marcador específico o confiable de la senescencia todavía se publican artículos referentes a la senescencia celular que utilizan en sus experimentos dicho marcador. Así, utilizando ese marcador estudios recientes demostraron la presencia de células "senescentes" durante el desarrollo embrionario normal, estas células son eliminadas en forma selectiva durante procesos de remodelación tisular propios de la morfogénesis embrionaria. A diferencia de la SR, SIPS y OIS, las células embrionarias "senescentes" no expresan marcadores asociados con la presencia de daño genómico y expresan el SASP en forma inconsistente. Los autores de estos trabajos concluyen que la "senescencia" celular es parte del programa normal de desarrollo embrionario y esto lleva a la paradoja de utilizar el término "senescencia" para referirse a un proceso que ocurre en el embrión.

El hecho de que la simple reducción del oxígeno ambiental a concentraciones similares a las presentes en los tejidos internos del cuerpo es suficiente para eliminar el límite de Hayflick en las células de ratón y para extender dicho límite en las células humanas, es evidencia de que el cultivo celular tradicional es un ambiente anómalo para las células y que bajo tales condiciones mucho del comportamiento celular observado es en realidad un comportamiento reactivo a condiciones de estrés. Desde esta perspectiva, cabe la posibilidad de que SR, SIPS y OIS sean artefactos de laboratorio sin ninguna relevancia biológica en condiciones naturales. Por ejemplo, los hepatocitos postnatales son células que normalmente se encuentran en estado quiescente pero preservan un elevado potencial proliferante. La extirpación quirúrgica de dos tercios del hígado en una rata o ratón adulto induce el reingreso de los hepatocitos remanentes al ciclo celular, dando lugar a un proceso de proliferación altamente sincronizada que

resulta en la regeneración funcional de la masa hepática original en 6 a 7 días. En ratones adultos ha sido posible evaluar el potencial proliferante de los hepatocitos *in vivo*, mediante trasplantes seriados de hepatocitos dotados de un marcador genético específico. Los resultados indican que probablemente no existe un límite de Hayflick para estas células que despliegan un potencial proliferante similar al de las células madre. Sin embargo, hasta la fecha nadie ha podido cultivar en forma estable a los hepatocitos normales que son completamente reacios a dividirse y mueren después de unos cuantos días en cultivo. Lo anterior reafirma lo inadecuado que son las condiciones de cultivo *in vitro* para conocer y evaluar las verdaderas capacidades de proliferación de las células *in vivo*.

En un modelo de ratón transgénico que contiene numerosas modificaciones artificiales en su genoma introducidas mediante técnicas de ingeniería genética, se diseñó una estrategia adicional para eliminar a las células senescentes *in vivo*. Los autores de estos experimentos consideraron que la expresión de la proteína p16^{ink4} es el marcador más confiable de senescencia celular y así, diseñaron un sofisticado procedimiento experimental mediante el cual las células que expresan p16^{ink4} se vuelven muy sensibles a la acción de un fármaco que favorece la apoptosis. De esta manera se buscaba evaluar cuáles son las consecuencias de eliminar en forma selectiva a las células senescentes en los tejidos de los ratones. Los resultados publicados en 2016 mostraron que la eliminación de tales células condiciona una atenuación del fenotipo senescente del organismo de manera que los ratones tratados desarrollaron más lentamente diversos déficits funcionales o patologías crónicas y mostraron un incremento de la longevidad promedio en comparación a los ratones control. Sin embargo, otra dato importante de este trabajo fue que la incidencia de tumores malignos espontáneos en los ratones no fue modificada por la eliminación selectiva de las células senescentes aunque la eliminación de estas células retarda el desarrollo de los tumores. Quizá este estudio constituye la evidencia más confiable hasta le fecha de que la senescencia celular puede contribuir, aunque de manera indirecta, a la susceptibilidad a enfermedades degenerativas y a la fragilidad

y disfuncionalidad que son propias del envejecimiento, pero también hecha por tierra la idea de que la senescencia celular es un mecanismo supresor de tumores pues los resultados mostraron que en presencia de células senescentes los tumores malignos se desarrollan más rápido y por otra parte, la eliminación de tales células no resultó en un incremento en la incidencia de tumores malignos espontáneos que sería de esperar en caso de que las células senescentes fueran evidencia de un mecanismo supresor de tumores.

