

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS  
CON LA  
SENESCENCIA DEL EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO**

Lilian Chuaire Noack

**TESIS**

presentada como requisito parcial para optar al título de

**Doctora en Ciencias Biológicas**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Bogotá DC, mayo 18 de 2010

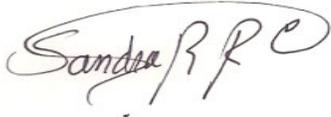
"La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia"

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

**ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES RELACIONADOS  
CON LA  
SENESCENCIA DEL EPITELIO SUPERFICIAL DEL OVARIO**

Lilian Chuaire Noack

**APROBADO**



---

**Sandra Rocío Ramírez Clavijo, PhD**  
Director



---

**Martha C. Bermúdez de Rincón, PhD**  
Jurado



---

**Alba Lucía Cómbita Rojas, PhD**  
Jurado



---

**José Manuel Lozano Moreno, PhD**  
Jurado



---

**María Martínez Agüero, PhD**  
Jurado



---

**Diana María Torres López PhD**  
Jurado

---

**Ingrid Schuler, Biol. PhD**  
Decana Académica  
Facultad de Ciencias

---

**Manuel Antonio Franco, MD, PhD**  
Director de Posgrado  
Facultad de Ciencias

**“Si el Señor no edificare la casa, en vano trabajan los que la edifican; si el Señor no guardare la ciudad, en vano vela la guardia” *Salmo 127:1-2***

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Señor Jesucristo, Supremo Dios y Hacedor, por su amorosa presencia.

A mi esposo Juan José y a mis hijos Juan Esteban, María Liliana y María del Rosario, por su apoyo incondicional, así como a mi directora de tesis Sandra R. Ramírez y a mis compañeros de trabajo Magda Carolina Sánchez Corredor, Victoria Eugenia Villegas, César Ernesto Payán Gómez y Felio Bello, por su invaluable solidaridad y ayuda.

A Aicardo Beltrán y a Mireya Narváez y a mis hermanos de Renovación Cristiana por su inmenso apoyo espiritual.

Un reconocimiento especial por su decidida colaboración a: Amparo Ramírez Corredor, *Hospital Occidente de Kennedy*, Cristian García Morcote, *Universidad del Rosario*, Gonzalo Humberto Arboleda Bustos, *Universidad Nacional de Colombia*, Jaime Alberto Díaz, *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA*, Juan Manuel Anaya Cabrera, Luisa Marina Matheus Merino, Lyda Triviño Daza, Milcíades Ibáñez Pinilla, Paola Cruz Tapias, *Universidad del Rosario*, Pedro Monterrey Gutiérrez, *Pontificia Universidad Javeriana*, *Universidad del Rosario*, Sally Lorena Arboleda Mojica, *Pontificia Universidad Javeriana* y Sandra Milena Rondón Lagos, *Universidad del Rosario*.

Mi agradecimiento sincero a la Pontificia Universidad Javeriana y a la Universidad del Rosario por permitirme hacer de mis sueños una realidad.

A todos aquellos que, de una u otra manera, hicieron posible la realización de este trabajo.

## INDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	3
<b>3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b>	4
<b>3.1. Senescencia</b>	4
<b>3.2. Relación entre senescencia y envejecimiento</b>	5
<b>3.3. Senescencia como biomarcador de premalignidad</b>	6
<b>3.4. Senescencia y oncogénesis</b>	7
<b>3.5. Telómeros y telomerasa</b>	8
<b>3.6. TRF2</b>	11
<b>3.7. Epitelio superficial del ovario (ESO)</b>	13
<b><i>3.7.1. Origen embrionario y diferenciación</i></b>	13
<b><i>3.7.2. Ultraestructura</i></b>	14
<b><i>3.7.3. Propiedades fisiológicas</i></b>	14
<b><i>3.7.4. Etiología de la transformación tumoral de ESO</i></b>	16
<b><i>3.7.5. Técnicas de estudio</i></b>	18
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
<b>5.1. Donantes</b>	21
<b>5.2. Criterios de inclusión y exclusión</b>	21
<b><i>5.2.1. Inclusión</i></b>	21
<b><i>5.2.3. Exclusión</i></b>	21
<b>5.3. Cultivos primarios</b>	21
<b><i>5.3.1. Caracterización de las células epiteliales ováricas</i></b>	24
<b><i>5.3.2. Conteo celular</i></b>	25
<b><i>5.3.3. Capacidad replicativa</i></b>	25
<b><i>5.3.4. Criopreservación</i></b>	26
<b><i>5.3.5. Recuperación de las células criopreservadas</i></b>	26
<b>5.4. Inducción de senescencia</b>	26
<b>5.5. Actividad de la enzima SA-β-gal</b>	27
<b>5.6. Cuantificación de proteínas</b>	29
<b>5.7. Cuantificación de la expresión de hTERT y TRF2</b>	30

5.7.1. Extracción del ARN	30
5.7.2. Tratamiento con ADNasa	31
5.7.3. Cuantificación y verificación de la integridad del ARN	31
5.7.4. Síntesis de ADN complementario	32
5.7.5. PCR tiempo real o cuantitativa	32
5.7.6. Selección de los primers o cebadores	33
5.7.7. Estandarización de las condiciones de la qPCR	34
5.7.8. Curvas de eficiencia	35
5.7.8.1. hTERT	35
5.7.8.1.1. Purificación del plásmido	36
5.7.8.1.2. Cálculo del número de moléculas del plásmido	36
5.7.8.1.3. Límite de inferior de detección de hTERT	37
5.7.8.2. TRF2 y GAPDH	38
5.7.9. Eficiencia	38
5.7.10. qPCR de las muestras	38
5.7.11. Validación del ensayo qRT-PCR para GAPDH como gen control para los ensayos con las muestras de células epiteliales ováricas	39
5.7.12. Análisis de los datos obtenidos	39
5.8. Cariotipo	39
5.8.1. Procesamiento	40
5.8.2. Coloración diferencial	40
5.8.3. Análisis cromosómico	40
6. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO	40
6.1. Hipótesis	41
6.2. Procedimiento de muestreo y tamaño de muestra	41
6.3. Diseño de la muestra	42
6.4. Análisis estadístico	42
7. RESULTADOS	46
7.1. Establecimiento de cultivos primarios	46

<b>7.1.1. Selección del medio de cultivo</b>	46
<b>7.1.2. Caracterización de las células epiteliales</b>	48
<b>7.1.3. Criopreservación</b>	49
<b>7.1.4. Conteo celular</b>	50
<b>7.2. Crecimiento de las células cultivadas</b>	50
<b>7.2.1. Capacidad replicativa</b>	50
<b>7.2.1.1. Parte I</b>	50
<b>7.2.1.1.1. Muestra no estratificada</b>	51
• <i>Células epiteliales</i>	51
• <i>Fibroblastos</i>	52
<b>7.2.1.1.2. Muestra estratificada</b>	54
• <i>Células epiteliales</i>	54
• <i>Fibroblastos</i>	54
<b>7.2.1.1.3. Comparación de la capacidad replicativa entre las células epiteliales y los fibroblastos</b>	55
<b>7.2.1.1.4. Conteo celular</b>	55
<b>7.2.1.2. Parte II</b>	56
<b>7.2.1.2.1. Muestra no estratificada</b>	56
<b>7.2.1.2.2. Muestra estratificada</b>	58
<b>7.2.2. Comparación de las poblaciones normalizadas de células epiteliales entre las dos partes del estudio</b>	59
<b>7.3. Actividad SA-<math>\beta</math>-gal</b>	59
<b>7.3.1. Parte I</b>	59
<b>7.3.1.1. Muestra no estratificada</b>	60
• <i>Células epiteliales</i>	60
• <i>Fibroblastos</i>	62
• <i>Comparación de la actividad SA-<math>\beta</math>-gal entre células epiteliales y fibroblastos ováricos</i>	63
<b>7.3.1.2. Muestra estratificada</b>	64
• <i>Células epiteliales</i>	64
• <i>Fibroblastos</i>	64
<b>7.3.2. Parte II</b>	64

<b>7.3.2.1. Muestra no estratificada</b>	64
<b>7.3.2.2. Muestra estratificada</b>	71
<b>7.3.3. Comparación de la actividad SA-β-gal de las células epiteliales entre las dos partes del estudio</b>	72
<b>7.3.4. Inicio de la senescencia y edad de las donantes</b>	74
<b>7.4. Inducción de senescencia</b>	75
<b>7.5. Cuantificación de la expresión de hTERT y TRF2</b>	76
• <i>Cuantificación y verificación de la integridad del ARN</i>	76
• <i>Estandarización de las condiciones de la qPCR</i>	77
• <i>Curvas de eficiencia</i>	82
▪ <i>hTERT</i>	82
- <i>Límite inferior de detección para hTERT</i>	84
▪ <i>TRF2</i>	86
▪ <i>GAPDH</i>	88
• <i>Validación del ensayo qRT-PCR para GAPDH</i>	90
• <i>Eficiencia</i>	91
<b>7.5.1. qPCR de las muestras</b>	91
<b>7.5.1.1. Expresión relativa de hTERT, TRF2 y GAPDH en células epiteliales</b>	92
• <i>Estadísticos descriptivos de TRF2 y GAPDH</i>	92
• <i>Análisis de la expresión relativa de TRF2</i>	94
• <i>Análisis de la expresión relativa de GAPDH</i>	94
• <i>Análisis de la expresión relativa de hTERT</i>	95
<b>7.5.1.2. Expresión relativa de hTERT, TRF2 y GAPDH en fibroblastos</b>	98
<b>7.5.2. Relación entre la expresión de hTERT, TRF2 y GAPDH y la actividad SA-β-gal</b>	99
<b>7.6. Cariotipo</b>	100
<b>7.6.1. Pase uno</b>	100

7.6.2. <i>Pase cuatro</i>	105
7.6.3. <i>Relación entre la actividad SA-β-gal y la presencia de anomalías cromosómicas</i>	108
<b>8. DISCUSIÓN</b>	108
<b>8.1. Establecimiento de cultivos primarios</b>	108
8.1.1. <b>Selección del medio de cultivo</b>	109
8.1.2. <b>Caracterización de las células epiteliales</b>	111
8.1.3. <b>Criopreservación</b>	112
<b>8.2. Crecimiento de las células cultivadas</b>	113
8.2.1. <b>Capacidad replicativa</b>	113
• <i>Células epiteliales</i>	113
• <i>Fibroblastos</i>	113
• <i>Comparación de la capacidad replicativa entre células epiteliales y fibroblastos</i>	114
<b>8.3. Actividad SA-β-gal</b>	115
<b>8.4. Inducción de senescencia</b>	119
<b>8.5. Cuantificación de la expresión de hTERT y TRF2</b>	120
8.5.1. <b>qPCR</b>	120
• <b>Cuantificación absoluta</b>	121
• <b>Cuantificación relativa</b>	122
▪ <i>Genes de referencia</i>	123
- <i>Expresión relativa de GAPDH</i>	123
- <i>Estrategias de normalización</i>	126
• <b>Expresión relativa de TRF2</b>	128
• <b>Expresión relativa de hTERT</b>	129
<b>8.6. Anomalías cromosómicas</b>	131
<b>9. CONCLUSIONES</b>	133
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	134
<b>11. REFERENCIAS</b>	136

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 5.1.-</b> Resumen de las reacciones acopladas en el Beta-Glo® Assay System	27
<b>Figura 5.2.-</b> Plásmido 1773: pBABE-hygro-hTERT. Addgene plasmid 1774	35
<b>Figura 7.1.-</b> Células del epitelio superficial del ovario en pase dos	47
<b>Figura 7.2.-</b> Fibroblastos del estroma ovárico en pase dos	47
<b>Figura 7.3.-</b> Células del epitelio superficial del ovario en pase uno, cultivadas con el medio MegaCell MEM/F12- HAM con 10% SFB	48
<b>Figura 7.4.-</b> Caracterización de las células epiteliales con anticitoqueratina 18-FITC	49
<b>Figura 7.5.-</b> Tendencia de la distribución de las medianas de la población celular normalizada en los cultivos primarios de células epiteliales ováricas	51
<b>Figura 7.6.-</b> Tendencia de la distribución de las medianas de la población celular normalizada en cultivos primarios de fibroblastos ováricos	53
<b>Figura 7.7.-</b> Tendencias de distribución de las medianas de la población celular normalizada de los cultivos primarios de células epiteliales y fibroblastos ováricos	55
<b>Figura 7.8.-</b> Tendencia de la distribución de las medianas de la población celular normalizada en cultivos primarios de células epiteliales ováricas	57
<b>Figura 7.9.-</b> Cultivo de células epiteliales ováricas provenientes de una donante de 28 años de edad	57
<b>Figura 7.10.-</b> Tendencias de distribución de las medianas de la población celular normalizada de las células epiteliales de la primera y la segunda parte del estudio	59
<b>Figura 7.11.-</b> Tendencia de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal en cultivos primarios de células epiteliales ováricas	61
<b>Figura 7.12.-</b> Tendencia de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal en cultivos primarios de fibroblastos del estroma ovárico	62
<b>Figura 7.13.-</b> Tendencia de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal en cultivos primarios de células epiteliales ováricas	65
<b>Figura 7.14.-</b> Tendencias de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal y de la población celular normalizada en cultivos primarios de células	66

epiteliales ováricas	
<b>Figura 7.15.-</b> Comparación de los intervalos de confianza de 95% de los promedios de la actividad SA- $\beta$ -gal en dos grupos etarios, en los países cuatro y cinco de los cultivos primarios de células epiteliales ováricas	71
<b>Figura 7.16.-</b> Tendencias de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal en las muestras no estratificadas de las dos partes del estudio	72
<b>Figura 7.17.-</b> Tendencias de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal y de la población celular normalizada de las células epiteliales ováricas cultivadas, en los dos grupos etarios: A. G1. B. G2.	74
<b>Figura 7.18.-</b> Fibroblastos inducidos a senescencia	75
<b>Figura 7.19.-</b> Fluorescencia emitida por los productos de amplificación de hTERT bajo condiciones de un gradiente de temperatura	77
<b>Figura 7.20.-</b> Fluorescencia emitida por los productos de amplificación de TRF2 bajo condiciones de un gradiente de temperatura	78
<b>Figura 7.21.-</b> Fluorescencia emitida por los productos de amplificación de GAPDH bajo condiciones de un gradiente de temperatura	78
<b>Figura 7.22.-</b> Curvas de melting de hTERT, generadas bajo un gradiente de temperatura	79
<b>Figura 7.23.-</b> Curvas de melting de TRF2, generadas bajo un gradiente de temperatura	79
<b>Figura 7.24.-</b> Curvas de melting de GAPDH, generadas bajo un gradiente de temperatura	80
<b>Figura 7.25.-</b> Visualización del producto amplificado de hTERT sobre gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio	80
<b>Figura 7.26.-</b> Visualización del producto amplificado de TRF2 sobre gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio	81
<b>Figura 7.27.-</b> Visualización del producto amplificado de GAPDH sobre gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio	81
<b>Figura 7.28.-</b> Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de la amplificación de hTERT, correspondientes a las diluciones seriadas del plásmido, y el ciclo umbral de detección (CT) de amplificación para cada una	82
<b>Figura 7.29.-</b> Curva de eficiencia de hTERT	83

<b>Figura 7.30.-</b> Curvas de melting de hTERT para cada una de las diluciones de ADNc	83
<b>Figura 7.31.-</b> Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de la amplificación de hTERT y los ciclos umbrales de detección de la amplificación (CT), para diluciones de ADNc mayores a las examinadas en la curva de eficiencia	84
<b>Figura 7.32.-</b> Relación entre el logaritmo del número de moléculas de hTERT amplificadas a partir de cada dilución de ADNc y el ciclo umbral de detección (CT)	85
<b>Figura 7.33.-</b> Curvas de melting de hTERT	85
<b>Figura 7.34.-</b> Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de amplificación de TRF2, correspondientes a las diluciones seriadas del ADNc obtenido a partir de los fibroblastos de cordón umbilical y el ciclo umbral de detección (CT)	86
<b>Figura 7.35.-</b> Curva de eficiencia de TRF2	87
<b>Figura 7.36.-</b> Curvas de melting de TRF2	87
<b>Figura 7.37.-</b> Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de la amplificación de GAPDH -correspondientes a las diluciones seriadas del ADNc obtenido a partir de fibroblastos de cordón umbilical- y el ciclo umbral de detección (CT)	88
<b>Figura 7.38.-</b> Curva de eficiencia de GAPDH	89
<b>Figura 7.39.-</b> Curvas de melting de GAPDH	89
<b>Figura 7.40.-</b> Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de amplificación de GAPDH, provenientes de muestras de células epiteliales ováricas de distintas donantes, en diferentes pases de cultivo y el ciclo umbral de detección (CT)	90
<b>Figura 7.41.-</b> Temperatura de melting de los fragmentos amplificados de GAPDH de muestras de células epiteliales ováricas seleccionadas al azar	91
<b>Figura 7.42.-</b> Box-plot que muestra la distribución en cuartiles de los resultados de la expresión relativa de TRF2 a lo largo de los pases examinados	93
<b>Figura 7.43.-</b> Box-plot que muestra la distribución en cuartiles de los	94

resultados de la expresión relativa de GAPDH a lo largo de los pases  
examinados

