

Actividad β -galactosidasa asociada con la senescencia en fibroblastos del estroma ovárico *in vitro*

Senescence-associated β -galactosidase activity in the *in vitro* ovarian stromal fibroblasts

Atividade β -galactosidase associada com a senescência em fibroblastos do estroma ovariano *in vitro*

Lilian Chuaire-Noack, PhD¹, Cristian García-Morcote, MD², Sandra Rocío Ramírez-Clavijo, PhD³

Recibido: Enero 15 de 2011 • Aceptado: Febrero 3 de 2011

Para citar este artículo: Chuaire-Noack L, García-Morcote C, Ramírez-Clavijo SR. Actividad β -galactosidasa asociada con la senescencia en fibroblastos del estroma ovárico *in vitro*. Rev. Cienc. Salud 2011; 9 (1): 17-31

Resumen

Introducción: Un campo de investigación creciente de la biología es la senescencia celular, mecanismo que ha sido asociado -bajo determinadas circunstancias- con la transformación maligna. Teniendo en cuenta la elevada incidencia de cáncer ovárico y su génesis preferencial a partir del epitelio superficial del ovario, así como la posibilidad de ocurrencia de una transición epitelio-mesenquimática, se evaluó, tanto el crecimiento *in vitro* de los fibroblastos del estroma cortical, como la actividad a pH 6 de la β -galactosidasa, enzima cuya expresión ha sido clásicamente considerada como marcador de senescencia replicativa. **Metodología:** 48 muestras de fibroblastos de la corteza ovárica provenientes de donantes sin antecedentes de cáncer fueron cultivadas en forma seriada hasta el final de su vida replicativa. Mediante el método quimioluminiscente, en cada pase fue cuantificada la actividad β -galactosidasa a pH 6. Como control se utilizaron cultivos de células del epitelio superficial ovárico de las mismas donantes. La actividad enzimática fue también evaluada en fibroblastos previamente inducidos a senescencia con peróxido de hidrógeno. **Resultados:** Las lecturas de actividad enzimática, analizadas en conjunto con la capacidad replicativa, indican que los cultivos de fibroblastos alcanzaron el estado senescente hacia los pases 4-5, lo que también ocurrió con las células epiteliales. Los fibroblastos inducidos a senescencia mostraron valores variables de actividad enzimática. **Conclusiones:** La semejanza entre los fibroblastos y las células epiteliales en cuanto al inicio de la senescencia podría estar relacionado con la transición epitelio-mesenquimática que ha sido descrita como factor de riesgo de cáncer derivado del epitelio superficial ovárico. Valores bajos de actividad β -galactosidasa podrían sugerir que, en algunos casos, ocurrió inactivación de las vías de respuesta al estrés oxidativo.

¹ Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia. Correo electrónico: lilian.chuaire@urosario.edu.co

² Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia.

³ Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá D.C., Colombia.

Palabras clave: β -galactosidasa, senescencia replicativa, fibroblastos ováricos, conversión epitelio-mesenquimática.

Abstract

Introduction: A growing biological research field is the cellular senescence, a mechanism that has been associated, under certain circumstances, with malignant transformation. Given the high incidence of ovarian cancer and its main origin from the ovarian surface epithelium, as well as the possibility that an epithelial-mesenchymal transition occurs, we evaluated both the *in vitro* growth of stromal fibroblasts from the ovarian cortex and their β -galactosidase activity at pH 6, enzyme whose expression is considered as a marker of replicative senescence. *Methods:* 48 samples of ovarian cortical fibroblasts from donors without a history of cancer were serially cultured until the end of their replicative life. β -galactosidase activity at pH 6 was quantified in each passage by the chemiluminiscent method. As control, we used ovarian epithelial cell cultures from the same donors. The enzyme activity was also evaluated in fibroblasts previously induced to senescence by exposure to hydrogen peroxide. *Results:* The analysis of the enzyme activity and the replicative capacity taken together showed that the fibroblast cultures reached the senescent state at passages 4-5, as what happened with the control epithelial cells. Fibroblasts induced to senescence showed high variability in the values of enzymatic activity. *Conclusions:* The similarity between both types of cells in reaching the senescent state deserves to be taken into account in relation to the epithelial-mesenchymal transition that has been proposed to explain their behavior in the genesis of cancer arising from ovarian surface epithelium. Low β -galactosidase activity values at pH 6 would suggest possible inactivation of the response pathways to oxidative stress.

Key words: β -galactosidase, replicative senescence, ovarian fibroblasts, epithelial-mesenchymal conversion

Resumo

Introdução: um campo de pesquisa crescente da biologia é a senescência celular, mecanismo que tem sido associado, sob determinadas circunstâncias, com a transformação maligna. Tendo em conta a elevada incidência de câncer ovariano e sua gênese preferencial a partir do epitélio superficial do ovário, assim como a possibilidade de ocorrência de uma transição epitélio-mesenquimática, se avaliou, tanto o crescimento *in vitro* dos fibroblastos do estroma cortical, como a atividade a pH 6 da β -galactosidase, enzima cuja expressão tem sido classicamente considerada como marcador de senescência replicativa. *Metodologia:* 48 amostras de fibroblastos do córtex ovariano provenientes de doadores sem antecedentes de câncer foram cultivadas em forma seriada até o final de sua vida replicativa. Mediante o método quimioluminescente, em cada passe foi quantificada a atividade β -galactosidase a pH 6. Como controle utilizou-se cultivos de células do epitélio superficial ovariano das mesmas doadoras. A atividade enzimática foi também avaliada em fibroblastos previamente induzidos a senescência com peróxido de hidrogeno. *Resultados:* as leituras da atividade enzimática, analisada em conjunto com a capacidade replicativa, indicam que os cultivos de fibroblastos alcançaram o estado senescente para os passes 4-5, o que também ocorreu com as células epiteliais. Os fibroblastos induzidos a senescência mostraram valores variáveis de atividade enzimática. *Conclusões:* as

semelhanças entre os fibroblastos e as células epiteliais em quanto ao início da senescência poderia estar relacionado com a transição epitélio-mesenquimática que tem sido descrita como fator de risco de câncer derivado do epitélio superficial ovariano. Valores baixos de atividade β -galactosidase poderiam sugerir que, em alguns casos, ocorreu inativação das vias de resposta ao estresse oxidativo.