Por otra parte, la idea de que la senescencia celular es una barrera a la inmortalización celular previa al desarrollo de tumores malignos parece atractiva, pero estudios recientes demuestran que la condición de inmortalidad celular, entendida como capacidad indefinida de proliferación celular, no es un fenómeno necesario para la carcinogénesis y de hecho, en muchos casos es un fenómeno tardío en la progresión del cáncer. A este respecto, estudios sistemáticos con muestras de melanoma maligno, un tumor de los melanocitos de la piel que con frecuencia es altamente invasor y agresivo pero que por su ubicación dérmica es relativamente fácil de seguir y muestrear, establecen que en la mayoría de los melanomas la propiedad de inmortalización de las células tumorales (propiedad que necesariamente tiene que ser evaluada en cultivo) es un fenómeno tardío y no condiciona la aparición del tumor. Este dato es muy importante porque fueron precisamente estudios comparativos entre nevos (lunares) normales y melanomas los que originalmente dieron lugar a la noción de que la senescencia celular ocurría *in vivo* como manifestación de un mecanismo supresor de tumores, pues dichos estudios reportaban la presencia consistente de marcadores moleculares de senescencia en las células de los nevos normales y ausencia de los mismos en melanomas invasores. Por lo cual se infirió que los melanomas resultaban de nevos que por diversas razones habían superado el freno a la proliferación impuesto por la senescencia celular. Sin embargo, el estudio sistemático de numerosas muestras de melanomas cultivados *in vitro* demostró la presencia de arresto celular y marcadores de senescencia en las células malignas, en forma idéntica a las células de los nevos normales.

Esta evidencia también debilita la idea de que la senescencia celular es un mecanismo supresor de tumores y esta noción se debilita todavía más si añadimos la evidencia de que las células senescentes secretan moléculas que favorecen el crecimiento de las células malignas y por lo tanto pueden establecer un ambiente favorable para la progresión del cáncer in vivo. Así, con base en la evidencia disponible, parece que carece de lógica la hipótesis de que la senescencia celular es un mecanismo supresor de tumores.

Por otra parte, es muy probable que en los cultivos celulares las células que presentan arresto de su capacidad proliferante en realidad correspondan a poblaciones arrestadas por causas diferentes o sea, existen células que presentan SIPS o RS en función de factores de estrés que actúan en forma prematura (ej: exceso de oxígeno en el medio) o tardía (acortamiento gradual de los telómeros) y que por lo tanto manifiestan el clásico fenotipo senescente asociado con una morfología celular y metabolismo alterado. Pero también en los cultivos celulares pueden ocurrir las células que presentan SE posterior a cualquier división celular en forma aleatoria e impredecible y que no se asocia con un fenotipo celular alterado sino con la conclusión espontánea de un proceso de diferenciación celular. Es interesante mencionar que se conocen diversas mutaciones o manipulaciones experimentales que permiten revertir o brincar la barrera de la SR, SIPS y OIS, de manera que las células vuelvan a proliferar. Sin embargo, no se conocen mutaciones o procedimientos experimentales que puedan revertir la condición post-mitótica asociada con la SE.

En retrospectiva, la propuesta de Hayflick de utilizar el término "senescencia" para referirse a la pérdida del potencial proliferante de las células en cultivo fue quizá un error, pues rápidamente pasó de ser un concepto meramente operacional a ser tomado por una relación causal en cuanto al envejecimiento del organismo. Como lo hizo notar el propio Hayflick, el concepto de envejecimiento es más bien difuso, a pesar de que todos los humanos podemos envejecer y darnos cuenta del proceso. Sin embargo, la ciencia, dedicada a estudiar las