**Figura 7.44.-** Tendencia de la distribución de medianas de la expresión de TRF2 y GAPDH en cultivos de células epiteliales ováricas 95

**Figura 7.45.-** Frecuencias de expresión relativa de hTERT durante siete pases de cultivo de células epiteliales, con intervalos de confianza 98

**Figura 7.46.-** Tetraploidía 96, XXXX <4n> 100

**Figura 7.47.-** Promedio e intervalo de confianza del 95% de la frecuencia de células con metafase anormal sobre el número total de células en metafase, por grupos etarios 105

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 7.1.-</b> Rangos promedio de la población celular normalizada en los cultivos de células epiteliales ováricas	52
<b>Tabla 7.2.-</b> Rangos promedio de la población celular normalizada en cultivos de fibroblastos ováricos	54
<b>Tabla 7.3.-</b> Rangos promedio de la población celular normalizada de cultivos de células epiteliales ováricas para los cinco, seis y siete primeros pases	58
<b>Tabla 7.4.-</b> Rangos promedio de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada en los seis, siete y ocho primeros pases de los cultivos de células epiteliales ováricas	61
<b>Tabla 7.5.-</b> Rangos promedio de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada en los ocho primeros pases de los cultivos de fibroblastos del estroma ovárico	63
<b>Tabla 7.6.-</b> Rangos promedio de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada en los seis, siete y ocho primeros pases de los cultivos de células epiteliales ováricas	67
<b>Tabla 7.7.-</b> Medias marginales estimadas de la actividad SA- $\beta$ -gal en los siete primeros pases de los cultivos de células epiteliales ováricas	67- 68
<b>Tabla 7.8.-</b> Estadísticos descriptivos de la actividad SA- $\beta$ -gal en cultivos primarios de células epiteliales ováricas, previa transformación con logaritmo natural	68
<b>Tabla 7.9.-</b> Estimación de las medias, desviación estándar e intervalos de confianza de 95% de la actividad SA- $\beta$ -gal, cuando se consideraron los seis primeros pases de los cultivos primarios de células epiteliales ováricas	69 - 70
<b>Tabla 7.10.-</b> Estimación de las medias, desviación estándar e intervalos de confianza de 95% de la actividad SA- $\beta$ -gal, cuando se consideraron los siete primeros pases de los cultivos primarios de células epiteliales ováricas	70
<b>Tabla 7.11.-</b> Estadísticos descriptivos (media, mediana y desviación estándar) de la actividad SA- $\beta$ -gal en los diferentes pases de los cultivos de células epiteliales ováricas en las dos partes del estudio	73
<b>Tabla 7.12.-</b> Actividad SA- $\beta$ -gal en células epiteliales inducidas a senescencia y sus correspondientes no inducidas	76
<b>Tabla 7.13.-</b> Media y desviación estándar de la expresión relativa de TRF2	92

en cada pase de los cultivos analizados	
<b>Tabla 7.14.-</b> Media y desviación estándar de la expresión relativa de GAPDH en cada pase de los cultivos analizados	93
<b>Tabla 7.15.-</b> Frecuencias de detección de la amplificación de hTERT en cultivos primarios de células epiteliales durante siete pases	96
<b>Tabla 7.16.-</b> Valores p obtenidos en el modelo de regresión logística aplicado para analizar la expresión relativa de hTERT	97
<b>Tabla 7.17.-</b> Rangos promedio de expresión relativa de hTERT, TRF2 y GAPDH en fibroblastos y estadísticos de contraste obtenidos en la prueba de Kruskal-Wallis	99
<b>Tabla 7.18.-</b> Datos demográficos de las donantes y valores de las variables de las aberraciones citogenéticas de los correspondientes cultivos (pase uno)	101 - 102
<b>Tabla 7.19.-</b> Medidas descriptivas y pruebas estadísticas de las variables de las aberraciones citogenéticas de los cultivos de las muestras de las donantes, clasificadas por grupos etarios	104
<b>Tabla 7.20.-</b> Datos demográficos y de valores de las variables de aberraciones citogenéticas de las muestras de las pacientes del estudio (pase cuatro)	106 - 107

## RESUMEN

El presente trabajo aborda uno de los temas de investigación más apasionantes y con mayor trascendencia en el campo de la biología celular y molecular. La senescencia permite a las células postmitóticas o a las que han sufrido algún daño en su material genómico entrar en estado irreversible del crecimiento, que aunque no es incompatible con la vida, sí afecta el entorno tisular, de manera que los tejidos pueden progresar hacia el envejecimiento, o bien, hacia la aparición de enfermedades caracterizadas por la hiperproliferación. En este orden de ideas y teniendo en cuenta que el epitelio superficial del ovario es un tejido que presenta una elevada susceptibilidad a la transformación maligna, se determinó la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y la presencia de anomalías cromosómicas – ambos considerados como marcadores de senescencia- en cultivos primarios de células epiteliales ováricas de donantes de diferentes edades. En adición, se efectuó cuantificación relativa de la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT), enzima transcriptasa reversa encargada de elongar los extremos teloméricos de los cromosomas en las células progenitoras de los tejidos como también en las células cancerosas, y de TRF2, proteína asociada al telosoma, complejo que determina la estabilidad del casquete telomérico, uno de los factores que se encuentran afectados cuando las células se tornan senescentes. De acuerdo con los resultados obtenidos, los cultivos primarios de células epiteliales alcanzaron el estado senescente (establecido con base en el aumento de actividad  $\beta$ -galactosidasa y un descenso simultáneo en la capacidad replicativa) hacia el pase cuatro. No se halló significancia estadística en la expresión relativa de hTERT y de TRF2 en respuesta a la edad cronológica de las donantes o la edad de los cultivos, expresada en términos de pases. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas en la frecuencia de aparición de poliploidías en los cultivos de las donantes mayores de 50 años. Se determinó que, en unos pocos pases de cultivo, la actividad  $\beta$ -galactosidasa y la expresión de dichos genes está correlacionada, mientras que, por otra parte, no hubo correlación entre la actividad enzimática y la presencia de anomalías cromosómicas.

## **SUMMARY**

This work addresses one of the most exciting research topics in the field of the cellular and molecular biology. The senescence allows postmitotic cells or those who have suffered damage in their genomic material to enter into an irreversible growth state not incompatible with life, although it does affect the tissue environment, so that the tissues can progress toward ageing or, in the other hand, to hyperproliferative diseases. In this order of ideas and taking into account that the ovarian surface epithelium is highly susceptible to malignant transformation, we determined the  $\beta$ -galactosidase activity and also the presence of chromosomal abnormalities - both deemed as senescence markers - in ovarian epithelial primary cultures from donors of different ages. In addition, quantification was performed on the expression of the catalytic subunit of telomerase (hTERT), the reverse transcriptase enzyme responsible for elongating the telomeric ends of chromosomes, in the tissue stem cells as well as in cancer cells, and also TRF2. This telosome-associated protein forms a complex that determines the telomeric cap stability, one of the factors affected when cells become senescent. According to our results, epithelial primary cultures reached the senescent state (established on the basis of an increase of  $\beta$ -galactosidase activity and a simultaneous decrease in the replicative capacity) in the fourth passage. There was no statistical significance in the relative expression of hTERT and TRF2, in response to the chronological age of donors or the culture age, expressed in terms of passages. However, significant differences in polyploidy frequencies were found in cultures from donors older than 50. It was determined that, in a few passages, both  $\beta$ -galactosidase activity and the hTERT and TRF2 expression are correlated while, on the other hand, there was no correlation between enzymatic activity and the presence of chromosomal abnormalities.

## 1. INTRODUCCIÓN

La senescencia es una opción celular que ha sido considerada como un tipo especial de muerte "viviente", e incluida por algunos en la categoría de muerte no apoptótica, en conjunto con otros mecanismos como la necrosis, la autofagia y la catástrofe mitótica (Okada y Mak 2004). Aunque su naturaleza no ha sido bien comprendida aún, la evidencia indica que cuando las células alcanzan este estado, detienen su crecimiento en forma permanente, lo que impide su clonogenicidad, aunque retienen su actividad metabólica, así como la integridad de la membrana plasmática (Okada y Mak 2004). Después del descubrimiento de que tanto *in vitro* como *in vivo* las células limitan su capacidad proliferativa, se postuló a la senescencia como un mecanismo supresor tumoral, con base en la observación del papel protector que ejerce contra el cáncer en los organismos jóvenes. En adición a este efecto beneficioso, se le han adjudicado efectos deletéreos asociados con la edad, debido a que, en apariencia, la senescencia recapitula el envejecimiento y por tanto la pérdida de función y de capacidad de regeneración tisular. Esta pleiotropía antagónica atribuida a la senescencia tiene en cuenta que los mecanismos supresores tumorales evolucionaron en periodos de la historia de la humanidad en los que la esperanza de vida era muy corta, debido, al menos en parte, a peligros como las enfermedades infecciosas y la depredación. Así, dichos mecanismos funcionaban muy bien durante las pocas décadas que duraba la vida del *Homo sapiens*, mientras que en etapas más avanzadas, sus efectos deletéreos difícilmente eran eliminados, en razón de la poca presión selectiva ejercida en contra de ellos (Campisi y D'Adda di Fagagna 2007).

Se ha demostrado que entre los factores que inducen la senescencia se encuentran el acortamiento telomérico, el daño del ADN, la activación de oncogenes, el estrés oxidativo, la carencia de nutrientes y la deprivación de factores de crecimiento. Estos factores no actúan en forma independiente, sino que más bien confluyen y se complementan en alguna parte del proceso (Ben-Porath y Weinberg 2005). El estudio de estos factores reviste particular importancia, en razón de que cualquier defecto en el programa de senescencia puede contribuir a la tumorigénesis, circunstancia que la convierte en blanco terapéutico contra el cáncer.

Con relación al acortamiento de los telómeros, debe tenerse en cuenta que éstos son estructuras especializadas localizadas en los extremos de los cromosomas de las células eucariotas. Cuatro décadas de investigación han permitido relacionarlos con los procesos de senescencia, muerte e inmortalización celular. Esto se debe a su acortamiento gradual durante cada división celular, provocado a su vez por la incapacidad de la ADN polimerasa para replicar en forma completa los extremos terminales de los cromosomas (Lin y Yan 2005). Tanto el acortamiento como la proteína TRF2 (*del inglés TTAGGG Repetition Factor 2*) asociada al casquete telomérico, funcionan como mecanismos de protección de los telómeros. Cuando éstos alcanzan una longitud crítica, se produce inestabilidad genómica y la célula no se puede multiplicar. TRF2 por su parte, evita la pérdida del casquete, de modo que el ADN telomérico erosionado no puede ser reconocido por la maquinaria reparadora del daño (Okada y Mak 2004, Lin y Yan 2005). Estos hechos determinan que las células normales envejecidas, con telómeros cortos, salgan del ciclo celular, se tornen senescentes y mueran en forma no dilucidada aún. Sin embargo, es posible que algunas células, no obstante tener sus telómeros cortos, escapen de la senescencia y puedan entrar de nuevo al ciclo celular. Estas células adquieren inmortalidad y se pueden transformar en células malignas o tumorales (Wu *et al* 2003).

La telomerasa es una enzima constituida por dos subunidades: una catalítica (hTERT) y una de ARN, que actúa como molde para sintetizar nuevas repeticiones teloméricas. Ausente o poco expresada en células somáticas, la subunidad catalítica presenta actividad en células como las embrionarias, las células madre, las germinativas y en la mayoría de las tumorales, en las que contrarresta el problema de la ausencia de replicación en los extremos de los telómeros, para permitir su estabilización (Wai 2004, Polychronopoulou y Koutroumba 2004). Como resultado, las células con actividad telomerasa pueden continuar en división, pues sin importar cuán cortos sean sus telómeros, la longitud de éstos se estabiliza. Por otra parte, se ha determinado que las células senescentes presentan un aumento en la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 (*SA- $\beta$ -gal*, *del inglés senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*), circunstancia que ha justificado su utilización como biomarcador de senescencia y envejecimiento *in vitro* e *in vivo*.

La actividad SA- $\beta$ -gal y la longitud telomérica, así como la expresión y actividad de hTERT varían considerablemente con la edad y con el tipo celular, lo que puede justificar su utilización como biomarcadores que permitan evaluar la historia y el potencial replicativo en tejidos y en grupos etarios diferentes. En algunos tejidos ha sido posible identificar un patrón de dinámica telomérica y de expresión de telomerasa (Baxter *et al* 2004, Bischoff *et al* 2006). No es el caso de las células del epitelio superficial del ovario (ESO) cultivadas, en las que, además, no se ha establecido si existe correlación entre factores como la edad cronológica y posibles marcadores de la edad biológica, como la actividad SA- $\beta$ -gal y la expresión de hTERT y de TRF2. Al respecto, es importante resaltar que cuando la edad biológica es mayor que la edad cronológica, aumenta el riesgo de aparición de patologías relacionadas con el envejecimiento, como el mal de Alzheimer, la enfermedad coronaria y el cáncer ovárico derivado de ESO, entre otras (Wu *et al* 2003, Bischoff *et al* 2006, Jenkins *et al* 2006, Tristano *et al* 2003, Brouillette *et al* 2003). Por este motivo cobra pertinencia la investigación sobre la relación entre senescencia y envejecimiento en el epitelio superficial del ovario, mediante la determinación de marcadores como actividad SA- $\beta$ -gal y anomalías cromosómicas, así como de los niveles de expresión de hTERT y TRF2 en cultivos de donantes de diferentes edades sin antecedentes de cáncer.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo general del presente trabajo consistió en determinar la posible asociación entre eventos como la senescencia celular -evaluada mediante la actividad SA- $\beta$ -gal-, la expresión de hTERT y de TRF2 y la presencia de anomalías cromosómicas en cultivos primarios de células normales del epitelio superficial del ovario, obtenidos a partir de donantes en diferentes rangos de edad.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Establecer cultivos primarios a partir de células epiteliales de la superficie ovárica, así como de fibroblastos del estroma del mismo órgano, de mujeres de diferentes edades.

2. Comparar la población celular normalizada de las células epiteliales y de los fibroblastos cultivados.
3. Evaluar la actividad del marcador de senescencia SA- $\beta$ -gal en los cultivos de células epiteliales ováricas y de fibroblastos de donantes de diferentes edades.
4. Evaluar la posible asociación entre la edad cronológica (indicada por el grupo etario correspondiente) y la edad biológica de ESO (establecida con base la actividad SA- $\beta$ -gal y el pase de inicio de la senescencia).
5. Identificar si en las células ESO existe relación entre la expresión de hTERT, la senescencia y el envejecimiento, mediante la comparación entre dicha expresión y la actividad SA- $\beta$ -gal en los grupos etarios establecidos.
6. Evaluar el papel del gen TRF2 en los estados de senescencia y envejecimiento, mediante la determinación de su expresión en las células ESO, desde el primer pase hasta la senescencia, en cada grupo etario.
7. Identificar posibles anomalías cromosómicas asociadas con la senescencia y el envejecimiento en las células epiteliales ováricas.
8. Evaluar la posible asociación entre probables factores relacionados con senescencia y envejecimiento, como actividad SA- $\beta$ -gal, anomalías cromosómicas y expresión de hTERT y de TRF2, con la edad cronológica de las donantes.