Palavras chave: β -galactosidase, senescência replicativas, fibroblastos ovarianos, conversão epitélio-mesenquimática.

Introducción

La senescencia corresponde a un estado de detención permanente del ciclo celular que, aunque es el resultado de la extinción de la capacidad replicativa de las células diploides normales *in vivo* e *in vitro*, no interfiere con su viabilidad ni con su actividad metabólica (1).

Eventos como el acortamiento telomérico, el daño del ADN, la activación de oncogenes, el estrés oxidativo y la privación de nutrientes y/o de factores de crecimiento entre otros, han sido reportados como desencadenantes de la senescencia celular (2), lo que reviste particular importancia si se la considera como factor de riesgo en el proceso de transformación tumoral. Sobre este punto se ha demostrado que cuando una célula escapa del estado senescente y se immortaliza, se transforma en una célula maligna (3,4). Además, hallazgos previos de acúmulos de células senescentes adyacentes a lesiones premalignas, que exhiben una morfología normal y carecen de capacidad invasiva, han hecho de la senescencia un atractivo marcador de premalignidad (5).

En sistemas *in vitro* es posible cuantificar la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) mediante técnicas histoquímicas como la quimioluminiscencia. La expresión de esta enzima lisosómica se encuentra aumentada a pH 6 en las células envejecidas (6,7), en razón del aumento en el número de lisosomas que tiene lugar en la senescencia (8), relacionada en forma probable con la necesidad creciente de clivar residuos β -D-galactosa de

glicoproteínas, esfingolípidos y queratínsulfato, que se acumulan como resultado del proceso de envejecimiento celular (9).

La elevada incidencia de cáncer derivado del epitelio superficial del ovario (10-12), sumada a la transición epitelio-mesenquimática (13-15) –que permite a las células epiteliales adoptar un fenotipo fibroblastoide–, son factores que justifican el estudio de la senescencia de los fibroblastos del estroma de este órgano. En este orden de ideas, el objetivo del presente estudio fue evaluar el estado senescente en cultivos primarios de fibroblastos del estroma ovárico, mediante la cuantificación de la actividad SA- β -gal a pH 6, en el marco de la cinética de crecimiento de dichos cultivos. Con este propósito, fueron examinados 48 cultivos primarios de fibroblastos, los cuales fueron subcultivados hasta el agotamiento de su capacidad replicativa. La actividad SA- β -gal a pH 6 fue determinada en el estado subconfluente de cada pase y posteriormente normalizada con base en la cantidad total de proteínas de las células analizadas. Como control se utilizó igual número de cultivos de células del epitelio superficial del ovario, provenientes de las mismas donantes.

Materiales y métodos

Donantes

Se efectuó recolección, cultivo y criopreservación de 48 muestras de tejido ovárico, obtenidas a partir de donantes vivas sanas y de donantes cadavéricas, con edades entre 13 y 63 años. Las

donantes vivas fueron pacientes sometidas a ooforectomía parcial o total debida a condiciones benignas en los servicios de gineco-obstetricia de cinco instituciones hospitalarias –tanto públicas como privadas– de Bogotá D.C., durante el periodo 2007-2008. En acuerdo con los principios básicos establecidos en la Declaración de Helsinki, las donantes aceptaron participar en el estudio después de haber sido informadas de sus objetivos y procedimientos. En el caso de las donantes cadavéricas, el tejido fue rescatado a través de la Red de Trasplante de Organos de Bogotá D.C.; previa aceptación de los deudos responsables. En todos los casos el tamaño de la muestra donada fue de aproximadamente 1-2 cm³.

Con el fin de efectuar los análisis propuestos, se establecieron dos grupos etarios: G1≤36 años y G2≥37 años, según la edad cronológica de las donantes.

Aislamiento de las células

Cada una de las muestras del tejido ovárico recolectado incluyó epitelio superficial más una porción muy pequeña del estroma cortical subyacente. La composición de las muestras hizo necesario separar las dos capas mediante la acción colagenasa de la dispasa (Dispase II, Roche Applied Sciences, Indianapolis IN, USA), de la que se aplicaron 3 ml sobre la muestra, a 37°C, y 5% de CO₂ durante 12 horas, de acuerdo con la técnica descrita por Dunfield *et al* 2002 (16). Tanto el estroma como el epitelio fueron seccionados en pequeños fragmentos con la ayuda de pinzas y tijeras.

Cultivos primarios

Los fibroblastos fueron sembrados en frascos de cultivo de 25 cm³, en número entre 1000 y 2000, en la mezcla 1:1 de medios MCDB105 (Sigma, St. Louis, MO, USA)/M199 (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil) suplementada

con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 0,05% de penicilina-estreptomina de 10000 U (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil). Como control se sembraron células epiteliales en idénticas condiciones.

Cuando las células cultivadas alcanzaron un 80-85% de confluencia, fueron disgregadas con tripsina-EDTA (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil) al 0,25% y criopreservadas con dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA) a -120°C, previa inactivación de la tripsina con medio de cultivo suplementado. Con el fin de asegurar la continuidad del cultivo, se añadió medio suplementado con SFB y antibióticos a cada frasco de cultivo, lo que permitió que las células remanentes adheridas pudieran proliferar, y después se incubó a 37°C y 5% de CO₂, hasta que nuevamente las células alcanzaron el estado subconfluyente. Cada vez que esto ocurrió se repitió el proceso de disgregación, inactivación de la tripsina y criopreservación.