las regularidades de la naturaleza y dilucidar las causas de tales regularidades, requiere de definiciones claras que le ayuden a enfocar sus preguntas y campo de estudio. En este sentido el envejecimiento es elusivo pues no existe una definición universalmente aceptada del mismo y diferentes culturas aplican criterios distintos. Incluso la definición actuarial, que define al envejecimiento como el incremento de la probabilidad de morir en función del tiempo y que es ampliamente utilizada con fines operacionales, es debatible. Por ejemplo, con base en las expectativas de vida típicas del México de los años treinta del siglo pasado (33 años para los hombres, 35 años para las mujeres) una persona de sesenta años era considerada anciana y proclive a morir. Sin embargo, en el México de hoy la muerte de una persona de sesenta años es considerada como una muerte prematura. En todo caso es claro que el envejecimiento es un proceso complejo que seguramente involucra muchos factores de naturaleza muy diversa, mismos que se manifiestan de manera heterogénea, aleatoria y asimétrica en las poblaciones silvestres ya sean de hombres o animales. Por lo cual en los hechos el envejecimiento ocurre como un fenómeno individual difícilmente similar en magnitud y progresión aún entre individuos de la misma especie. Esto en contraste con el proceso de desarrollo embrionario que sigue etapas razonablemente reproducibles en tiempo y espacio en la mayoría de los organismos normales de una especie.

Conclusiones

Desde hace muchos años diversos investigadores han discutido la evidencia de que la fuerza de la selección natural disminuye en función de la edad biológica del organismo, en el sentido de que los organismos que han rebasado la etapa de la madurez reproductiva y han logrado ya contribuir a la propagación de la especie, no son sujetos de la selección natural puesto que las fragilidades o déficits funcionales que los aquejan no tienen ningún impacto en su coeficiente individual de adaptabilidad biológica ni tampoco en la supervivencia de la especie. Si consideramos que por el 99.5% de la historia del *Homo sapiens* la

la longevidad promedio no era mayor a 27 -29 años, entonces debemos reconocer que lo que ocurra con personas más allá de la cuarta década de la vida no parece relevante para la acción de la selección natural y por lo tanto, para la evolución biológica de la especie. Luego entonces, el fenómeno del envejecimiento es un gran misterio puesto que parece improbable e innecesario en animales silvestres y pudiera resultar una peculiaridad propia de animales que viven en hábitats protegidos de factores causales de mortalidad extrínseca, como es el caso del ser humano y de los animales de laboratorio o de los zoológicos. Sin embargo, existe evidencia actual y confiable de que especies muy diversas presentan signos de envejecimiento en condiciones silvestres lo que sugiere que debe existir una explicación biológica y consistente para el fenómeno del envejecimiento.

Bibliografía de consulta

1. Aranda Anzaldo A, Dent MAR. 2003. Developmental noise, ageing and cancer. *Mech. Ageing Dev.* 124:711-720.
2. Baker DJ, et al. 2016. Naturally occurring p16ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 530:184-189.
3. Gorbunova V, Seluanov A. 2009. Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: from mice to beavers. *Mech. Ageing Dev.* 130:3-9.
4. Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25:585-621.
5. Kuilman T, et al. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.* 24:2463-2479.
6. Macieira Coelho A, 2010. Cancer and the concept of cell senescence. *Biogerontology.* 11:211-227.
7. Macieira Coelho A. 2011. Cell division and aging of the organism. *Biogerontology.* 12:508-515.
8. Nussey DH, et al. 2013. Senescence in wild populations of animals: widespread evidence and its implications for biogerontology. *Ageing Res. Rev.* 12:214-225.
9. Overturf K, et al. 1997. Serial transplantation reveals the stem-cell like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J Pathol.* 151:1273-1280.

10. Patil CK, et al. 2005. The thorny path linking cellular senescence to organismal aging. *Mech. Ageing Dev.* 126:1040-1045.
11. Smith JR, Hayflick L. 1974. Variation in the life-span of clones derived from human diploid cell strains. *J Cell Biol.* 62:48-53.
12. Soo JK, et al. 2011. Malignancy without immortality? Cellular immortalization as a possible late event in melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24:490-503.
13. Storer M, Keyes WM. 2014. Developing senescence to remodel the embryo. *Commun. Integr. Biol.* 7:5, e970969.
14. Witkowski JA. 1980. Dr. Carrel's immortal cells. *Medical Hist.* 24:129-142.