### **3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

#### **3.1. Senescencia**

Se considera a la senescencia como una forma especializada de diferenciación terminal, usualmente irreversible y de ocurrencia tanto *in vivo* como *in vitro* (Dimri *et al* 1995). En 1965, Hayflick la describió como un estado de detención permanente del ciclo celular, que si bien resulta del agotamiento de la capacidad replicativa de las células diploides normales en cultivo, no impide su viabilidad ni su actividad metabólica (Hayflick 1965). Factores como el acortamiento telomérico, el daño del ADN, la activación de oncogenes, el estrés oxidativo y la deprivación de nutrientes y/o de factores de crecimiento entre otros, tornan senescentes a las células (Ben-Porath y Weinberg 2005).

La senescencia constituye un importante factor de riesgo en el proceso de transformación tumoral el que, bajo condiciones normales, puede ser detenido por los mecanismos de control que bloquean el crecimiento de las células y activan por tanto su muerte (Campisi 2005, Wright y Shay 2001). Sobre este punto existe evidencia que demuestra que cuando una célula escapa del estado senescente y se inmortaliza, se transforma en una célula maligna tumoral (Elliot y Auersperg 1993, Blasco 2003). El fenotipo de las células senescentes es el de células grandes, de apariencia mesenquimática, con dificultad para alcanzar el punto de confluencia *in vitro* (Dunfield *et al* 2002). Sin embargo, la senescencia no corresponde sólo a un estado de detención del crecimiento celular, sino también involucra cambios en la expresión de ciertos genes como p53, p16, p21 y rb, además de tornar a las células resistentes a la apoptosis (Okada y Mak 2004, Campisi 2005, Krtolica y Campisi 2002). Esto explica por qué motivo las células senescentes se acumulan para contribuir, tanto al proceso de envejecimiento, como a la génesis de enfermedades asociadas con este proceso.

### **3.2. Relación entre senescencia y envejecimiento**

El envejecimiento corresponde al proceso relacionado con la capacidad de reparación y regeneración de los tejidos de los animales complejos la que, a su vez, depende de la proliferación de células poco diferenciadas, denominadas células madre o progenitoras (Beausejour y Campisi 2006). La disminución gradual de dicha capacidad regenerativa es lo que determina la aparición de las características propias del envejecimiento. Esto explicaría la asociación entre envejecimiento y senescencia, como ha sido demostrado con el gen supresor tumoral p16. La expresión de este gen aumenta con la edad y no sólo limita la capacidad de autorrenovación de las células progenitoras, sino que además provoca el envejecimiento de tejidos como médula ósea, cerebro e islotes pancreáticos (Janzen *et al* 2006, Molofsky *et al* 2006). Debido a que la senescencia promueve la declinación de la función celular en el envejecimiento, se ha postulado que ejerce un efecto protector contra el cáncer en edades tempranas, mientras que, en las edades mayores promueve el fenotipo típico del envejecimiento (Campisi 2005), concepto que ha sido enmarcado en el contexto de la teoría evolutiva del envejecimiento

conocida como pleiotropía antagónica (Kirkwood y Austad 2000). Se ha encontrado que, en los tejidos con alteraciones patológicas hiperplásicas o premalignas, las células senescentes se acumulan, lo que favorece la teoría que sostiene que el desarrollo del cáncer es dependiente de la edad (Campisi 2003a, Campisi 2003b). Por este motivo, resulta paradójico que un mecanismo supresor tumoral como la senescencia pueda estimular el desarrollo del cáncer en las etapas tardías de la vida.

El potencial replicativo de las células madre o progenitoras constituye un arma de doble filo pues, por una parte aumenta la capacidad de reparación tisular, pero por otra, abre la puerta para la aparición de enfermedades caracterizadas por hiperproliferación celular, como es el caso del cáncer (Beausejour y Campisi 2006). Sin embargo, las células potencialmente cancerosas pueden ser eliminadas con la puesta en marcha de los mecanismos supresores tumorales, como la apoptosis - que provoca su eliminación- o la senescencia, que evita su proliferación. Esto hace que el anhelo atávico de la "eterna juventud" no sea más que una quimera, si se considera que para conseguirla las células tendrían que mantener intacta su capacidad proliferativa a través del tiempo, con el riesgo implícito de que, en forma simultánea, esa misma capacidad sea la causante de la aparición de las entidades patológicas que, como el cáncer, escaparían al control ejercido por los mecanismos supresores tumorales. Se vislumbra entonces la relación que existe *in vivo* entre la senescencia celular y el grado de envejecimiento de los tejidos o del individuo.

### **3.3. Senescencia como biomarcador de premalignidad**

La senescencia constituye en la actualidad un atractivo marcador de premalignidad. Hallazgos previos de acúmulos de células senescentes asociados con lesiones premalignas, con características morfológicas normales y carentes de capacidad invasiva permiten afirmarlo. En sistemas *in vitro*, como los cultivos primarios, es posible cuantificar la actividad SA- $\beta$ -gal-, cuya expresión aumenta en las células senescentes (Dimri *et al* 1995), o determinar la presencia de otros marcadores de senescencia, como los focos de heterocromatina, en los que se acumulan proteínas generadas en respuesta al daño del ADN telomérico (Narita 2007). Mediante técnicas histoquímicas es factible establecer la presencia de células senescentes en cada pase de un cultivo celular, en función de la actividad SA- $\beta$ -gal, pues ésta es un

reflejo la biogénesis lisosomal propia del estado senescente. Mientras el incremento en el número de lisosomas está relacionado con la activación de la autofagia (Ballabio 2009), el aumento en la actividad SA- $\beta$ -gal probablemente obedezca a la necesidad de clivar residuos  $\beta$ -D-galactosa de las glicoproteínas, los esfingolípidos y el queratán sulfato presentes en los autofagolisosomas, en el marco del mismo proceso (Maier *et al* 2007).

*In vitro*, se puede establecer si existe relación entre la edad de las donantes de las células cultivadas y el tiempo necesario para alcanzar el estado senescente. Al respecto, la edad cronológica es un factor aún no evaluado en las células ESO en cultivo. Existen reportes en varios tipos de tejido que indican que, a una mayor edad de los donantes, las células cultivadas tienden a senescer después de unos pocos doblajes poblacionales, mientras que, si los donantes son jóvenes, la capacidad replicativa es mayor y por tanto aumenta el número de doblajes poblacionales previos al inicio de la senescencia. Estos reportes concuerdan con la idea de que la capacidad replicativa de las células se agota durante el proceso natural de envejecimiento (Yang *et al* 2001, Patil *et al* 2005), lo que es explicable si se tiene en cuenta que la capacidad replicativa de las células cultivadas refleja en forma indirecta su sensibilidad o su resistencia al estrés, lo que a su vez, está correlacionado con la longevidad (Lithgow y Walker 2002).

### **3.4. Senescencia y oncogénesis**

Las señales proliferativas características de la oncogénesis están acopladas con procesos que inhiben la proliferación celular, como la senescencia y la apoptosis, de los que se piensa, actúan como guardianes contra el desarrollo neoplásico (Collado *et al* 2005, Michaloglou *et al* 2005).

A diferencia de la apoptosis, las células senescentes son viables, incluso por largo tiempo, a pesar de hallarse en un estado de detención del ciclo celular. El estado senescente puede ser inducido por diversos estímulos asociados con el crecimiento neoplásico, como la activación de oncogenes, el daño del ADN y la disfunción telomérica, entre otros (Ben-Porath y Weinberg 2005). En los organismos sanos, el papel de la senescencia fue motivo de controversia durante largo tiempo. Inicialmente se consideró artefacto del cultivo celular, pero esta idea fue revaluada

gracias a la evidencia del papel limitante que ejerce contra el crecimiento tumoral (Collado *et al* 2005, Michaloglou *et al* 2005). Como ejemplo clásico de ello está el *nevus* displásico, lesión precursora del melanoma, en el que, si bien aparecen mutaciones oncogénicas propias del melanoma, no ocurre proliferación celular y por el contrario, se expresa un fenotipo senescente. Estos hechos llevaron a postular a la senescencia como un mecanismo protector que limitaría la transformación maligna (Ramsey y Sharpless 2006).

Aunque incapaces de dividirse, las células senescentes permanecen metabólicamente activas y, en adición, adquieren un fenotipo secretor. Así, ellas pueden secretar citocinas proinflamatorias, proteasas y/o componentes de la matriz extracelular, sustancias que, al actuar sobre las células vecinas, pueden inducir transformación tumoral o por el contrario, inhibirla. Se infiere pues, que en la senescencia, las células no sólo detienen su crecimiento, sino también experimentan cambios en la expresión de ciertos genes. Además, se tornan resistentes a la apoptosis (Krtolica y Campisi 2002, Ben-Porath y Weinberg 2005) y, si se considera que su aumento da lugar a la formación de acúmulos, logran alterar la homeostasis del tejido e influir en su envejecimiento y en su posible transformación maligna, en los individuos de mayor edad (Shay y Wright 2005). Esto explica la aparente paradoja de células senescentes que, no obstante haber adquirido resistencia a la apoptosis, una vez acumuladas pueden contribuir, no sólo al proceso de envejecimiento, sino también a la aparición de enfermedades asociadas, como la enfermedad coronaria, Alzheimer, disfunción endotelial y cáncer, por ejemplo. Debido a que en el estado de envejecimiento, la senescencia promueve la declinación de la función celular -lo que incluye restricción en la capacidad proliferativa- se ha postulado que ejerce un efecto protector contra el cáncer en edades tempranas, mientras que, en las avanzadas promueve el fenotipo típico del envejecimiento (Campisi 2005).

### **3.5. Telómeros y telomerasa**

Los cromosomas de los organismos superiores están formados por moléculas lineales de ADN asociadas con proteínas. Sus extremos o telómeros están constituidos por repeticiones en tándem de la secuencia de nucleótidos TTAGGG,

con una longitud promedio de 10-15 kb en los seres humanos (Blasco 2005). Durante cada división celular y debido a la misma naturaleza del proceso de replicación, el ADN telomérico no es replicado por completo, lo que hace que el extremo 3' de la hebra parental de ADN rica en guanina (cola G) tenga siempre unos 150-200 nucleótidos más de longitud que el extremo 5' de la hebra hija. Los extremos teloméricos se caracterizan por presentar un alto riesgo de sufrir degradación, fusiones extremo-extremo y translocaciones. Para contrarrestar este problema, la cola G se enrolla y genera estructuras en forma de asas o casquetes muy estables. Así, el asa denominada T-loop se origina cuando la cola G se pliega sobre sí misma e hibrida con la región de doble cadena del telómero. La estabilidad de la nueva estructura formada depende de la interacción con un complejo de proteínas de unión específicas de los telómeros, denominado *shelterin* o telosoma. Este núcleo proteico está constituido por los siguientes componentes: las proteínas de unión a la doble cadena telomérica TRF1 y TRF2 (*del inglés TTAGGG Repetition Factor 1 and 2*), la proteína de unión a las repeticiones TTAGGG de una sola cadena Pot1 (*del inglés Protection of telomeres 1*) y las proteínas adaptadoras RAP, TIN2 y TPP1 (*del inglés Ras-proximate-1, TRF1-interacting nuclear factor 2 y tripeptidyl peptidase I, respectivamente*) (de Lange 2005, Liu *et al* 2004a). Como consecuencia de la formación de la T-loop aparece una segunda asa o D-loop, que se origina debido al desplazamiento de una de las cadenas teloméricas localizadas a lo largo de la región donde ocurrió la hibridación de la cola G (Griffith *et al* 1999, Wai 2004). Se ha demostrado que el telosoma regula la longitud de los telómeros y participa en su remodelación, en especial cuando se trata de evitar que sus extremos puedan ser reconocidos como sitios de ruptura de la doble cadena de ADN (de Lange 2005). Al respecto, se ha demostrado que, tanto TRF1 como Pot1 actúan como reguladores negativos de la longitud los telómeros, mientras que TRF1 juega un importante papel en la protección de dichas estructuras (Multani y Chang 2007, Kim *et al* 2009).

En razón del problema de la ausencia de replicación terminal, a medida que las células se dividen y el tiempo transcurre, los telómeros se acortan en forma gradual. No obstante, en ciertas poblaciones celulares con alto potencial replicativo, tanto normales (como células germinativas, oogonias y espermatogonias) como transformadas (cancerosas y líneas celulares inmortalizadas), se expresa hTERT,

enzima con actividad transcriptasa reversa, que actúa mediante la adición de nuevas secuencias teloméricas. La pérdida de ADN telomérico durante la replicación del ADN contribuye a la aparición de un fenotipo celular senescente. Además, el acortamiento telomérico no sólo está relacionado con el envejecimiento, sino constituye un factor de riesgo de cáncer ovárico de origen epitelial, en conjunto con otros factores como herencia, exposición a contaminantes ambientales y a factores endocrinos como gonadotropinas y hormonas esteroideas, terapias de sustitución hormonal, tratamientos con drogas superovulatorias, estratificación de ESO y un número elevado de ovulaciones (relacionado con la edad), conducente a una proliferación celular aumentada (Choi *et al* 2002, Yang *et al* 2004).

Cuando se considera el problema de la replicación terminal incompleta del extremo 3' saliente del ADN telomérico o cola G que, en algún momento, puede facilitar la pérdida de secuencias localizadas en las regiones subteloméricas y aumentar la probabilidad de muerte celular, se comprende el papel de hTERT en el mantenimiento de la integridad telomérica, papel que conduce a la elongación de los telómeros acortados mediante la adición de nuevos pares de bases, bajo condiciones de proliferación continua (Cao *et al* 2002).

Aunque en el primer trimestre de la vida prenatal todos los tejidos exhiben actividad hTERT, en el tejido somático postnatal normal su expresión está reprimida, con excepción de las células que tienen una elevada capacidad proliferativa, como las células germinativas primordiales masculinas, las células progenitoras de ciertos tejidos como los epiteliales, los linfocitos activados, ciertas células musculares lisas y los fibroblastos (Calcagnile y Gisselsson 2007, Forsyth *et al* 2002, Greider 1998). hTERT se reactiva durante el desarrollo neoplásico, lo que hace que las células tumorales adquieran una capacidad de proliferación incontrolada (Mu y Wei 2002). Existe evidencia de que dos eventos íntimamente asociados, como la pérdida de longitud telomérica y el inicio de la senescencia, están relacionados con la derrepresión de genes localizados en las regiones subteloméricas. No es casual que estos genes estén involucrados en la regulación de la proliferación celular, de modo que su activación - cuando se acortan los telómeros y se inicia la senescencia - no sólo protege a la célula de la inestabilidad genómica generada, sino también al individuo de las posibles consecuencias letales debidas a la proliferación de células defectuosas (Patil *et al* 2005, Lou y Chen 2006). Así, la actividad de genes

relacionados con los puntos de control del ciclo celular, como p53, atm/atr, chk1/chk2, p21, rb y p16, es crucial para la regulación, tanto del inicio como del mantenimiento de la senescencia (Shay y Wright 2005). Sin embargo, como resultado de la reducción telomérica previa al estado senescente, en estos genes codificantes de proteínas que detectan anomalías cromosómicas o regulan el ciclo celular, pueden ocurrir también mutaciones, lo que hace que las células implicadas eludan la senescencia y por tanto el estado de mortalidad asociado, para adquirir una creciente capacidad proliferativa. Estas células "fugitivas" pueden exhibir pérdidas y/o asociaciones teloméricas e inestabilidad cromosómica. Cuando logran escapar de aquel primer estado de mortalidad, llegan a una segunda etapa llamada crisis, en la que la gran mayoría de estas células muere. Sin embargo, algunas de ellas, aunque presentan graves defectos cromosómicos, pueden sobrevivir y multiplicarse en forma indefinida, gracias a que la reactivación de la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa estabiliza la longitud telomérica (Shao *et al* 2003). Esto ha hecho suponer que en las etapas iniciales de la oncogénesis debe existir relación entre la reducción de los telómeros y la actividad telomerasa, sin importar que más adelante, en el proceso de transformación maligna, se produzca elongación que contrarreste la reducción y produzca por tanto estabilización de los telómeros.