La suspensión celular obtenida después de la disgregación con la tripsina y posterior inactivación de la enzima fue centrifugada a 1500 rpm durante 6 minutos. El pellet resultante fue resuspendido en 1 ml de la mezcla MCDB105/M199 suplementada. Después de verificar la identidad de las células cultivadas y de contarlas en cámara de Neubauer –observada en el microscopio de contraste de fases–, el volumen de resuspensión de cada muestra fue criopreservado en viales a -170°C. A partir de la fracción de células remanente en cada frasco continuó el crecimiento en el siguiente pase.

Conteo celular

Una vez efectuadas tripsinización, centrifugación y posterior resuspensión en medio, se mezclaron 10 ul de la suspensión celular con un volumen igual de azul de tripán. Debido a que este colorante es captado sólo por las célu-

las muertas, es posible identificar y contar las células vivas que no lo incorporan. El número total de células vivas en cada pase se calculó mediante la fórmula: $2 \times 10^4 \times$ volumen del medio utilizado en la resuspensión del pellet (ml) \times número promedio de células vivas contabilizadas en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer.

Caracterización

En los tres primeros pases de cada cultivo, tanto fibroblastos como células epiteliales fueron extendidos en láminas, fijados con Carnoy, tratados con anticitoqueratina 18-FITC (Sigma St. Louis, MO, USA) e incubados en cámara húmeda por 12 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de tres lavados posthibridación con PBS, mediante espectroscopia de fluorescencia, se determinó que las señales características de color verde, correspondientes a la fluorescencia emitida por el fluoróforo acoplado con el anticuerpo, aparecieron sólo en las células epiteliales de control.

La caracterización de los fibroblastos se efectuó con base no sólo en la demostración de ausencia de reactividad anticitoqueratina-18 durante los tres primeros pases del cultivo, sino también en la visualización de su morfología especial ahusada, así como en el carácter excluyente de este tipo de cultivos, que restringe la coexistencia de los fibroblastos con células epiteliales.

Capacidad replicativa

Una vez obtenidos los conteos celulares, y con base en la razón entre el número de células recolectadas después de la tripsinización al final de cada pase y la duración del mismo, se obtuvo un estimado de la capacidad replicativa. La duración de cada pase fue definida como el tiempo en días tomado por las células para alcanzar una confluencia de 80-85%. Esta decisión de normalizar eliminó los sesgos debidos

a duración variable de los pases e hizo posible identificar tendencias en la capacidad replicativa de los cultivos.

Criopreservación

Después de resuspender el pellet obtenido en cada pase con 0,5 ml de la mezcla de medios suplementada, se adicionó 0,1 ml del agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) disuelto en 0,4 ml de mezcla de medios y SFB a cada vial. El periodo de equilibración (tiempo entre la adición del DMSO y el inicio del enfriamiento) fue de 15 minutos a temperatura ambiente. Los viales fueron almacenados primero a -80°C durante 24 horas y después en nitrógeno líquido a -170°C hasta su utilización.

Recuperación de las células criopreservadas

Con antelación a los ensayos de determinación de la actividad SA- β -gal y de cuantificación de proteínas, se efectuó nuevo conteo celular. Una vez descongelados los viales a 37°C en baño de agua, en forma muy rápida se añadieron 3 ml de medio de cultivo fresco con SFB al 10% y se centrifugó a 1500 rpm durante 6 minutos. A continuación se resuspendió el pellet en 1 ml de la mezcla de medios suplementada con SFB y antibióticos, y se efectuó la determinación de la actividad SA- β -gal y la cuantificación de proteínas.

Determinación de las fases de crecimiento de las células cultivadas

Para definir las fases de crecimiento se tuvieron en cuenta los criterios de Hayflick y Moorhead 1961 (17), así como los de Maier *et al* 2007 (9), según los cuales la cinética de los cultivos comprende cuatro etapas, a saber: Fase I o periodo de adaptación, fase IIa de crecimiento exponencial, fase IIb de crecimiento lento, fase III estacionaria o senescente y fase IV de muerte celular.

Inducción de senescencia

Con la finalidad de contar con controles positivos para los ensayos de actividad SA- β -gal, se indujo senescencia a fibroblastos del estroma ovárico provenientes de la misma donante cuyas células estaban siendo examinadas en los ensayos de actividad enzimática. Para este propósito se sembraron 5000 fibroblastos por pozo, en placa de 96 pozos, y se les permitió adherirse a la superficie de la placa durante 24 horas. El tratamiento inductor consistió en reemplazar el medio de cultivo por H₂O₂ 100 μ M durante dos horas a 37°C, lavar dos veces con PBS y cultivar durante 5 días en medio desprovisto de H₂O₂ y suplementado con SFB y antibióticos antes de efectuar la lectura de luminiscencia.

Actividad SA- β -gal

Durante el estado subconfluyente de cada pase se determinó la actividad endógena de la enzima SA- β -gal a pH 6, con el kit *Beta-Glo Assay System* (Promega Co, Madison WI, USA). Después de efectuar el conteo celular correspondiente a cada pase, se sembraron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, en 250 μ l de la mezcla de medios suplementada. 24 horas más tarde se eliminó el medio, se lavó con PBS, se adicionaron 100 μ l de buffer de lisis (Triton X100 1%, Hepes 20 mM, EDTA 4 mM pH 7,4) a cada pozo y se dejó actuar por 20 minutos. De cada pozo se trasladaron 100 μ l de la suspensión a placas de luminiscencia de 96 pozos y se añadieron 100 μ l de reactivo Beta-Glo a cada pozo. Pasados 30 minutos se efectuó la lectura de luminiscencia en el luminómetro. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Como control para eliminar el posible sesgo introducido por la actividad enzimática debida al estrés del cultivo, se efectuaron los mismos ensayos en una línea celular de cáncer, en cultivos de la bacteria *Salmonella* –que no expresa

β -galactosidasa– así como en fibroblastos inducidos a senescencia mediante tratamiento con H₂O₂. Como controles positivos del ensayo se utilizaron fibroblastos inducidos a senescencia. Como blanco de la prueba se utilizó buffer de lisis.

El ensayo fue normalizado con base en la cantidad total de proteína presente en cada uno de los pozos, lo que permitió comparar en forma confiable la actividad SA- β -gal entre las muestras analizadas en la totalidad de los ensayos.

Cuantificación de proteínas

Este proceso se efectuó en cada pase de las muestras cultivadas con el kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Para esto, se tomaron 200 μ l de una solución 1:50 BCA y CuSO₄ pentahidratado y se añadieron a 20 μ l del lisado celular vertido en cada pozo. Se construyó además una curva estándar de calibración, en la que diluciones seriadas de BSA fueron tratadas de la misma forma que las muestras. Como blanco se usó buffer de lisis y como control negativo del estándar de calibración, un volumen de 20 μ l de H₂O. En adición, se cuantificaron las proteínas de los fibroblastos inducidos a senescencia que habían sido utilizados como control positivo en los ensayos de actividad β gal. Pasados 30 minutos de incubación, la lectura de la absorbancia se efectuó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

En cada experimento se obtuvo una línea de tendencia con su correspondiente ecuación, lo que permitió calcular la concentración de proteína de cada muestra con base en su absorbancia.

Análisis estadístico

La homogeneidad de varianzas fue evaluada con la prueba de *Levene* o *Shapiro-Wilk* y la normalidad con la prueba *Kolmogorov-Smirnov*. Cuando no hubo distribución normal, se efectuaron transformaciones con raíz cuadrada

o logaritmo natural. Si después de este procedimiento los resultados no se ajustaban a una distribución normal, se utilizaron pruebas no paramétricas.

Las medianas de la población celular normalizada de los diferentes pases de los cultivos de fibroblastos fueron examinadas en la muestra no estratificada con el análisis de varianza no paramétrico de Friedman, seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Friedman, mientras que las muestras estratificadas por grupos etarios fueron evaluadas con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney. Por otra parte, para comparar los rangos de la población celular normalizada entre fibroblastos y células epiteliales, se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Para analizar las medianas de la actividad SA- β -gal normalizada de fibroblastos en la muestra no estratificada por edades, se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de Friedman. Para la muestra estratificada por grupos etarios se utilizó la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney. En adición, se compararon los resultados de la actividad enzimática (en términos de medianas y cuartiles) en fibroblastos, con los obtenidos en las células epiteliales, mediante la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon.

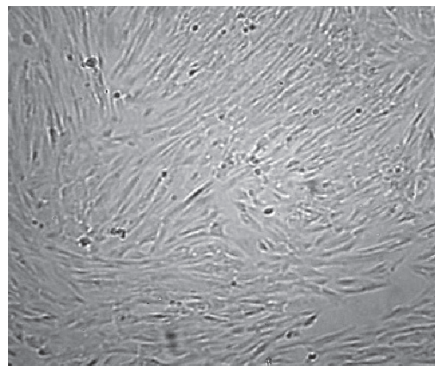
El nivel de significancia en todas las pruebas fue 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Establecimiento de los cultivos primarios

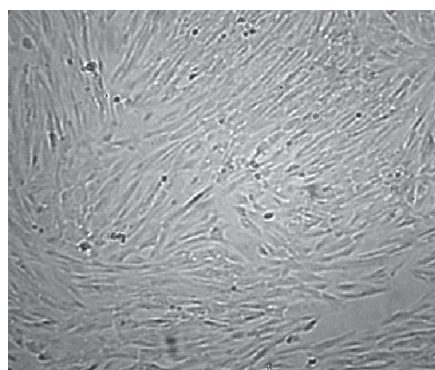
Tanto los fibroblastos como las células epiteliales y los fibroblastos inducidos a senescencia de control fueron subcultivados en forma seriada durante 4-8 pases (Figuras 1a y 1b).

Figura 1a. Fibroblastos del estroma ovárico en pase 2*



* Como se aprecia en el cultivo confluyente, estas células exhiben *in vitro* su característica morfología alargada. Medio de cultivo: MCD8105/M199 con SFB al 10%.

Figura 1b. Células epiteliales en pase 2*



* Las células han adquirido la apariencia adquinada característica del tipo celular. Medio de cultivo: MCD8105/M199 con SFB al 10%.

En los pases 3-5 comenzaron a adquirir un fenotipo senescente, caracterizado por una morfología mesenquimática y dificultad para alcanzar confluencia. Como último pase de cada cultivo se consideró a aquel en el que la densidad celular se mantuvo estable o disminuyó durante un lapso de 7-15 días, contados a partir de la tripsinización inmediatamente anterior. La duración total de los cultivos dio el margen suficiente para que las células alcanzaran el estado senescente, lo que hizo posible determinar la actividad SA- β -gal en todos los cultivos.

Crecimiento de las células cultivadas

Capacidad replicativa

Muestra no estratificada

Las medias de la población de fibroblastos normalizada no se ajustaron a una distribución normal, ni en la muestra poblacional no estratificada, ni en la estratificada por grupos etarios. En la muestra no estratificada se observó una

tendencia al aumento de las medianas de la población celular, desde el pase 1 hasta el 4, cuando alcanzaron el máximo, para después iniciar su descenso (Figura 2).

Con el análisis no paramétrico de varianza de Friedman se compararon los rangos promedio de la población de fibroblastos normalizada en los 4, 5, 6 y 7 primeros pases, entre los que se encontraron diferencias significativas (Tabla 1).