### **3.6. TRF2**

La proteína de unión a los telómeros TRF2 constituye un importante factor en la regulación de la longitud telomérica. Al igual que TRF1, presenta un dominio TRFH que interviene en homodimerización y uno de tipo myb que le permite acoplarse al ADN de doble cadena. TRF2 realiza diversas funciones además de la regulación de la longitud telomérica, a saber: en conjunto con TRF1, RAP, TIN2 y TPP1 conforma el telosoma y participa en el control de la replicación, reparación y recombinación del ADN, así como en el control del ciclo celular (de Lange 2005, Verdun y Karlseder 2007, Kim *et al* 2009). Debido a que modula diversas actividades enzimáticas y conformaciones estructurales del ADN, reguladoras de la homeostasis de los telómeros, previene la aparición de aberraciones cromosómicas en sus extremos. En dichas tareas actúa conjuntamente con las demás proteínas asociadas al

telosoma. En adición, TRF2 interactúa con proteínas que controlan la formación de la cola G, como la nucleasa XPF1-ERCC1, el complejo MRE11-RAD50-NBS1, las helicasas RecQ WRN y BLM y la 5' exonucleasa Apollo (Gilson y Géli 2007). Cuando estas proteínas están mutadas, se presentan entidades caracterizadas por inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Werner o el de Bloom, en los que existen mutaciones en WRN y BLM respectivamente (Muñoz *et al* 2006). TRF2 participa en la apertura y cierre de los T-loops, mediante la acción de chaperonas y enzimas reclutadas, en conjunto con TRF1. Es además responsable de la formación de otras estructuras teloméricas complejas las que, al igual que los T-loops, dificultan la replicación, por ejemplo los D-loops, las triples hélices, uniones de tipo Holliday o los cúadruplex G. Estas conformaciones especiales de ADN telomérico se desenrollan gracias a la acción de WRN y BLM, reclutadas a su vez por TRF2. Así, TRF2 controla tanto la formación como el desenrollamiento de dichas estructuras, debido a que posee la capacidad de formar diversos subcomplejos que regulan la actividad helicasa a lo largo del ciclo celular (Gilson y Géli 2007).

En estudios previos, se ha demostrado que tanto la inhibición como la sobreexpresión de TRF2 provocan acortamiento del extremo saliente 3' del telómero, aunque sólo la inhibición es capaz de inducir senescencia celular (Ben-Porath y Weinberg 2005, Richter *et al* 2007). Debido a que TRF2 puede interactuar con proteínas teloméricas que presentan mutaciones - en caso de enfermedades relacionadas con envejecimiento prematuro, cáncer y acortamiento telomérico - se ha propuesto que juega un importante papel en la génesis de la enfermedad humana. En tumores epidérmicos, gástricos, hepáticos y pulmonares, TRF2 está sobreexpresada, en simultaneidad con acortamiento de los telómeros y con inducción de envejecimiento prematuro (Blasco 2005). Estos hechos han llevado a proponer que la proteína TRF2 cumple una función en la integridad de la cola G o casquete telomérico, que protege contra la tumorigénesis y el envejecimiento prematuro (Muñoz *et al* 2006). Sin embargo, no se sabe si la sobreexpresión de TRF2 precede a la transformación tumoral o es consecuencia de ella, ni tampoco si existe una relación precisa entre su expresión con el grado de acortamiento telomérico, con la expresión de telomerasa y con la senescencia, en los estados de normalidad, premalignidad y malignidad del tejido, en este caso, el epitelio superficial del ovario.

### **3.7. Epitelio superficial del ovario (ESO)**

#### **3.7.1. Origen embrionario y diferenciación**

El epitelio superficial del ovario se forma a partir del epitelio de origen mesodérmico que recubre a la futura gónada. Allí prolifera, se diferencia y, en conjunto con el mesénquima subyacente, da origen al blastema ovárico hacia la séptima semana de desarrollo (Satoh 1991). Entre la décima semana y el quinto mes de la vida prenatal el tejido varía, desde un epitelio simple plano o cúbico a uno estratificado, estado en el que se mantiene hasta el momento del nacimiento, cuando es reemplazado por un epitelio simple (Satoh 1991, Auersperg *et al* 2001). Este proceso parece depender de estímulos intragonadales hormonales de tipo esteroide, pues ocurre en forma simultánea con la diferenciación esteroidea de las células del estroma ovárico (Auersperg *et al* 2001).

Las células que conforman el epitelio superficial del ovario poseen características tanto epiteliales como mesenquimáticas. Se ha demostrado que, bajos ciertos estímulos, se pueden diferenciar hacia un fenotipo estromal o bien, hacia un fenotipo epitelial aberrante. Por ejemplo, cuando *in vivo* se produce la ruptura epitelial durante la ovulación o un explante en un cultivo, adoptan un fenotipo estromal o fibroblástico. En contraste, bajo condiciones de metaplasia, formación de tumores benignos o progresión neoplásica, las células expresan el fenotipo propio del epitelio de los derivados del conducto de Müller. Esto demuestra que la diferenciación de ESO no está tan determinada como en otros epitelios de origen celómico y que, por tanto, tiene mayor proximidad con su precursor pluripotencial mesodérmico, lo que eventualmente le permitiría diferenciarse bajo ciertas condiciones patológicas (Auersperg *et al* 1999). Este hecho constituye evidencia de que ESO y el resto del mesotelio extraovárico difieren en algunas características, aunque compartan idéntico origen embrionario y estén expuestos al mismo medio ambiente pélvico (Auersperg *et al* 2001). Así, en ESO normal no se expresan ciertos marcadores de diferenciación epitelial como CA125 y E-cadherina, que sí aparecen en el peritoneo pélvico. CA125 es una glicoproteína que, bajo condiciones normales, se encuentra en la superficie celular de todas las serosas y de los epitelios del tracto genital femenino, con excepción de ESO normal, donde no se expresa o bien, se pierde muy temprano en el desarrollo (Jacobs y Bast 1989, Bast *et al* 1998, Lu *et al*

2004, Rapkiewicz *et al* 2004). Si se tiene en cuenta que CA125 no sólo se expresa en las células cancerosas de ESO, sino también en otras neoplasias de origen mülleriano, así como en trastornos benignos como endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica e incluso en el embarazo y la menstruación, es discutible su utilidad diagnóstica como marcador para la detección temprana del carcinoma derivado de ESO (Bast 2004).

### **3.7.2. Ultraestructura**

Las células del epitelio superficial del ovario presentan forma plana o cúbica y se disponen en un solo estrato que descansa sobre una lámina basal. Esta, a su vez, separa al epitelio de una gruesa capa de tejido conectivo denso colagenoso, llamada la túnica albugínea (Auersperg *et al* 2001). En forma paralela con el envejecimiento, el ovario tiende a adoptar un contorno irregular, lo que hace que en la corteza del órgano aparezcan invaginaciones y quistes de inclusión de origen epitelial, eventos acompañados por la sustitución del epitelio cúbico por uno cilíndrico (Okamura *et al* 2003). Esto ha llevado a postular que dicha sustitución está asociada con la aparición de metaplasias y neoplasias, si se tiene en cuenta que se presenta en mujeres con riesgo hereditario de cáncer ovárico y que, además, las células epiteliales involucradas expresan un fenotipo mülleriano, con los marcadores que también se expresan en neoplasias ováricas, como CA125 y E-cadherina (Zhang *et al* 1998).

*In situ*, ESO difiere del mesotelio extraovárico no sólo por la ausencia de CA125 sino también por la presencia de cilios y la expresión diferencial de mucina, deshidrogenasa 17B-hidroxiesteroide y de algunos marcadores antigénicos, además de sus características epiteliales clásicas. De modo constitutivo, ESO expresa queratina y vimentina (filamento intermedio mesenquimático), a semejanza de los explantes en cultivo o de lo que ocurre bajo ciertas condiciones patológicas, y a diferencia de las células epiteliales corrientes que sólo las expresan cuando hay reparación tisular. En cultivo, ESO secreta colágenos tipo I y III, lo que no ocurre *in situ* (Auersperg *et al* 2001).

### **3.7.3. Propiedades fisiológicas**

Las células epiteliales superficiales del ovario presentan ciertas características, como la de transportar materiales desde y hacia la cavidad peritoneal, función esencial durante la vida prenatal. Participan también en la ruptura del ovario durante la ovulación, evento que puede ser explicado mediante la acción de proteasas, como se ha observado *in vitro*, así como de apoptosis en el sitio vecino a la ruptura, como consecuencia de la acción de mediadores inflamatorios y especies reactivas de oxígeno y de la participación del antígeno FAS (Murdoch y Martinchick 2004, Sapi *et al* 2002). Además, se ha demostrado una intensa actividad proliferativa por parte de las células próximas al sitio de la ruptura provocada por la ovulación. La restauración del epitelio incluye la secreción de los componentes de la matriz extracelular de la lámina basal y del tejido conectivo vecino, así como la recuperación de la capacidad contráctil de las células epiteliales, debida a la presencia de filamentos de actina de músculo liso en su citoplasma. La diferenciación epitelial hacia un fenotipo estromal o fibroblástico ha sido demostrada *in vitro*, con la utilización de inductores como el factor epidérmico de crecimiento (EGF), ascorbato, sustratos de colágeno y otras matrices tridimensionales. *In vivo*, el fenotipo fibroblástico se ha observado en estado reparación postovulatoria, posiblemente debido a otros factores, como el factor transformante de crecimiento TGF- $\beta$ , conocido por su función reguladora autocrina del crecimiento de ESO (Auersperg *et al* 1999, Auersperg *et al* 2001). La capacidad de conversión epitelio-mesenquimática le confiere a ESO claras ventajas durante la reparación postovulatoria del epitelio, pues no sólo aumenta su motilidad sino también su actividad proliferativa y de modificación de la matriz extracelular. Dicha conversión puede representar también un mecanismo homeostático que facilitaría la incorporación de las células de ESO dentro del ovario 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 interior del órgano. Al respecto vale la pena anotar que la retención del fenotipo y de los patrones de crecimiento epitelial predominan en los cultivos provenientes de mujeres con un fuerte historial de cáncer de ovario o de mama, en contraste con lo que ocurre con los cultivos de células de mujeres sin dichos antecedentes, en los que las células epiteliales se tornan mesenquimáticas después de unos pocos pasajes (Wong y Auersperg 2003). El incremento observado en la actividad proliferativa explicaría por qué las células

epiteliales del ovario en cultivo no adoptan un fenotipo estacionario sino regenerativo.

#### **3.7.4. Etiología de la transformación tumoral de ESO**

Se han postulado dos hipótesis para explicar la transformación maligna de las células epiteliales ováricas: la primera, llamada "*teoría de la ovulación incesante*" (Fathalla 1971), considera que la repetida degradación y reparación del epitelio durante cada ovulación (aproximadamente 400 veces en la vida de la mujer) son factores que favorecen la mutagénesis y la malignidad de ESO. Es entonces factible considerar a la ovulación como un evento inflamatorio agudo, provocado por la proteólisis de la superficie ovárica, seguida por un proceso de reparación tisular susceptible de sufrir desregulación (Rae y Hillier 2005). En el momento de la ovulación, el folículo dominante establece contacto con la superficie gonadal para formar el estigma, es decir el sitio donde la ruptura del epitelio permite la expulsión del oocito secundario. El propio epitelio ejerce un efecto inductor sobre la ruptura, pues participa en la proteólisis de la lámina basal y de la túnica albugínea que lo sustentan (Auersperg *et al* 1999). Por su parte, los leucocitos que han infiltrado al folículo generan la gran mayoría de radicales libres liberados durante la ovulación (Behrman *et al* 2001), los que conjuntamente con el flujo isquemia-reperusión, acompañan a la remodelación tisular periovulatoria (Murdoch 2005). Las células epiteliales más próximas, en razón de su elevado grado de exposición a la acción de los mediadores inflamatorios y de las especies reactivas de oxígeno, sufren apoptosis. Cuanto más alejadas se encuentren las células epiteliales del radio de acción de las sustancias oxidantes, la probabilidad de que mueran es menor, lo que no significa que puedan escapar de la influencia de concentraciones subletales de dichas sustancias (Murdoch y Martinchick 2004). Como resultado de dicha influencia, el epitelio puede ser vulnerable al daño del ADN no reparado, situación explicable si se tiene en cuenta que no ha estado sometido a una elevada presión evolutiva, lo que le permitiría responder en forma exitosa a ovulaciones repetidas. Las células que no sufrieron apoptosis pero estuvieron expuestas a sustancias oxidantes son las que, con posterioridad a la ovulación, deben proliferar y restaurar el epitelio ovárico, en por lo menos dos terceras partes. Se ha demostrado que la reparación del tercio restante está relacionada con el crecimiento folicular previo a la

ovulación. En caso de que haya ocurrido daño oxidativo del ADN, p53 puede detener el ciclo durante la fase lútea del ciclo o bien, según la extensión del daño, reparar la lesión mediante el mecanismo de excisión de bases mediado por la polimerasa B (Murdoch *et al* 2001). En presencia de mutaciones de supresores tumorales como p53, o de defectos en las vías de reparación del ADN, se podría suponer que las células epiteliales con daño oxidativo del ADN no reparado que participan en el proceso de regeneración son las responsables de la carcinogénesis del epitelio superficial del ovario (Aunoble *et al* 2000).

La segunda hipótesis, llamada "estimulación hormonal", propone a las gonadotropinas como el principal factor que favorece la transformación maligna de ESO, con base en la demostración de la presencia de receptores específicos en las células epiteliales (Ji *et al* 2004, Kuroda *et al* 2001, Choi *et al* 2004). *In vivo*, la estimulación hormonal produce proliferación de las células epiteliales, mientras que *in vitro* los reportes son variables: algunos muestran que aumentan la actividad mitogénica (Murdoch y Van Kirk 2002, Stewart *et al* 2004, Choi *et al* 2007) y otros que no la afectan en absoluto (Pon y Wong 2006). Tal diferencia podría explicarse si se tiene en cuenta la posible regulación ejercida por factores promotores de crecimiento liberados localmente. Así, se ha establecido que el tratamiento con gonadotropinas (FSH, LH, hCG) induce apoptosis en ESO normal, debido a que reduce la cantidad de N-cadherina y activa la señalización  $\beta$ -catenina/TCF. Esto sugiere que dicha vía, una vez estimulada por las gonadotropinas, contribuye a la regulación del comportamiento proliferativo de las células normales de ESO (Pon y Wong 2006).

La FSH ejerce un efecto dual, tanto en favor como en contra de la apoptosis de las células de ESO. Así, en respuesta a los picos preovulatorios de FSH y LH, las adhesiones intercelulares mediadas por N-cadherina sufren ruptura, mientras que las células epiteliales circundantes mueren por apoptosis. Sin embargo, en otras fases del ciclo como la postovulatoria, con niveles menores de FSH, ocurre proliferación, con el fin de facilitar la reparación tisular. Si en las células epiteliales sobrevivientes se acumularon mutaciones, se formará entonces un tumor (Pon y Wong 2006). En este orden de ideas, es posible inferir que a mayor número de eventos ovulatorios o con la caída perimenopáusica de la FSH, aumenta el riesgo de cáncer ovárico (Auersperg *et al* 2001). Aunque las dos hipótesis, ovulación

incesante y estimulación hormonal, han sido consideradas en forma independiente, existe evidencia de que no son mutuamente excluyentes (Gaytan *et al* 2005).

### **3.7.5. Técnicas de estudio**

Tanto la biología del epitelio superficial del ovario, como la etiología y los eventos moleculares tempranos asociados con la progresión del carcinoma derivado de este tejido están pobremente comprendidos, en gran parte debido a la carencia de modelos animales apropiados (Auersperg *et al* 2001, Wright *et al* 2002, Daikoku *et al* 2005) y a las dificultades para cultivar las células ováricas humanas. Los sistemas *in vitro* constituyen una herramienta útil para su estudio, pues son un acercamiento a lo que ocurre *in vivo*, si bien presentan limitaciones, como el discreto potencial de crecimiento y la dificultad para separar -por medios físicos o químicos- las células epiteliales de los otros tipos de células presentes en el estroma ovárico. Además, la disponibilidad de métodos de cultivo específicos para el epitelio superficial del ovario data de fecha relativamente reciente. Estos hechos, sumados a la rápida senescencia de las células cultivadas, han dificultado la identificación de los eventos moleculares propios de la transformación maligna y por tanto también la de los biomarcadores que permitirían su diagnóstico temprano.