Figura 2. Distribución de las medianas de la población celular normalizada de los cultivos primarios de fibroblastos y de las células epiteliales de control

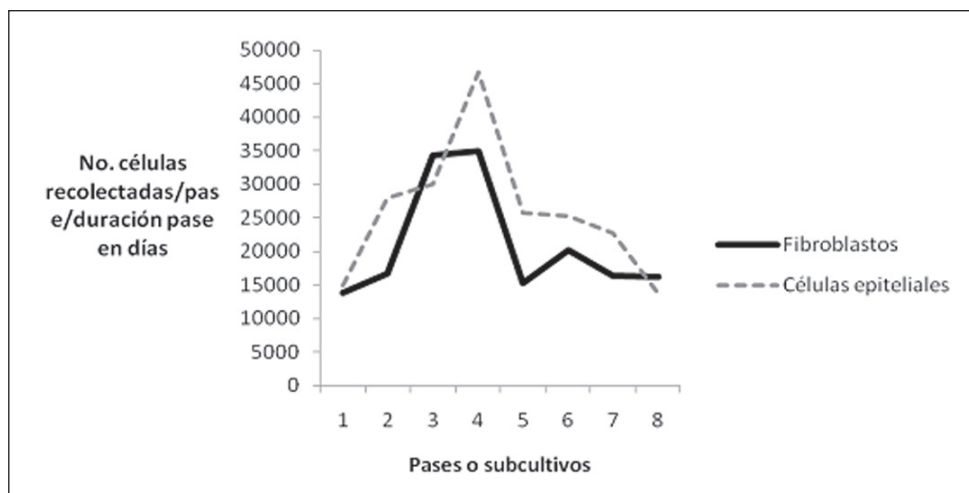


Tabla 1. Rangos promedio de la población celular normalizada en cultivos de fibroblastos ováricos, correspondientes a los análisis efectuados con los 4, 5, 6, 7 y 8 primeros pases de cultivo

Pase	Rango	Pase	Rango	Pase	Rango	Pase	Rango	Pase	Rango
p<0,001	promedio	p=0,036	promedio	p=0,001	promedio	p=0,001	promedio	p=0,007	promedio
1	1,73	1	2,40	1	2,73	1	3,44	1	3,80
2	2,27	2	2,71	2	3,25	2	3,94	2	5,00
3	2,85	3	3,42	3	4,40	3	4,94	3	5,50
4	3,15	4	3,65	4	4,58	4	5,53	4	6,70
		5	2,83	5	3,55	5	4,31	5	5,10
				6	2,50	6	3,19	6	3,80
						7	2,66	7	3,00
								8	3,10

Con la prueba de comparaciones múltiples de Friedman, para los cuatro primeros pases se determinó que los rangos de la población celular normalizada fueron significativamente mayores en los pases 3 y 4 con respecto al 1; mientras que, para los cinco primeros pases, el rango de la población en el pase 4 fue significativamente mayor que en el 1. Para los seis primeros pases, los rangos de la población en los pases 3 y 4 fueron significativamente mayores que en el 1; mientras que en el 3 y en el 4 lo fueron en relación con el pase 6. Al analizar los siete primeros pases se estableció que el rango de población fue significativamente mayor en el pase 4 que en el 1, así como en el 3 y en el 4, en relación con el pase 7, y en el 4 respecto del 6. Cuando se analizó el conjunto de los ocho primeros pases, se halló que el rango de población fue significativamente mayor en el pase 4 con respecto al 7 y al 8, igual que el pase 4 en relación con el 1, y el 4 respecto del 6, sin alcanzar el nivel de significancia ($p < 0,05$).

Cuando se compararon los resultados con los obtenidos con las células epiteliales de control, se encontró que las medianas de la población celular normalizada fueron mayores en los dos primeros pases de los cultivos de células epiteliales con respecto a los correspondientes de fibroblastos, y alcanzaron un máximo en el pase 4, en ambos tipos de cultivo, cuando iniciaron su descenso. Mediante la aplicación de la prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon, se observaron diferencias significativas en los rangos de la población celular normalizada entre los dos tipos de células, en los pases 1 ($p < 0,001$), 2 ($p = 0,001$) y 6 ($p = 0,002$); pases en los que –según la Figura 2– las células epiteliales exhibieron una mayor población celular normalizada con respecto a los fibroblastos.

Muestra estratificada

Con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney se encontró, en la muestra estrati-

ficada por grupos etarios, que los valores de distribución de los rangos promedio de la población de fibroblastos normalizada en G1 (≤ 36 años) fueron significativamente mayores que en G2 (≥ 37 años), en los pases 1 ($p < 0,001$), 2 ($p = 0,002$), 3 ($p = 0,002$), 4 ($p = 0,046$), 5 ($p = 0,029$) y 7 ($p = 0,022$).

Actividad SA- β -gal

En cada pase de cultivo de los fibroblastos provenientes de cada muestra se determinó la actividad SA- β -gal. Como control negativo se utilizó inicialmente *Salmonella*, bacteria β -galactosidasa-negativa, así como células de la línea cáncer de mama MCF-7. Con *Salmonella* los resultados de la lectura de la absorbancia debida a la actividad enzimática fueron muy semejantes a la del buffer de lisis; mientras que, en las células cancerosas MCF-7 se encontraron valores de actividad β -gal similares a los de las células normales cultivadas. Por este motivo se decidió utilizar buffer de lisis como único control negativo y blanco para la lectura de la absorbancia.

La actividad SA- β -gal fue normalizada con base en la cantidad de proteína de cada una de las muestras, lo que permitió disponer de un estimado de la luminiscencia emitida por las células en RLU por microgramo de proteína y por mililitro de suspensión celular.

Muestra no estratificada

En razón de que las medias de la actividad SA- β -gal de los fibroblastos no se ajustaron a una distribución normal, se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de Friedman, con el fin de comparar los rangos promedio de la actividad enzimática entre los diferentes pases, seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Friedman, en caso de diferencias significativas. Los rangos de la actividad SA- β -gal mostraron tendencia al aumento desde el

pase 1 hasta el 6, y alcanzaron un máximo en el pase 7. Después de ahí se inició una notable disminución (Figura 3).