Con el propósito de estudiar la transformación maligna de ESO en el laboratorio, se han desarrollado diversos métodos para obtener cultivos celulares primarios de ESO normal y tumoral, en especies como aves de corral (Giles *et al* 2006), monos (Wright *et al* 2002), bovinos (Parrot *et al* 2000), roedores (Kido y Shibuya 1998, Roby *et al* 2000) y seres humanos (Dunfield *et al* 2002, Liu *et al* 2004b). También se han establecido modelos *in vitro* con el objetivo de identificar biomarcadores asociados con cambios preneoplásicos y neoplásicos (Gregoire *et al* 1998, Vanderhyden *et al* 2003, Li *et al* 2003, Choi *et al* 2001, Choi *et al* 2003, Choi *et al* 2004). Sin embargo, los modelos no humanos presentan dificultades que han limitado su utilización. Por ejemplo, en roedores y cerdos, ESO normal expresa E-cadherina (MacCalman *et al* 1994, Ryan *et al* 1996), a diferencia de lo que ocurre con ESO humano normal, donde no se expresa (Wong *et al* 1999). Igualmente, los cultivos de ESO humano dependen de elevadas concentraciones de calcio en el medio (McNeil *et al* 1998), lo que no ocurre con los cultivos de rata (Auersperg *et al* 2001). Otras limitaciones se

relacionan con la tendencia de ESO de rata a sufrir transformación espontánea en líneas celulares inmortalizadas, propiedad que contrasta con los cultivos humanos, donde esto no ocurre (Liu *et al* 2004b). En respuesta a la estimulación hormonal, las células cultivadas de ESO de conejo presentan cambios morfológicos muy diferentes a los del ser humano (Auersperg *et al* 2001). En adición, es difícil identificar carcinomas ováricos derivados de ESO en dichas especies, por la sencilla razón de que son de muy escasa o nula incidencia (Vanderhyden *et al* 2003, MacLachlan 1987).

Mediante técnicas complejas se ha tratado de aislar y cultivar las células de ESO humano normal. Sin embargo, la capacidad replicativa promedio observada es limitada, debido a que la senescencia llega después de unos pocos doblajes poblacionales (Dunfield *et al* 2002). Por este motivo se ha intentado extender su promedio de vida e inmortalizarlas por medio de transfección con diversos tipos de agentes, como los genes virales del antígeno T del SV40, o las proteínas E6/E7 del HPV-16, lo que ha causado menoscabo en sus características primarias, como la regulación del ciclo celular, además de inducir pérdida del fenotipo epitelial y transformación maligna (Gregoire *et al* 1998, Maines-Bandiera *et al* 1992). También existen reportes acerca de la transfección con el gen de la telomerasa, lo que alarga su esperanza de vida, sin expresión de fenotipo neoplásico (Alvero *et al* 2004).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Las condiciones antes descritas están asociadas con una gran susceptibilidad de ESO a la transformación maligna. Cerca del 95% de los carcinomas ováricos humanos se derivan del epitelio superficial del ovario y son los responsables de aproximadamente la mitad de las muertes relacionadas con la presencia de tumores del tracto genital femenino (Wong y Auersperg 2003, Herbst 1994, Surveillance, epidemiology and end results: Ovary cancer 2007, Cancer Facts & Figures 2008). Debido a que la sobrevivencia máxima postdiagnóstico es cinco años y a que la incidencia y la frecuencia relativa de mortalidad por cáncer ovárico, según el RPPC (Registro Poblacional de Cáncer de Cali), muestran en los últimos años un ascenso gradual y permanente, semejante a lo que ocurre en Norteamérica y en la mayoría de países europeos, se justifica la necesidad de efectuar más investigaciones sobre

los eventos moleculares y celulares relacionados con la transformación tumoral. Dicho ascenso se debe, entre otras cosas, a que las técnicas de detección temprana de otros tipos de cáncer, como el cervical y el endometrial, otrora fatales, han permitido una importante reducción en la tasa de mortalidad asociada, debido a su mayor cobertura y sensibilidad. Por otra parte, la detección del carcinoma ovárico derivado de ESO ocurre generalmente en su etapa tardía, cuando ya la enfermedad está avanzada y se ha diseminado, lo que hace difícil su manejo e incluso lleva a la muerte en un 95% de los casos, en un lapso inferior a cinco años (Wong y Auersperg 2003, Herbst 1994, Surveillance, epidemiology and end results: Ovary cancer 2007, Cancer Facts & Figures 2008, Gregoire *et al* 2001). Si se tiene en cuenta que la senescencia celular actúa como un mecanismo promotor de la transformación maligna en edades avanzadas - cuando también aumenta la probabilidad de aparición del carcinoma derivado de ESO - es evidente la importancia de investigar sobre los marcadores asociados al estado senescente.

En este orden de ideas, el estudio de marcadores de senescencia del epitelio superficial del ovario, como la actividad de la enzima SA- $\beta$ -gal, la expresión de hTERT y de TRF2, así como la presencia de anormalidades cromosómicas, debe tener repercusión en el campo clínico, en situaciones específicas tales como:

- Identificación de cambios preneoplásicos en el ovario normal contralateral al ovario diagnosticado con cáncer.
- Evaluación de cambios significativos en dichos parámetros en el epitelio superficial ovárico adyacente al carcinoma de este tejido.
- Comparación de los parámetros en cuestión en los ovarios de gemelas monocigóticas, una de las cuales haya tenido cáncer ovárico, así como en los ovarios removidos profilácticamente en mujeres con riesgo de cáncer y los de la población general (Wong y Auersperg 2003)
- Análisis de dichos parámetros en muestras de tejido ovárico tomadas mediante aspiración dirigida por ultrasonografía o laparoscopia en mujeres que desean preservar su fertilidad o someterse a procedimientos de fertilización *in vitro* (Greenebaum *et al* 1994).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **5.1. Donantes**

En la primera parte del presente estudio se efectuó recolección, cultivo y criopreservación de un grupo de 48 muestras de epitelio superficial ovárico provenientes de donantes vivas sanas y de donantes cadavéricas con edades entre 13 y 63 años. En la segunda parte se recolectó y cultivó un grupo de 28 muestras obtenidas a partir sólo de donantes vivas, cuyas edades estaban entre 13 y 57 años. Las muestras del segundo grupo no fueron sometidas a criopreservación.

Los dos grupos de donantes conformaron una cohorte étnicamente homogénea de mujeres colombianas mestizas. Las donantes vivas fueron pacientes que se sometieron a procedimientos quirúrgicos en los servicios de gineco-obstetricia de cinco instituciones hospitalarias, tanto públicas como privadas, de Bogotá DC, durante los años 2007-2009. Las donantes vivas fueron sometidas a ooforectomía parcial o total debida a condiciones benignas, como quistes ováricos, torsión de anexos, embarazo ectópico con salpingooforectomía, salpingooforectomía por hiperplasia endometrial o masas anexiales benignas.

En acuerdo con los principios básicos establecidos en la Declaración de Helsinki, las donantes vivas 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 DC, previa aceptación de los deudos responsables.

## **5.2. Criterios de inclusión y exclusión**

### ***5.2.1. Inclusión***

Mujeres de cualquier edad, fallecidas por trauma, con muerte cerebral o vivas sanas, sometidas a ooforectomía parcial o total debida a condiciones benignas, sin antecedentes personales de cáncer.

### ***5.2.2. Exclusión***

Antecedentes personales de cáncer.

## **5.3. Cultivos primarios**

El tamaño de las muestras de tejido ovárico recolectado varió entre 1 y 2 cm<sup>3</sup> e incluyó el epitelio superficial mas una porción muy pequeña del estroma subyacente que contiene fibroblastos y fibras colágenas y elásticas. La composición de las muestras hizo necesario separar las dos capas (epitelio y estroma), mediante la acción enzimática de tipo colagenasa de la dispasa (Dispase II, Roche Applied Sciences, Indianapolis IN, USA) aplicada sobre la muestra, en un volumen de 3 ml a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas 12 horas, el epitelio y el estroma fueron separados en forma muy suave y el epitelio fue seccionado en pequeños fragmentos con la ayuda de pinzas y tijeras. En el inicio de la primera parte del estudio, cada muestra fue sembrada por triplicado en dos medios de cultivo diferentes, uno de ellos con dos diferentes concentraciones de suero fetal bovino (SFB, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Los medios utilizados fueron la mezcla 1:1 de MCDB105 (Sigma, St. Louis, MO, USA)/M199 (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil) con SFB al 10%, así como MegaCell MEM/F12 Ham (Sigma St. Louis, MO, USA), con SFB en concentraciones de 3% y 10%. A todos los medios se añadió 0,05% de penicilina-estreptomina de 10000 U (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil). MCDB105 es un medio de cultivo enriquecido con L-glutamina, aminoácidos esenciales y no esenciales, ácidos grasos, vitaminas, elementos traza y HEPES (MCDB Media). Su formulación está indicada para el crecimiento de tipos celulares específicos que requieren hormonas, factores de crecimiento y elementos traza. M199 por su parte, difiere de MCDB105 en el tipo de aminoácidos esenciales y de elementos traza que contiene. Este medio fue especialmente diseñado para el crecimiento de explantes de tejido (Medium 199 Modified). MegaCell MEM/F12 Ham, suplementado con L-glutamina y 3% de SFB, es un medio basal multipropósito cuya composición acorde con las formulaciones de los medios clásicos, ha mostrado su efectividad para el crecimiento de líneas celulares adherentes y en suspensión, bajo condiciones de suplementación con SFB reducida. Contiene factores de crecimiento, aminoácidos esenciales y no esenciales, así como insulina y elementos traza (MegaCell Media).

En la primera parte del estudio, cada muestra fue sembrada por triplicado con dos medios de cultivo diferentes, MCDB105/M199 con 10% de SFB y MegaCell MEM/F12-Ham con SFB al 3% y al 10%, todos suplementados con antibiótico. En la

segunda parte del estudio se utilizó en forma exclusiva la mezcla MCDB105/M199 suplementada.

Cuando las células cultivadas alcanzaron un 80-85% de confluencia, fueron disgregadas con la mezcla tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (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 los frascos de cultivo, lo que permitió que las células remanentes adheridas pudieran proliferar, y después se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, hasta que nuevamente las células alcanzaron un estado subconfluente. De cada muestra de tejido ovárico se obtuvieron dos cultivos primarios diferentes: uno de células epiteliales y otro de fibroblastos, que fueron subcultivados por lo menos durante cuatro pases. Las excepciones fueron las muestras de las pacientes 6, 7 y 22, cuyas células no crecieron en cultivo y las de la paciente 12, quien revocó su consentimiento informado.

Una vez las células alcanzaron 80-85% de confluencia, fueron disgregadas mediante tratamiento con la mezcla tripsina-EDTA al 0,25%. A continuación se inactivó la tripsina con medio fresco suplementado con 10% de SFB y se centrifugó a 1500 rpm durante 6 minutos. El botón o pellet resultante fue resuspendido en 1 ml de la mezcla MCDB105/M199 suplementada. Después de caracterizar las células y 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, con el fin de utilizarlo en los análisis posteriores de actividad SA-β-gal. A partir de la fracción de células remanente en cada frasco continuó el crecimiento en el siguiente pase.

En la segunda parte del estudio, el proceso de siembra y cultivo de las muestras fue semejante al descrito para la primera parte, con la salvedad de que sólo se cultivaron células epiteliales, sólo se utilizó mezcla de medios MCDB105/M199 suplementada y no se efectuó criopreservación. Los cultivos de la segunda parte fueron utilizados para comparar los resultados de la actividad de SA-β-gal con los obtenidos en las células criopreservadas de la primera parte y para cuantificar la expresión de hTERT y de TRF2.

Para los conteos celulares y la determinación de la población celular normalizada se observaron los mismos procedimientos descritos en la primera parte del estudio.

### **5.3.1. Caracterización de las células epiteliales ováricas**

La caracterización de las células epiteliales cultivadas tuvo en cuenta, en primer lugar, su morfología adoquinada, diferente a la de otras posibles células contaminantes de los cultivos, como fibroblastos o leucocitos. Es importante anotar que si se produce contaminación con fibroblastos, lo que puede ser detectado con facilidad desde el primer pase debido a su forma ahusada, los cultivos deben descartarse de inmediato, pues en tal caso, los fibroblastos rápidamente sobrepasan a las células epiteliales e impiden su proliferación. Esto significa que, en nuestro caso, cultivos primarios en segundo o tercer pase, por ejemplo, o están constituidos sólo por células epiteliales o lo están sólo por fibroblastos.

Como complemento, se determinó - mediante el método inmunocitoquímico directo - la expresión de la citoqueratina 18, proteína fibrilar del citoesqueleto presente en el núcleo, nucléolo y citoplasma de células adultas de los epitelios simples. La inmunocitoquímica es una técnica rutinaria de laboratorio que utiliza anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes o partículas de oro contra péptidos o proteínas celulares con propiedades antigénicas. Esto hace posible que cuando se utilizan anticuerpos marcados con un fluoróforo como el isotiocianato fluorescente (FITC), una vez se produce la formación del complejo antígeno-anticuerpo, se emita una señal fluorescente que puede ser visualizada y que demuestra, tanto la presencia como la localización subcelular del antígeno específico, en nuestro caso la citoqueratina 18.

Se han descrito cerca de 20 citoqueratinas diferentes en las células epiteliales. Su naturaleza química corresponde a polipéptidos cuyas masas moleculares están entre 40 y 68 kDa y se clasifican en ácidos o tipo I y neutros-básicos (tipo II). Aparecen en forma de filamentos intermedios los que, a su vez, se asocian en tonofibrillas, para constituir el citoesqueleto de las células epiteliales. De acuerdo con su perfil de expresión, se puede identificar tanto el tipo de epitelio que las incluye, como el grado de diferenciación del tejido. Así debe tenerse en cuenta que la citoqueratina 18 se expresa en epitelios simples como el gastrointestinal, el

urinario o el ovárico, mientras que está ausente en las células no epiteliales y en las de otros tipos de epitelios como los planos (mesotelio del peritoneo) o los estratificados (esofágico y epidérmico).

En este orden de ideas, células epiteliales de los tres primeros pases de cada cultivo - obtenidas en las dos partes del estudio - fueron extendidas en láminas y fijadas con Carnoy y después teñidas con anticitoqueratina 18-FITC (Sigma St. Louis, MO, USA) e incubadas en cámara húmeda por 12 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de tres lavados posthibridación con PBS, las señales de color verde fueron visualizadas por espectroscopia de fluorescencia, usando un filtro triple FITC/Rodamina/DAPI.

Con base en la visualización de la morfología especial de las células epiteliales, así como del carácter excluyente de este tipo de cultivos y de la demostración de reactividad anticitoqueratina-18 durante los tres primeros pases del cultivo, se comprobó que las células cultivadas eran sólo de tipo epitelial y que no existieron otras células contaminantes. Como control negativo del ensayo se aplicó similar procedimiento a fibroblastos del estroma ovárico y a leucocitos, que no expresan citoqueratina 18. Como control positivo se utilizaron células de la línea de cáncer de seno MCF-7.

### **5.3.2. *Conteo celular***

Después de efectuar la tripsinización, centrifugación y posterior resuspensión en medio, se tomó un volumen de 10 ul de la suspensión celular en un eppendorf de 1 ml, y se mezcló con un volumen igual de azul de tripán. Este colorante es captado con mayor intensidad por las células muertas, lo que facilita su identificación y posterior conteo y, por defecto, el de las células vivas que no lo incorporan. El número total de células vivas (que no toman el colorante) se calculó mediante la fórmula:  $2 \times 10^4 \times \text{volumen del medio utilizado en la resuspensión del botón (ml)} \times \text{número promedio de células vivas contabilizadas en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer}$ .

### **5.3.3. *Capacidad replicativa***

Una vez obtenidos los conteos celulares y como un estimativo de la capacidad replicativa se calculó la población celular durante cada pase, como la razón entre el número de células recolectadas después de la tripsinización al final del pase y la duración del mismo. La duración de cada pase fue definida como el tiempo en días que tardaron las células en alcanzar una confluencia de 80-85%. La normalización del número de células recolectadas durante cada subcultivo minimizó posibles sesgos debidos a variaciones en la duración de los pases y permitió establecer tendencias en la capacidad replicativa a lo largo de los cultivos.

#### ***5.3.4. Criopreservación***

En la primera parte del estudio y después de resuspender el botón o pellet obtenido en cada pase con 0,5 ml de la mezcla de medios suplementada, se adicionó lentamente 0,1 ml del agente crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) disuelto en 0,4 ml de mezcla de medios y SFB a cada vial. El período de equilibración (tiempo entre la adición del DMSO y el inicio del enfriamiento) fue 15 minutos a temperatura ambiente. Los viales fueron almacenados primero a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y después en nitrógeno líquido a  $-170^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El número de células sometidas a congelación estuvo en un rango de promedios por pase de 167000-311000 para células epiteliales y de 168000-285000 para fibroblastos.

#### ***5.3.5. Recuperación de las células criopreservadas***

Con antelación a los ensayos de determinación de la actividad SA- $\beta$ -gal y de cuantificación de proteínas de la primera parte del estudio se efectuó nuevo conteo celular. Una vez descongelados los viales a  $37^{\circ}\text{C}$  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 seis 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- $\beta$ -gal y la cuantificación de proteínas.

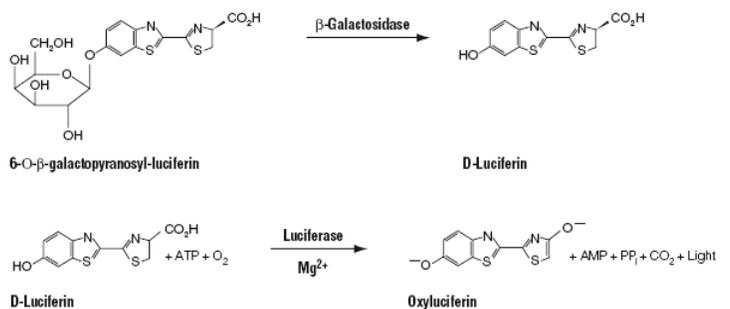
#### **5.4. Inducción de senescencia**

Con la finalidad contar con controles positivos para los ensayos de actividad SA- $\beta$ -gal, se indujo senescencia a fibroblastos del estroma ovárico en la primera parte del

estudio, mientras que en la segunda, se hizo lo propio con células epiteliales ováricas. En ambos casos las células provenían de la misma donante cuyas células estaban siendo examinadas en los ensayos de actividad enzimática. Con este propósito, se sembró un total de 5000 células por pozo de placa de 96 pozos, a las que se les permitió adherirse a la superficie de la placa durante 24 horas. El tratamiento inductor consistió en reemplazar el medio de cultivo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 uM durante dos horas a 37°C, lavar dos veces con PBS y cultivar durante cinco días en medio desprovisto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y suplementado con SFB y antibióticos, antes de efectuar la lectura de luminiscencia.

### 5.5. Actividad de la enzima SA-β-gal

La senescencia celular fue evaluada en las dos partes del estudio mediante la determinación de la actividad endógena de la enzima SA-β-gal a pH 6. Con este fin se utilizó el kit Beta-Glo Assay System (Promega Co, Madison WI, USA), durante cada pase o subcultivo. Este sistema corresponde a un ensayo bioluminiscente homogéneo (Ver Figura 5.1), cuyo fundamento reside en la capacidad catalítica de la β-galactosidasa para clivar el sustrato D-Luciferina-*o*-β-galactopiranósido y liberar así luciferina. A su vez, la luciferasa presente en el reactivo actúa sobre la luciferina, reacción que no sólo genera oxiluciferina sino que además emite una señal luminiscente, cuantificable en unidades de luminiscencia relativa (RLU, del inglés *Relative Light Units*) y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de β-galactosidasa presente en la célula (Hannah *et al* 2003).



**Figura 5.1.-** Resumen de las reacciones acopladas en el Beta-Glo® Assay System. (Tomado de Hannah *et al* 2003)

La actividad SA- $\beta$ -gal ha sido medida en forma tradicional con un sustrato cromogénico artificial como X-gal, método que se caracteriza por la necesidad de contar células teñidas con intensidades variables, en un proceso dispendioso y subjetivo que hace que sus resultados no sean confiables. El método quimioluminiscente utilizado en el presente estudio no sólo consume menos tiempo, sino permite identificar con una elevada sensibilidad y cuantificar la actividad endógena de la enzima a pH 6 en células de mamíferos.

Aunque el kit utilizado contiene un detergente que lisa las células y libera la  $\beta$ -gal, se las trató con buffer de lisis antes de la aplicación del reactivo, en razón de los pobres resultados obtenidos en un ensayo preliminar, probablemente debido a interferencia con componentes de la mezcla de medios utilizada para cultivar las células. Los componentes del buffer de lisis utilizado demostraron ser compatibles con el reactivo: mientras Tritón X100 (Sigma, St. Louis, MI, USA) (*éter polietilénlicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenilo*) es un detergente que permeabiliza las membranas de las células eucariotas y, usado en bajas concentraciones, solubiliza a la enzima (Sigma, Triton X100, Product Information), EDTA actúa como agente quelante de los iones divalentes calcio, manganeso y magnesio. Estos iones no sólo están presentes en las uniones intercelulares, sino además pueden funcionar como cofactores de enzimas presentes en las células. Al no estar asociados en forma de complejos con EDTA, es posible que los iones hayan interferido con el proceso de lisis, lo que explicaría los resultados del ensayo inicial. Por otra parte, Hepes (*ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico*) es un agente amortiguador efectivo para mantener el pH fisiológico en los cultivos cuando, como resultado de la respiración celular, aumenta la concentración de CO<sub>2</sub>.

En cada pase y después de efectuar el conteo celular, se sembró un total de 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos en un volumen de 250  $\mu$ l de la mezcla de medios suplementada. Al cabo de 24 horas se eliminó el medio de cada pozo y se lavó por un minuto con 200  $\mu$ l de PBS. Después de eliminar el PBS, se adicionaron 100  $\mu$ l de buffer de lisis (Triton X100 1%, Hepes 20 mM, EDTA 4 mM pH 7.4) por pozo y se dejó actuar por 20 minutos. De esta suspensión se tomó un volumen de 100  $\mu$ l por pozo y se trasladó a placas de luminiscencia (fondo plano, blanco, opaco y tapa negra) de 96 pozos. A cada pozo se añadieron 100  $\mu$ l de reactivo Beta-Glo, se dejó actuar por 30 minutos y 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  $\beta$ -galactosidasa - así como en células inducidas a senescencia mediante tratamiento con  $H_2O_2$ . Como controles positivos del ensayo se utilizaron fibroblastos inducidos a senescencia en la primera parte del estudio, y células epiteliales senescentes, en la segunda. 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- $\beta$ -gal entre las muestras analizadas.

## **5.6. Cuantificación de proteínas**

En las dos partes del estudio, se efectuó cuantificación de proteínas para cada pase o subcultivo de cada muestra, mediante el método BCA (basado en la reacción de Biuret (Smith *et al* 1985)), con el kit Pierce BCA proteína Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

El fundamento de este método reside en la capacidad que presenta el ácido bicinonínico (BCA) para reaccionar con el ion cuproso  $Cu^{1+}$ , producido a su vez como resultado de la reacción de las proteínas con  $Cu^{2+}$  en medio alcalino. Así, el ácido bicinonínico forma un compuesto de color púrpura intenso con el ion cuproso, cuya absorbancia permite cuantificar la cantidad de proteína presente en la muestra analizada.

Con la finalidad de cuantificar la cantidad de proteína presente en cada pozo, se añadió BCA a una solución de  $CuSO_4$  pentahidratado en proporción 1:50 y de este reactivo se añadieron 200  $\mu$ l a un volumen de 20  $\mu$ l del lisado celular depositado en cada pozo. Dentro de la misma placa se destinaron seis pozos para elaborar la curva estándar de calibración que permite relacionar medidas de absorbancia con concentraciones predeterminadas de la proteína albúmina sérica bovina (BSA). Diluciones seriadas de BSA fueron sometidas a tratamiento idéntico al de las muestras. Como blanco, se usó buffer de lisis y como control negativo del estándar

de calibración un volumen de 20  $\mu$ l de  $H_2O$ . En adición, se cuantificaron las proteínas de los fibroblastos inducidos a senescencia con  $H_2O_2$  que habían sido utilizados como control positivo en los ensayos de actividad  $\beta$  gal. Después de agitación suave por un minuto e incubación por 30 minutos, se efectuó la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

A partir de cada curva estándar de calibración realizada por experimento, se obtuvo una línea de tendencia con la correspondiente ecuación. Mediante esta ecuación fue posible, con base en la absorbancia de cada muestra, calcular la concentración de proteína en cada una de ellas.

## **5.7. Cuantificación de la expresión de hTERT y TRF2**

La expresión de los genes hTERT y TRF2 fue cuantificada en la segunda parte del estudio mediante la técnica “Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real” (qRT-PCR). Para ello se extrajo el ARN de las células epiteliales, así como de fibroblastos ováricos de las mismas donantes, con el objetivo de utilizarlos como control. A continuación se sintetizaron los ADNc correspondientes mediante retrotranscripción y se efectuó la PCR en tiempo real en un equipo MJ Research® Opticon 2™.

### **5.7.1. Extracción del ARN**

El ARN total fue extraído mediante el método guanidina-fenol-cloroformo-isotiocianato TRIzol (Chomczynski y Sacchi 1987).

A cada frasco de cultivo de 25  $cm^2$  se agregó un volumen de 2 ml del reactivo TRIzol (Invitrogen Corporation, Brazil). Después de dejar la mezcla a temperatura ambiente por 15 minutos, se resuspendió y se traspasó a tubos de 1,5 ml, en los que continuó la extracción con la adición de 200  $\mu$ l de cloroformo. Se agitó en forma vigorosa durante 20 segundos y se dejó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm y 4°C, durante 10 minutos, lo que hizo que la mezcla se separara en tres fases o capas:

- *Capa superior o fase acuosa*, que contiene el ARN.
- *Capa o fase intermedia*, de apariencia lechosa, que contiene el ADN.
- *Capa inferior o fase roja*, que contiene el TRIzol y las proteínas

La fase acuosa o capa superior se transfirió a un tubo eppendorf estéril. La precipitación del ARN presente se logró mediante la adición de 500 ul de isopropanol al 100% a 4°C. Se mezcló por inversión y se almacenó a -20 °C durante 24 horas.

Al día siguiente, los tubos fueron sometidos a centrifugación (10000 rpm, 4°C, diez minutos) y el sobrenadante se eliminó por inversión. Al precipitado se le adicionó 1 ml de etanol al 75% frío (4°C) y se mezcló en vórtex. Después de centrifugar nuevamente a 7000 rpm y 4°C por siete minutos, se descartó el sobrenadante por inversión. Sobre una toalla absorbente se retiró el exceso de etanol y se dejó secar a temperatura ambiente hasta que éste se evaporó en forma completa. A continuación, se adicionaron 50 ul de agua DEPC y se resuspendió. Para disolver el precipitado, se llevó a 55°C en baño maría durante diez minutos. El ARN extraído se almacenó en alícuotas de 10 ul a -80°C.

### **5.7.2. Tratamiento con ADNasa**

Para eliminar trazas de ADN por medio de digestión enzimática, la solución que contenía el ARN fue incubada con ADNasa. El procedimiento consistió en preparar un volumen de 10 ul de la siguiente mezcla:

- ARN, cuya concentración varió entre 4,9 y 930,8 ng/ul.
- Buffer de reacción 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, KCl 500 mM)
- 1 unidad/ul de ADNasa I Amplification Grade (Invitrogen Corporation, Brazil)
- Agua DEPC

Después del tratamiento, se aplicó 1 ul de EDTA 2,5 mM y se incubó a 65°C durante 15 minutos.

### **5.7.3. Cuantificación y verificación de la integridad del ARN**

Una vez obtenido el ARN, su concentración, pureza e integridad fueron evaluadas mediante espectrofotometría, en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Rockford IL USA). Para calcular la concentración del ARN en ng/ul, se tomó un volumen de 1 ul y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Con el fin de evaluar la pureza y descartar contaminación con proteínas o con ADN, se obtuvo la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y después se calculó la

razón de las absorbancias a 260 y 280 nm. Como indicadora de pureza, se tuvo en cuenta una razón entre 1,8 y 2.

#### **5.7.4. Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

A partir de de 500 ng del ARN de cada muestra se sintetizó - mediante transcripción reversa - el ADN complementario (ADNc) requerido para realizar los ensayos de qPCR.

Previa incubación en el termociclador a 65°C durante 15 minutos, a cada tubo se agregaron 1 ul de dNTPs 0,4 mM, 0,5 ul de Oligo dT (0,02 ug/ul) y 2 ul de agua DEPC y se incubó de nuevo en el termociclador durante cinco minutos a 65°C para provocar denaturación de posibles dobles bandas. A continuación, los tubos se dejaron en hielo durante un minuto y a cada uno se agregó un volumen de 10 ul de la siguiente mezcla:

- 3 ul de buffer RT (10x)
- 2 ul de DTT 0,1 M
- 4 ul de MgCl<sub>2</sub> 1 mM
- 1 ul de RNase Out 1,6 unidades/ul

Después de incubar a 42°C durante dos minutos en el termociclador, se agregó a cada tubo 0,5 ul de SuperScript II First-Strand Synthesis System para RT-PCR (1 unidad/ul) (Invitrogen Corporation, Brazil), enzima encargada de efectuar la transcripción reversa y se llevó de nuevo a incubación en el termociclador a 42°C durante 55 minutos y a 70°C durante 15 minutos. Con el fin de inactivar la transcriptasa reversa, se añadió 0,5 ul de RNase H (0,08 unidades/ul) a la solución que contenía ADNc sintetizado. Los tubos se dejaron en incubación a 37°C durante 20 minutos y se almacenaron a -80°C, con el fin de evitar degradación.

#### **5.7.5. PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)**

Esta técnica permite cuantificar - en forma tanto absoluta como relativa - la expresión de un gen determinado, con base en la amplificación de toda la región transcrita de un gen o de un fragmento de ésta, a partir del ADNc obtenido por retrotranscripción desde el pool de ARNm. La amplificación se puede detectar mediante la utilización de colorantes o de sondas fluorescentes.

Al ciclo de la PCR en el que la fluorescencia aumenta por encima del umbral, se le denomina Cycle Threshold o CT. En este momento, el sistema comienza a detectar el incremento de la señal fluorescente asociada con el aumento exponencial de la detección del producto amplificado. En este ciclo, la fluorescencia emitida por el producto amplificado sobrepasa a la fluorescencia basal o background y corresponde a la porción lineal de la curva de amplificación (fase log-lineal).

La especificidad del producto amplificado se comprueba mediante el análisis de la temperatura de melting o fusión ( $T_m$ , *del inglés Melting Temperature*), en la que se produce un cambio drástico en la fluorescencia emitida. La  $T_m$  corresponde a la temperatura en la que la mitad de las moléculas del ADN amplificado se encuentra en forma de cadena sencilla y la otra mitad en forma de cadena doble. Cada amplímero tiene su propia  $T_m$ , la que depende, no sólo de la longitud, sino también del contenido de C+G.

En adición, con el fin de evaluar la expresión de los genes de interés, se cuantificó el producto amplificado, teniendo en cuenta las curvas de eficiencia que previamente se habían elaborado para cada gen. Así, la curva para hTERT relacionó la intensidad de la fluorescencia emitida por el ADN de doble cadena marcado con SYBR Green, con el número de moléculas de ADNc de un plásmido que contenía el fragmento a estudiar del gen hTERT, mientras que las curvas de eficiencia para TRF2 y GAPDH se elaboraron con base en el ADNc de fibroblastos de cordón umbilical.

Mediante el uso de cebadores o primers específicos para los genes de interés (hTERT y TRF2), así como para GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) como posible gen normalizador, se llevó a cabo la PCR en tiempo real, con el fluorocromo SYBR Green I<sup>TM</sup> (Invitrogen Corporation, Brazil). Este fluorocromo emite una señal fluorescente cuando se intercala en el surco menor del ADN de doble cadena, lo que hace posible no sólo que el equipo de PCR pueda detectar la fluorescencia, sino que el software pueda calcular los CT correspondientes, a partir de la intensidad de la fluorescencia detectada.