El análisis de varianza no paramétrico de Friedman no mostró diferencias significativas

entre los rangos promedio de actividad SA-β-gal correspondientes a los cinco y seis primeros pases. Con los siete y ocho primeros pases las diferencias estuvieron cerca del nivel de significancia ($p=0,074$ y $p=0,085$ respectivamente) (Tabla 2).

Figura 3. Distribución de las medianas de la actividad SA-β-gal en cultivos primarios de fibroblastos del estroma y de células epiteliales ováricas

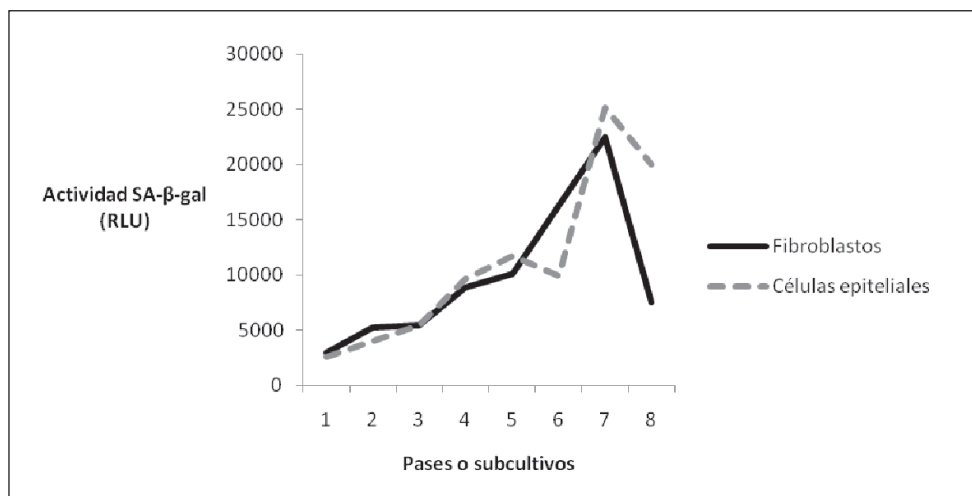


Tabla 2. Rangos promedio de la actividad SA-β-gal normalizada en los ocho primeros pases de los cultivos de fibroblastos del estroma ovárico

Pases $p=0,085$	Rango promedio
1	1,50
2	3,00
3	4,00
4	6,00
5	2,50
6	6,00
7	5,00
8	8,00

Con el fin de comparar los resultados relativos a la actividad SA-β-gal normalizada entre las células epiteliales y los fibroblastos ováricos provenientes de la muestra no estratificada, se aplicó la prueba no paramétrica de los rangos

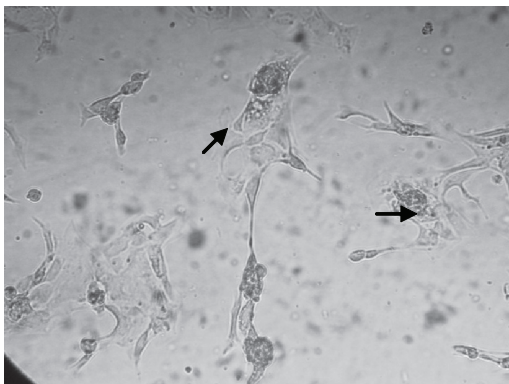
con signo de Wilcoxon. Los resultados mostraron que el rango de la actividad enzimática fue significativamente mayor en el primer pase de los cultivos de fibroblastos, en relación con el mismo pase de los cultivos de células epiteliales

($p=0,033$). En los pases 2 y 5, sin embargo, los rangos de la actividad fueron significativamente mayores en los cultivos de células epiteliales, comparados con los de los pases correspondientes en los cultivos de fibroblastos ($p=0,024$ y $p=0,018$ respectivamente).

Muestra estratificada

Debido a que las medias de la actividad SA- β -gal entre grupos etarios, tanto en fibroblastos como en células epiteliales, no se ajustaron a una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney. En los fibroblastos, los rangos de la actividad enzimática no presentaron diferencias significativas entre grupos etarios. En las células epiteliales, el rango de la actividad enzimática en G2 fue significativamente mayor que en G1, en los pases 1 ($p=0,008$) y 3 ($p=0,014$), mientras que en los pases 2 ($p=0,061$), 4 ($p=0,091$) y 5 ($p=0,129$) los rangos en G2, mayores que en G1, fueron cercanos al nivel de significancia.

Figura 4. Fibroblastos inducidos a senescencia*



* Cuando este tipo de células son inducidas a senescencia, o entran en senescencia replicativa, abandonan su forma ahusada para adoptar la típica morfología aplana, con procesos celulares elongados y numerosos autofagolisosomas que evidencian activación de las vías de autofagia (ver flechas).

Inducción de senescencia

Con posterioridad al tratamiento inductor de senescencia con H_2O_2 aplicado a los fibroblastos, así como a su cultivo subsiguiente durante 5 días más en medio carente del agente oxidante se observó en el microscopio de luz la morfología celular característica de la senescencia. Estas células inducidas a senescencia fueron utilizadas como controles positivos para la lectura de la luminiscencia debida a la actividad SA- β -gal de los fibroblastos no inducidos (Figura 4).

Discusión

Establecimiento y caracterización los de cultivos primarios

La monocapa de fibroblastos cultivados no presentó contaminación con otro tipo de células, lo que pudo ser establecido mediante la caracterización con el método inmunocitoquímico y la inspección visual al microscopio de luz. En caso de coexistencia de dos poblaciones celulares (fibroblastos y células epiteliales) en el primer pase, el número de fibroblastos rápidamente sobrepasará al de células epiteliales, de modo que al final del proceso de subcultivo en forma seriada todas las células resultantes serán fibroblastos.

Capacidad replicativa

La población de fibroblastos normalizada se mantuvo relativamente estable durante el pase 1 y el comienzo del 2, entre los que no hubo diferencias significativas; motivo por el cual este periodo podría equipararse con la fase I o lag de crecimiento de los cultivos. Durante la parte final del pase 2, la totalidad del 3 y parte del 4, la población celular aumentó en forma ostensible, por lo que cabría pensar que estos dos pases corresponden a la fase II o de crecimiento exponencial, aunque sin establecer con

absoluta certeza qué momento correspondería a la fase IIa o de crecimiento rápido y cuál a la IIb o de crecimiento lento, debido a que no hubo diferencias significativas en las poblaciones celulares normalizadas entre dichos pases. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 2), sería factible pensar que la fase IIa estaría comprendida entre la etapa final del pase 2 y gran parte del 3, mientras que la IIb se extendería desde la parte final del pase 3, hasta mediados del pase 4. De manera semejante a lo ocurrido con las células epiteliales, la fase III o estacionaria en los cultivos de fibroblastos se iniciaría hacia el final del pase 4, cuando es aparente el descenso en los valores de las medianas de la población celular normalizada.

Comparación de la capacidad replicativa entre fibroblastos y células epiteliales

Los resultados del análisis estadístico que comparó la población celular normalizada entre estos dos tipos de células están en concordancia con la Figura 4, en la que se muestra el comportamiento de las medianas de dicho parámetro. Así, se puede comprobar la diferencia hallada entre las medias de la población celular normalizada en los pases 1 y 2 de las células epiteliales y los fibroblastos en favor de las primeras; mientras que, en los pases restantes, con excepción del 6, no hubo diferencias significativas. En este orden de ideas, las dos curvas de tendencia de distribución muestran un comportamiento similar a partir del pase 3, exceptuando el pase 6, en el que la población celular normalizada fue mayor en las células epiteliales.

La semejanza observada en la capacidad replicativa de ambos tipos celulares es bien interesante, si se tiene en cuenta la transición epitelio-mesenquimática que pueden experimentar las células epiteliales de la superficie del ovario bajo determinadas circunstancias. Esta transición no sólo permite que las células

exhiban muchas de las características de los fibroblastos del estroma subyacente (13,18), sino también que puedan interactuar –mediante la formación de quistes de inclusión– con el medio ambiente estromal; hecho que contribuye a explicar la génesis del cáncer ovárico de origen epitelial (19). Por otra parte, se ha descrito que durante la reparación postovulatoria del epitelio superficial, aumenta la actividad proliferativa en el estroma subyacente, como mecanismo homeostático que facilitaría la incorporación de las células epiteliales dentro del órgano después de la ovulación, con el fin de permitir su transformación en fibroblastos y por tanto evitar que las formas epiteliales den origen a quistes de inclusión en el estroma, y como consecuencia se corra el riesgo de malignidad (19).

Merece tenerse en cuenta, además, que en nuestro estudio, los fibroblastos y las células epiteliales tuvieron una única procedencia, pues fueron obtenidos a partir de una misma donante, lo que minimizó posibles sesgos en la comparación.

Actividad SA- β -gal

La actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia –más comúnmente conocida como SA- β -gal– corresponde a la actividad β -galactosidasa lisosómica, detectable a pH 6 en cultivos de células que han experimentado senescencia replicativa o senescencia prematura o acelerada (6,7). El fundamento del ensayo efectuado para determinar la actividad enzimática es la capacidad de la β -galactosidasa para clivar el sustrato D-Luciferina-*o*- β -galactopiranosido y producir luciferina. Gracias a la ulterior acción de la luciferasa del reactivo, se emite una señal luminiscente cuya intensidad es proporcional a la cantidad de β -galactosidasa celular y es cuantificable en unidades de luminiscencia relativa (RLU, del inglés *Relative Light Units*) (20).

En este estudio fue evidente el incremento continuo de la actividad SA- β -gal en los fibro-

blastos desde el pase 1 y hasta el 7 (Figura 3), lo que significa que la edad de los cultivos fue determinante en el aumento de la actividad enzimática, aunque los rangos promedio de ésta no hayan mostrado diferencias significativas en el análisis de los cinco y los seis primeros pases, cuando los cultivos habían transitado a través de las tres primeras fases de crecimiento (I, IIa, IIb y III). El máximo de actividad se alcanzó durante el pase 7, cuando los cultivos se encontraban en la fase III estacionaria o senescente. El descenso subsiguiente de la actividad SA- β -gal podría explicarse con base en la disminución significativa de la capacidad replicativa de los cultivos a partir del pase 7 y durante el 8.

Un descenso en la capacidad replicativa de los cultivos puede sugerir, por una parte, que un mayor número de células está entrando en estado senescente, pero por otra, que, sencillamente, la población estaría disminuyendo a causa de muerte celular, en cuyo caso habría que determinar la posible ocurrencia de autofagia, tal como ha sido demostrado en otro tipo de células senescentes como los queratinocitos (21) y como podría inferirse a partir del elevado número de autofagolisosomas que presentaron las células senescentes.

En razón de que el incremento en la actividad SA- β -gal está fuertemente asociado con el estado senescente (9) y, por tanto, con la disminución de la capacidad replicativa, es factible pensar que en los fibroblastos del estroma ovárico la senescencia se inicie a partir de los pases 4-5 de los cultivos, cuando, de acuerdo con la cinética de crecimiento previamente descrita, es evidente la disminución en dicha capacidad replicativa, a semejanza de lo que ocurrió con las células epiteliales de control de nuestro estudio y de lo reportado por Chuaire-Noack *et al* 2010 (22).

En relación con la actividad SA- β -gal entre grupos etarios, aunque no fue posible establecer diferencias significativas en los cultivos

de fibroblastos, sí se hallaron en los de células epiteliales, en los cuales dicha actividad fue mayor en G2, es decir en las donantes mayores de 37 años. Esto también en concordancia con los resultados de un estudio previo de nuestro grupo de investigación (22).