#### **5.7.6. Selección de los primers o cebadores**

Con la finalidad de amplificar hTERT, TRF2 y GAPDH se utilizaron las siguientes parejas de primers:

*hTERT*

Directo: 5' - CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA - 3'

Reverso: 5' - GGATGAAGCGGAGTCTGGA - 3'

(Horikawa *et al* 1998)

*TRF2*

Directo: 5'- GGTACGGGGACTTCAGACAG - 3'

Reverso: 5'- CGCGACAGACACTGCATAAC - 3'

(Van Wezel *et al* 2005)

*GAPDH*

Directo: 5' - CTCATGACCACAGTCCATGCCATC - 3'

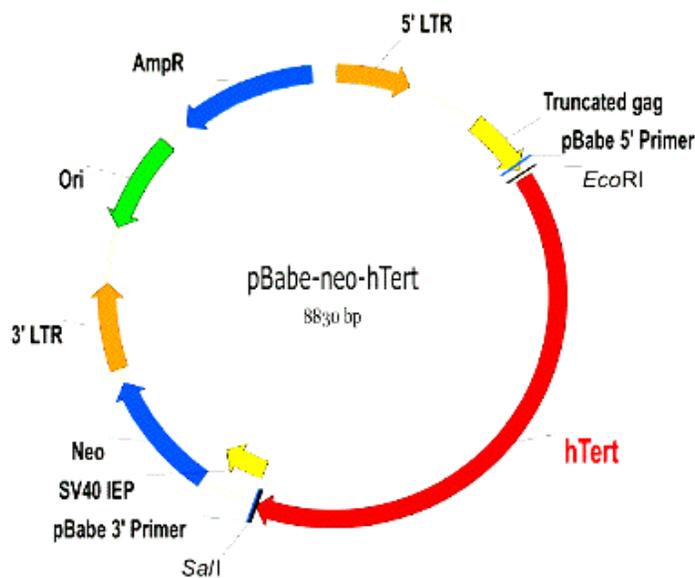
Reverso: 5' - CTGCTTCACCACCTTCTTGATGTC - 3'

(Kim *et al* 2006)

Una vez seleccionados los primers, se efectuó alineamiento con el programa Primer Blast (Primer-Blast En: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)) con el fin de verificar su especificidad, así como el tamaño del producto amplificado. En adición, se tuvo en cuenta que, para determinar la expresión de hTERT, era necesario que los primers correspondientes anillaran en una región consenso, común para todas sus isoformas.

### **5.7.7. Estandarización de las condiciones de la qPCR**

En el caso de hTERT, se elaboró la curva de calibración mediante la utilización del plásmido *Plasmid 1773*, con el inserto del ADNc del gen: *pBABE-hygro-hTERT* (Counter *et al* 1998) (Ver Figura 5.2) mientras que, para TRF2 y GAPDH se utilizó ADNc proveniente de cultivos de fibroblastos de cordón umbilical, células de las que se contaba con la certeza de la expresión de ambos genes.



**Figura 5.2.-** Plásmido 1773: pBABE-hygro-hTERT. Addgene plasmid 1774 (Counter *et al* 1998).

Con el objeto de determinar la temperatura óptima de anillamiento o hibridación de los primers y verificar su especificidad, se efectuaron ensayos de amplificación de hTERT, TRF2 y GAPDH con un gradiente de temperatura. En estos ensayos, la temperatura varió desde 56°C hasta 62°C.

La amplificación de los productos esperados fue verificada en gel de agarosa al 3% con un marcador de peso molecular de 50 pb.

### 5.7.8. Curvas de eficiencia

#### 5.7.8.1. hTERT

Se obtuvieron las copias del plásmido por transformación de bacterias *Escherichia coli* sensibles a ampicilina. Estas fueron sembradas mediante un asa sobre agar en caja de petri. Después de 24 horas de cultivo, con un asa estéril se tomó una colonia y se inoculó en 1 litro de medio de cultivo Luria-Bertani con 100 ug/ml de ampicilina. Pasadas otras 24 horas, cuando el medio se había tornado opaco y el cultivo había alcanzado la fase estacionaria, mediante el sistema de purificación *Genelute Plasmid Maxi-Prep* (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA), se obtuvo el

ADN plasmídico. A continuación se efectuó cuantificación del ADN purificado mediante espectrofotometría, a una longitud de onda de 260 nm, en un equipo NanoDrop 2000 y se calculó el número de moléculas por microlitro.

#### *5.7.8.1.1. Purificación del plásmido*

De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se desarrolló el siguiente protocolo:

Para recolectar las bacterias, se efectuó centrifugación de 25 - 200 ml de la suspensión celular por 5-10 minutos a 4000-5000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 6 ml de solución de resuspensión y se agitó con vórtex, después de lo cual se adicionaron 6 ml de solución de lisis, se mezcló suavemente y se aclaró por cinco minutos.

A continuación, se añadieron 8 ml de solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó a 15000 rpm por 10-15 minutos.

Con el fin de purificar el ADNc del plásmido por retención en la columna Maxi Spin, se vertió sobre ésta el lisado. La columna fue entonces colocada dentro de un tubo de 50 ml y centrifugada a 3000-5000 rpm durante 1-2 minutos. A continuación, se descartó el líquido que pasó a través de la columna. Para eliminar los contaminantes, se añadieron a la columna 15 ml de solución de lavado adicionada con etanol y se centrifugó a 3000-5000 rpm por cinco minutos.

Finalmente, para liberar el plásmido de la columna y obtener el ADNc purificado, se añadieron 5 ml de solución de elución y se transfirió a un nuevo tubo, después de lo cual se centrifugó a 3000-5000 rpm por 3-5 minutos.

#### *5.7.8.1.2. Cálculo del número de moléculas del plásmido*

Se determinó la masa de una molécula de plásmido con la siguiente fórmula:

$$m = [n] \times [1 \text{ mol} / 6,023 \times 10^{23} \text{ moléculas (bp)}] \times [660 \text{ g/mol}] = [n] \times [1,096 \times 10^{-21} \text{ g/pb}]$$

en la que:

- m = masa
- n = tamaño del ADN del plásmido en pares de bases (pb)
- número de avogadro =  $6,023 \times 10^{23}$ /mol
- peso molecular promedio de una molécula de ADN de doble cadena = 660 g/mol

El tamaño del plásmido (n) es igual a la suma de 8830 pb (del plásmido) y 3500 pb (del ADNc de hTERT), para un total de 12330 pb.

$$\text{Entonces } m = 12330 \text{ pb} \times 1,096 \times 10^{-21} \text{ g/pb} = 1,351 \times 10^{-17} \text{ g}$$

La concentración del plásmido en suspensión, determinada mediante espectrofotometría, fue 8.6 ng/ul o  $8,6 \times 10^{-9}$  g/ul.

Se calculó el número de moléculas del plásmido por microlitro con la siguiente fórmula:

*No. moléculas plásmido/ul =*

*Concentración plásmido (g/ul) / Masa de una molécula del plásmido recombinante (g/No. moléculas)*

$$\text{No. moléculas plásmido/ul} = \frac{8,6 \times 10^{-9} \text{ g/ul}}{1,351 \times 10^{-17} \text{ g}} = 6,365 \times 10^8 \text{ moléculas/ul}$$

Con el objeto de elaborar la curva de eficiencia de hTERT, se partió de la concentración inicial de la solución con el plásmido ( $6,365 \times 10^8$  moléculas/ul), de la que se hicieron diluciones en forma seriada (1:10). Las diluciones fueron entonces sometidas a amplificación, con los siguientes reactivos:

- *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG: 1X*
- *ROX: 500 nM*
- *Primer directo: 500 nM , Primer reverso: 500 nM*
- *ADNc: 2ul*
- *Agua: 3 ul*

#### *5.7.8.1.3. Límite inferior de detección de hTERT*

En razón de que se esperaba una expresión muy baja de hTERT, para identificar su límite inferior de detección se efectuaron cinco diluciones adicionales a las anteriores, en relación 1:10, a partir de la última dilución analizada en la curva de eficiencia, es decir  $63,65$  moléculas/ul. Las diluciones fueron entonces sometidas a amplificación en condiciones idénticas a las anteriores.

#### 5.7.8.2. TRF2 y GAPDH

Las curvas de eficiencia de TRF2 y GAPDH relacionan los CT con cada una de las diluciones del ADNc. En cada caso, se tomaron 2000 ng del ADNc obtenido a partir del ARN extraído de cultivos primarios de fibroblastos de cordón umbilical, de los que se efectuaron diluciones 1:2 en forma seriada. Las diluciones de ADNc fueron entonces sometidas a amplificación, en las mismas condiciones y reactivos utilizados para la amplificación de hTERT.

#### 5.7.9. Eficiencia

La eficiencia de amplificación fue calculada tomando el valor de la pendiente de la relación lineal entre el ciclo umbral de detección de la amplificación (CT) y el logaritmo del número de moléculas de ADNc amplificadas (para hTERT) o la concentración en ng del ADNc (para TRF2 y GAPDH). Para una eficiencia del 100%, indicativa de que en cada ciclo de amplificación se duplicó la cantidad de ADN, se espera que el valor de la pendiente de la recta sea igual a -3,32.

La eficiencia de amplificación se calculó mediante la fórmula  $E = (10^{-(1/S)})$ , en la que S (*del inglés slope*), corresponde al valor de la pendiente.

#### 5.7.10. qPCR de las muestras

El ADNc proveniente de células epiteliales y de fibroblastos ováricos de 22 donantes, en los pases 1-7 de cultivo, fue amplificado en forma secuencial, en grupos de 30. Debido a que TRF2 y GAPDH compartieron el mismo perfil térmico fueron analizados en un mismo ensayo. Como la expresión de GAPDH es de tipo constitutivo, su no amplificación se consideró como indicativa de que la amplificación había fallado. Por ese motivo, sólo cuando hubo amplificación de GAPDH, se procedió a amplificar hTERT en la reacción subsiguiente. En caso de no amplificar GAPDH, se repitió la reacción. Si de nuevo el resultado fue negativo, se repitió la retrotranscripción con el fin de obtener nuevo ADNc. Los ensayos se hicieron por duplicado, de manera que cada CT reportado correspondió al promedio aritmético de ambos resultados y se utilizó la mezcla de reactivos descrita en la estandarización de la qPCR.

#### **5.7.11. Validación del ensayo qRT-PCR para GAPDH como gen control para los ensayos con las muestras de células epiteliales ováricas**

Con antelación al inicio de los experimentos tendientes a la cuantificación de la expresión de los genes de estudio, se efectuó un ensayo de validación de GAPDH, con el propósito de establecer su idoneidad como gen normalizador, mediante la determinación de su expresión entre diferentes muestras de células epiteliales, en diferentes pases de cultivo. Para esto, se extrajo el ARN de diez muestras de células epiteliales en diferentes pases de cultivo, seleccionadas al azar. A partir de 500 ng del ARN se obtuvo, mediante retrotranscripción, el correspondiente ADNc, del que una vez cuantificado se tomaron 500 ng, los que fueron sometidos a amplificación. Las concentraciones de los reactivos para la PCR y las condiciones de amplificación fueron iguales para todas las muestras.

#### **5.7.12. Análisis de los datos obtenidos**

Después de determinar los CT de los productos amplificados de hTERT, TRF2 y GAPDH, correspondientes a cada uno de los pases de los cultivos, se analizó la variabilidad de los resultados y la conveniencia de normalizar la expresión de los genes de interés con base en la del gen de referencia examinado (GAPDH) o con relación al ARN total.

Los resultados de la expresión de TRF2 y de GAPDH - expresada en términos de CT- fueron normalizados con base en el ARN total. Después de esto, se efectuó corrección con la eficiencia de amplificación de cada gen, elevada a la diferencia entre el CT del pase analizado y el CT del pase uno (calibrador), en acuerdo con la fórmula propuesta por Livak y Schmittgen 2001.

### **5.8. Cariotipo**

La presencia de anormalidades cromosómicas de las células epiteliales ováricas fue determinada en la primera parte del estudio, mediante el análisis del cariotipo de células de tejido epitelial ovárico histológicamente normal, obtenido a partir de 26 donantes sanas, con edades entre los 20 y 63 años. Las donantes formaron parte de la muestra correspondiente a la primera parte del estudio.

### **5.8.1. Procesamiento**

Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia de 80-85% - en los pases uno y cuatro - se adicionó tripsina-EDTA con el fin de desprender las células, se añadió la mezcla de medios de cultivo suplementada con SFB al 10% y antibióticos y se resuspendió. La suspensión celular se extendió sobre láminas dentro de cajas de petri, con 15 ml de la mezcla de medios de cultivo suplementada. Se dejó en incubación el tiempo necesario para que las células formaran una monocapa (aproximadamente 72 horas). Posteriormente y con el fin de detener el crecimiento celular en metafase, se adicionaron 150  $\mu$ l de colchicina por 2,5 horas, seguidos por solución hipotónica, lo que indujo el aumento del volumen celular y favoreció una mejor distribución de los cromosomas cuando la suspensión fue extendida sobre láminas portaobjetos. Pasados diez minutos se agregó fijador Carnoy frío y se dejó actuar durante 50 minutos.

### **5.8.2. Coloración diferencial**

Después de extendidas y fijadas, las láminas se dejaron secar al aire y se incubaron a 82°C por dos horas. Previa inmersión por 30 minutos a 62°C en buffer 2xSSC, se lavó con abundante agua y se dejó secar, se aplicó solución colorante Giemsa durante ocho minutos y se lavó con agua.

### **5.8.3. Análisis cromosómico**

En el microscopio se seleccionaron hasta 39 mitosis por donante. Se analizaron las células con metafases con buena dispersión, morfología y alta resolución de bandas (500) y se determinó la presencia de anomalías numéricas y/o estructurales.

## **6. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO**

En el presente estudio, de tipo experimental – factorial, fueron evaluadas las siguientes variables dependientes: actividad SA- $\beta$ -gal normalizada, población celular normalizada, expresión de hTERT, de TRF2 y de GAPDH (como posible gen normalizador) y frecuencia de anomalías cromosómicas.

Las variables independientes fueron la edad de las donantes y la edad del cultivo.

### **6.1. Hipótesis**

- Existe diferencia entre la capacidad replicativa de las células epiteliales y la de los fibroblastos ováricos en cultivo.
- Cuando aumenta la edad de las donantes, es menor la capacidad replicativa de las células epiteliales cultivadas en los pases previos a la senescencia.
- El aumento en la actividad SA- $\beta$ -gal puede ser considerado como predictor del inicio del estado senescente en las células epiteliales cultivadas.
- La actividad SA- $\beta$ -gal es mayor en los cultivos de células epiteliales de las donantes de mayor edad.
- Existe relación entre la edad de las donantes y el inicio del estado senescente de los cultivos de células epiteliales, determinado con base en el aumento de la actividad SA- $\beta$ -gal.
- Existe diferencia entre la actividad SA- $\beta$ -gal de las células epiteliales ováricas criopreservadas y la de las no criopreservadas.
- La expresión de hTERT puede estar aumentada en los pases previos al inicio de la senescencia en las células epiteliales cultivadas.
- La expresión de TRF2 varía a lo largo de las diferentes fases de crecimiento del cultivo de células epiteliales.
- La expresión de TRF2 en las células epiteliales cultivadas cambia en relación con la edad de las donantes.
- La expresión de GAPDH permanece estable independientemente del pase de cultivo o de la edad de las donantes.
- Existe relación entre la expresión de hTERT y TRF2 con la actividad SA- $\beta$ -gal en las células epiteliales cultivadas.
- La frecuencia de anomalías cromosómicas en las células epiteliales en cultivo está asociada con la edad de las donantes.
- Existe relación entre la actividad SA- $\beta$ -gal y la aparición de anormalidades cromosómicas.

### **6.2. Procedimiento de muestreo y tamaño de muestra**

En la primera parte del estudio se procesaron 48 muestras de tejido ovárico de 1-2 cm<sup>3</sup>, de donantes fallecidas por trauma o vivas sanas, ooforectomizadas total o parcialmente por condiciones benignas, mientras que en la segunda se recolectaron 28 de similar tamaño, provenientes sólo de pacientes vivas y también ooforectomizadas en forma total o parcial por condiciones benignas. El tejido fue obtenido previo aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Rosario y firma del consentimiento informado por parte de las donantes (en pacientes quirúrgicas) o de sus familiares (en mujeres fallecidas). El consentimiento incluyó la aceptación para la utilización de las muestras en estudios posteriores dentro de la misma línea de investigación.

Según la edad cronológica de las donantes y teniendo en cuenta que la declinación de la función gonadal se inicia aproximadamente a los 35-36 años de edad (Kupesic *et al* 2003), se establecieron dos grupos etarios, así: G1  $\leq$  36 años y G2  $\geq$  37 años.