Inducción de senescencia

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una de las mayores fuentes de estrés oxidativo para las células en proliferación. Se ha demostrado que provoca daño en el ADN e induce, por tanto, apoptosis en concentraciones letales; mientras que, a concentraciones subletales, –como las utilizadas en el presente estudio– puede inducir un estado de senescencia prematura, cuyas características son semejantes a las de la senescencia de tipo replicativo (23, 24).

En respuesta a la agresión generada por agentes oxidantes como H_2O_2 , la célula da inicio a diversas cascadas de señalización, o bien, activa mediadores centrales, como por ejemplo: la kinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la kinasa amino terminal c-Jun (JNK), la proteinkinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK), la vía fosfoinositol 3-kinasa (PI(3)K)/Akt, el sistema de señalización asociado al factor nuclear de transcripción (NF)- κ B, la activación de p53 y las proteínas de choque térmico de cuyo balance e interacción depende la respuesta final de la célula (25).

En nuestros resultados se observó que, en algunos casos, la respuesta prevista no fue la esperada, en cuanto a la magnitud de la luminiscencia producida por las células sometidas al tratamiento con H_2O_2 . Al respecto vale la pena anotar que algunas vías de señalización implicadas en la respuesta al estrés oxidativo, como ERK y la proteína de choque térmico Hsp70, pueden disminuir su actividad en función de la edad; de manera que dicha disminución podría incidir de forma negativa en la supervivencia de

las células tratadas y explicaría por qué motivo en unas pocas células se obtuvieron valores bajos, en lugar de los valores altos esperados en la luminiscencia debida a actividad SA- β -gal. En este mismo sentido cabría preguntarse si acaso se produjo activación de la cascada de señalización GAPDH-Siah1 como resultado del estrés oxidativo generado por el H₂O₂ (26), en cuyo caso dicho complejo actuaría a nivel nuclear para promover apoptosis, evento que también podría explicar los bajos valores obtenidos en la luminiscencia debida a actividad SA- β -gal.

Conclusiones

De acuerdo con la actividad SA- β -gal, los fibroblastos del estroma ovárico se tornaron senes-

centes hacia los pases 4-5, en simultaneidad con un descenso en la capacidad replicativa de los cultivos y a semejanza de lo ocurrido con las células del epitelio superficial ovárico utilizadas como control. Esta similitud complementa el acervo de información disponible acerca de la transición epitelio-mesenquimática que explicaría eventos asociados con la transformación maligna de las células epiteliales.

En adición, el hecho de que, bajo condiciones de cultivo, no todas las células sometidas a la inducción de senescencia mediante tratamiento con H₂O₂ respondieran con un aumento en la actividad SA- β -gal, podría sugerir una posible inactivación de las vías de respuesta al estrés de tipo oxidativo.

Agradecimientos

Nuestra gratitud a la doctora Amparo Ramírez, del Hospital Occidente de Kennedy, Bogotá D.C., por su decidida colaboración en la consecución de las muestras de tejido analizadas, así como a la doctora Sandra Milena Rondón por su colaboración en los diferentes ensayos efectuados y al doctor Milciades Ibáñez, de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario, Bogotá D.C., por sus valiosos aportes en los análisis estadísticos del estudio.

Referencias

1. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-636.
2. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biology* 2005; 37:961-976.
3. Elliot WM, Auersperg N. Growth of normal human ovarian surface epithelial cells in reduced-serum and serum-free media. *In vitro Cell Dev Biol* 1993; 29A:9-18.
4. Blasco MA. Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *Eur J Cell Biol* 2003; 82:441-446.
5. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436-642.
6. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:9363-9367.
7. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 2006; 5:187-195.
8. Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, French M. Association of increased autophagic inclusions labeled for β -galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol* 2003; 38:887-895.
9. Maier AB, Westendorp RG, VAN Heemst D. Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100:323-332.

10. Herbst AL. The epidemiology of ovarian carcinoma and the current status of tumor markers to detect disease. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1099-1105.
11. Scully RE. World Health Organization histological classification of tumors. Berlín: Springer Verlag; 1999.
12. Surveillance, epidemiology and end results: Ovary cancer. En: National Cancer Institute, disponible en: <http://seer.cancer.gov/>, recuperado: 14 de enero de 2011.
13. Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, et al. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6249-6254.
14. Auersperg N, Wong AS, Choi K, Kang SK, Leung PCK. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology and Pathology. *Endocr Rev* 2001; 22: 255-288.
15. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133:704-715.
16. Dunfield LD, Shepherd TG, Nachtigal MW. Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cells. *Biol Proced Online* 2002; 4:55-65.
17. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25:585-621.
18. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol* 2007; 213:581-518.
19. Greenaway J, Moorhead R, Shaw P, Petrik J. Epithelial-stromal interaction increases cell proliferation, survival and tumorigenicity in a mouse model of human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 108:385-394.
20. Hannah R, Stroke I, Betz N. Beta-glo® assay system: a luminescent β -galactosidase assay for multiple cell types and media. *Cell Notes* 2003; 6:16-18. Disponible en: www.promega.com, recuperado: 14 de enero de 2011.
21. Deruy E, Gosselin K, Vercamer C, Martien S, Bouali F, Slomianny C, et al. MnSOD upregulation induces autophagic programmed cell death in senescent keratinocytes. *PLoS One* 2010; 5(9):e12712.
22. Chuaire-Noack L, Rondón-Lagos SM, Sánchez-Corredor MC, Ibáñez-Pinilla M, Ramírez-Clavijo SR. β -galactosidase activity as a biomarker of senescence in primary cell cultures of the ovarian surface epithelium. *Invest Clin* 2010; 51(3): 351-367.
23. Bassaneze V, Miyakawa AA, Krieger JE. A quantitative chemoluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Anal Biochem* 2008; 372:198-203.
24. Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H_2O_2 involves DNA damage and repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:1407-1420.
25. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-247.
26. Hara MR, Cascio MB, Sawa A. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762:502-509.