En adición a este tipo de estratificación y con el fin de examinar los resultados correspondientes a los análisis cromosómicos de la primera parte del estudio, se aplicó una segunda estratificación, también con dos grupos etarios: G1  $<$  50 años y G2  $\geq$  50 años, en concordancia con la edad promedio de inicio de la menopausia (Pastor *et al* 2005).

### **6.3. Diseño de la muestra**

Muestreo consecutivo secuencial, efectuado en mujeres fallecidas por trauma, con muerte cerebral, o sometidas a ooforectomía total o parcial, debida a condiciones benignas, que cumplieron con los criterios de inclusión y de exclusión del estudio. El muestreo se efectuó en las instituciones adscritas a la Red de Trasplante de Organos, así como en el Hospital Occidente de Kennedy y el Hospital Mayor de Bogotá DC, Colombia, en el período 2007-2009.

### **6.4. Análisis estadístico**

Para describir las variables cualitativas, se utilizaron frecuencias absolutas y relativas. Para las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central (promedio y mediana) y de variabilidad (rango y desviación estándar).

Previa evaluación de homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene o Shapiro-Wilk y normalidad con la prueba Kolmogorov–Smirnov y de transformaciones con raíz cuadrada o logaritmo natural en caso de distribuciones no normales, se efectuaron los siguientes procedimientos estadísticos:

- En la muestra no estratificada por edades de la primera parte del estudio, se evaluaron las medias de los resultados de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada entre los diferentes pases de los cultivos de células epiteliales ováricas, con el análisis de varianza no paramétrico de Friedman y se compararon las diferencias entre las medias con la prueba de comparaciones múltiples de Friedman. En la segunda parte, se aplicó el análisis de varianza paramétrico de medidas repetidas o el no paramétrico de Friedman, según hubiese o no distribución normal de las medias correspondientes a cada uno de los pases. Las diferencias obtenidas en la segunda parte del estudio con los análisis paramétrico de varianza de medidas repetidas o con el no paramétrico de Friedman fueron a su vez comparadas con la prueba de comparaciones múltiples ajustada por Bonferroni o con la de comparaciones múltiples de Friedman, respectivamente.
- En la muestra estratificada por grupos etarios de la primera parte ( $G1 \leq 36$  años y  $G2 \geq 37$  años), se evaluaron las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada en cada pase con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney, mientras que en la segunda parte, se analizaron las medias con la prueba paramétrica t-student.
- Con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney, se compararon las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada por pases, de las células epiteliales de las muestras no estratificadas por edades, correspondientes a la primera y la segunda parte del estudio.
- Con el fin de analizar las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada de fibroblastos en la muestra no estratificada por edades de la primera parte, se aplicó el análisis de varianza no paramétrico de Friedman. Para la muestra estratificada por grupos etarios ( $G1 \leq 36$  años y  $G2 \geq 37$  años), 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 ováricas de la primera parte, mediante la prueba no paramétrica de los rangos con signo de Wilcoxon.

- Las medianas de la población celular normalizada de los diferentes pases de los cultivos de células epiteliales ováricas en la primera parte del estudio fueron analizadas 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, en la muestra estratificada por grupos etarios ( $G1 \leq 36$  años y  $G2 \geq 37$  años), fueron evaluadas con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney. Las medianas de los resultados relativos a la población celular normalizada de los fibroblastos de esta primera parte fueron analizados en las dos muestras (estratificada y no estratificada) con las mismas pruebas que se aplicaron para las células epiteliales.
- En la segunda parte del estudio, las medianas de la población celular normalizada de los diferentes pases de los cultivos de células epiteliales fueron evaluadas en la muestra no estratificada por grupos etarios, por medio de la prueba no paramétrica de Friedman, después de la cual se efectuaron comparaciones múltiples con la prueba de Friedman. En la muestra estratificada por grupos etarios ( $G1 \leq 36$  años y  $G2 \geq 37$  años), según hubiese o no normalidad en cada pase, se aplicaron las pruebas t-student o el análisis de varianza no paramétrico de Friedman.
- Con el objetivo de comparar las medianas de la población celular normalizada de las células epiteliales entre las dos partes del estudio se aplicó la prueba no paramétrica exacta bilateral de Mann-Whitney, mientras que, para comparar los rangos de la población celular normalizada entre fibroblastos y células epiteliales de la primera parte, se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.
- En la segunda parte del estudio y con el fin de evaluar si existía relación entre la edad cronológica y la edad biológica de las donantes en el momento de inicio de la senescencia (identificado como la edad del cultivo en la que se inició el aumento de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada, en forma simultánea con el descenso en la población celular normalizada), se analizaron las

gráficas que incluían las curvas de tendencia de distribución de medianas de población celular normalizada y de actividad SA-β-gal normalizada, en la muestra estratificada por grupos etarios ( $G1 \leq 36$  años y  $G2 \geq 37$  años).

- En cuanto a los objetivos referentes a la evaluación de la cuantificación de la expresión de TRF2, GAPDH y hTERT se efectuaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro Wilk para evaluar normalidad. Los resultados de la expresión relativa de TRF2 y de GAPDH en las células epiteliales fueron sometidos a un análisis de covarianza que ajustó un modelo de regresión con el efecto de los pases de cultivo y la edad de las donantes. Para hTERT se determinaron las frecuencias de detección de la expresión y de ausencia de detección para cada pase y se elaboró un modelo de regresión logística que tuvo en cuenta el efecto de los pases y de la edad. Para identificar posibles diferencias significativas en la expresión de TRF2, GAPDH y hTERT en fibroblastos, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se examinó además la posibilidad de una asociación entre la expresión relativa de los genes estudiados y la actividad SA-B-gal, mediante la aplicación de la prueba no paramétrica de correlación de Spearman.
- En el objetivo relacionado con la identificación de anomalías cromosómicas en cada grupo etario ( $G1 < 50$  años y  $G2 \geq 50$  años), se calcularon las frecuencias absolutas y relativas (expresadas como porcentajes) y se evaluó su normalidad mediante las pruebas Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors) y Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. En caso de distribuciones no normales, se efectuaron transformaciones con raíz cuadrada y se evaluaron las diferencias de promedios entre grupos con la prueba t-student para grupos independientes con varianzas homogéneas y heterogéneas. La prueba no paramétrica exacta Mann-Whitney se aplicó en caso de que no se cumplieran los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas.
- Con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney se examinó la posible asociación entre la actividad SA-β-gal normalizada y la presencia de anomalías cromosómicas.

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

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Establecimiento de cultivos primarios**

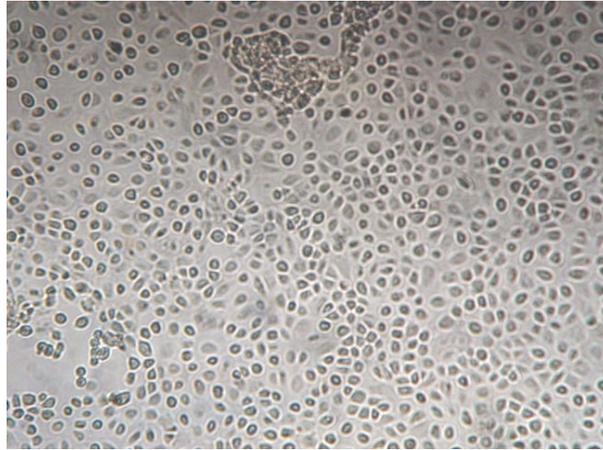
Además de recolectar las muestras de tejido mediante biopsia, en la primera parte del estudio se investigó la posibilidad de recuperar las células epiteliales mediante el método de cepillado o brushing de la superficie ovárica, con resultados poco satisfactorios, pues las células sembradas murieron en el primer pase (pacientes 6, 7 y 22).

El método utilizado para cultivar las células mostró su eficacia en el establecimiento y consolidación de los cultivos primarios, en los que células que lograron ser subcultivadas en forma seriada durante 4-10 pases. Sin embargo, en los pases 3-5, las células comenzaron a adquirir un fenotipo senescente, caracterizado por una morfología mesenquimática y dificultad para alcanzar confluencia. En ambas partes del estudio, se consideró como último pase del cultivo aquel en el que la densidad celular alcanzó un nivel estable o bien, disminuyó durante un período de 7 a 15 días contados a partir de la tripsinización inmediatamente anterior.

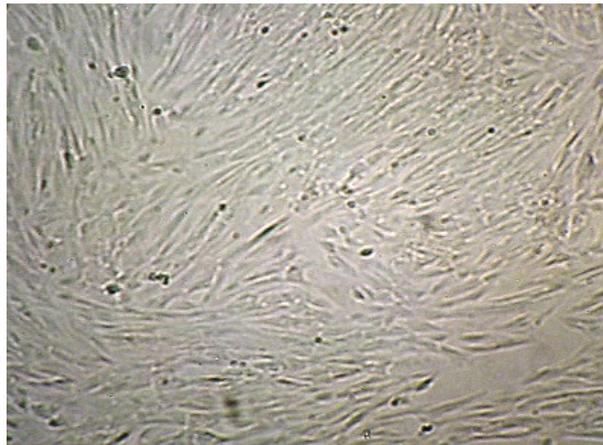
La duración total de los cultivos dio el margen suficiente para que las células alcanzaran el estado senescente, lo que hizo posible determinar la actividad SA- $\beta$ -gal en los dos tipos de células cultivadas, así como la presencia de anomalías cromosómicas de las células epiteliales.

#### **7.1.1. Selección del medio de cultivo**

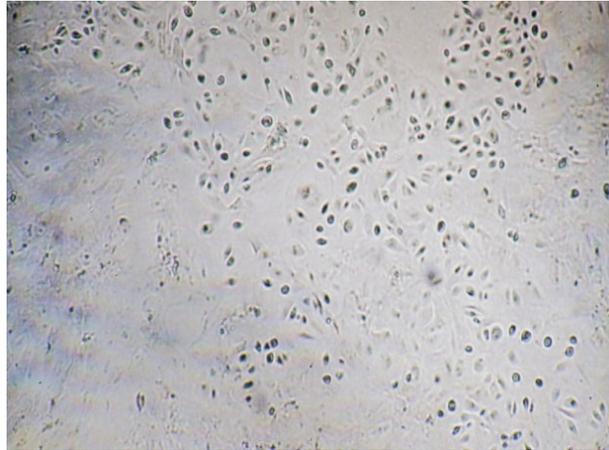
La influencia de los diferentes medios utilizados durante la primera parte del estudio fue evaluada mediante inspección visual de la densidad celular. Las células cultivadas en la mezcla de medios MCDB105/M199 suplementada mostraron una rápida proliferación (Ver Figuras 7.1 y 7.2), mientras que las sembradas con MegaCell MEM/F12- HAM suplementado (sólo las muestras de las pacientes 1, 2 y 3) tuvieron pobre crecimiento y no alcanzaron el grado de confluencia deseado (80%-85%) en el primer pase (Ver Figura 7.3), motivo que determinó la selección de la mezcla MCDB105/M199 para los cultivos subsiguientes.



**Figura 7.1.- Células del epitelio superficial del ovario en pase dos.** Las células han adquirido la apariencia adoquinada característica del tipo celular. Medio de cultivo: MCDB105/M199 con SFB al 10%.



**Figura 7.2.- Fibroblastos del estroma ovárico en pase dos.** Como se aprecia en este cultivo confluyente, estas células exhiben *in vitro* su característica morfología alargada. Medio de cultivo: MCDB105/M199 con SFB al 10%.

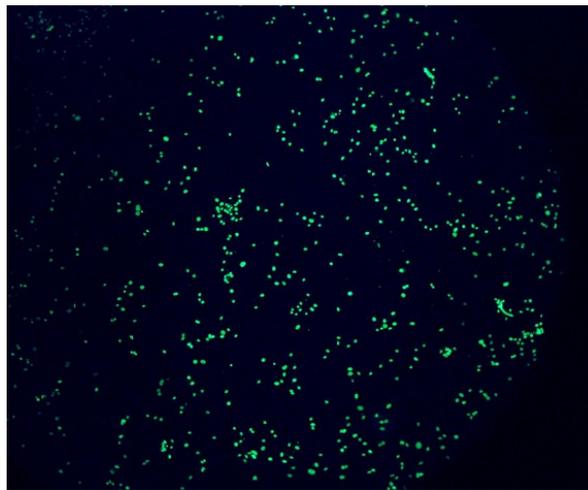


**Figura 7.3.- Células del epitelio superficial del ovario en pase uno, cultivadas con el medio MegaCell MEM/F12- HAM con 10% SFB.** Se aprecia una baja densidad celular, resultado de una menor capacidad replicativa cuando se usó este medio de cultivo.

#### ***7.1.2. Caracterización de las células epiteliales***

Desde el primer pase de cultivo, y con la finalidad de verificar la identidad y la pureza de los cultivos de células epiteliales, se tuvo en cuenta su morfología adoquinada, en comparación con la alargada y plana exhibida por los fibroblastos del estroma y las células del mesotelio extraovárico, de modo que no hubiese mezcla de ambos tipos celulares. Aunque la discriminación visual entre células epiteliales y fibroblastos se efectuó durante todos los pases de cada cultivo, fue durante el primer pase cuando su aplicación fue determinante, teniendo en cuenta que es durante este pase cuando existe una mayor probabilidad de que los cultivos de células epiteliales presenten contaminación con fibroblastos, en razón de la composición de la muestra, de la proximidad con su recolección y de la siembra de las células. Cuando la población celular durante el primer pase es mixta, es decir cuando incluye células epiteliales y fibroblastos, éstos rápidamente sobrepasan en crecimiento a las primeras, de modo que muy pronto el cultivo contiene sólo fibroblastos. Los leucocitos, otro tipo de célula contaminante, no pueden proliferar en la mezcla de medios seleccionada, ni tampoco tienen propiedades de adhesión. En adición, la reactividad de las células epiteliales con la anticitoqueratina 18-FITC hace posible diferenciarlas de otras células ováricas o extraováricas que no

expresan citoqueratina 18, como los fibroblastos, los leucocitos y las células mesoteliales del peritoneo. La caracterización de las células epiteliales con anticitoqueratina 18-FITC se efectuó en los tres primeros pases de los cultivos de las células epiteliales y permitió la visualización de las señales de color verde por medio de espectroscopia de fluorescencia. Es importante resaltar que se efectuaron conteos celulares en el microscopio de contraste de fases antes y después de la tinción con anticitoqueratina 18-FITC, con la finalidad de verificar ambos valores fuesen semejantes.



**Figura 7.4.- Caracterización de las células epiteliales con anticitoqueratina 18-FITC.** Se aprecian las señales fluorescentes que indican la localización de la citoqueratina 18 en las células epiteliales en pase dos cultivo.

### ***7.1.3. Criopreservación***

Durante la primera parte del estudio y debido a la dificultad inicial para recolectar las muestras de tejido ovárico, se decidió que las células recolectadas durante cada pase serían sometidas a criopreservación, con la finalidad de efectuar en forma simultánea todos los ensayos tendientes a determinar la actividad SA- $\beta$ -gal y a cuantificar la cantidad de proteínas. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron en forma clara que la criopreservación afectó no sólo la viabilidad celular, sino también la actividad enzimática, de modo que, como medida encaminada a contrarrestar dicho efecto durante la segunda parte del estudio, se decidió efectuar

los ensayos correspondientes después de la tripsinización al final de cada pase, eliminando así el proceso de criopreservación.

#### **7.1.4. *Conteo celular***

En la primera parte del estudio, la obtención de bajos conteos posteriores a la criopreservación de las células epiteliales y los fibroblastos, evidenció la dificultad para mantener la viabilidad de las células sometidas a dicho procedimiento.

Al comparar con los conteos obtenidos antes de la congelación, se encontró que el porcentaje de células muertas estuvo entre 80 y 90% en cada pase analizado, con tendencia a aumentar en los pases más tempranos (uno y dos) y en los tardíos (seis o más), lo que parece indicar que en la fase lag (Ia) y en la fase estacionaria del cultivo (III), aumenta la vulnerabilidad de las células a la criopreservación. Este hecho podría explicarse si se tiene en cuenta que durante la fase lag, las células aún no han desarrollado la totalidad de su potencial replicativo, debido a que aún se encuentran en un periodo de adaptación a las condiciones del cultivo. Por otra parte, en la fase estacionaria, un gran número de células se han tornado senescentes, de modo que es factible que, sometidas a criopreservación sean incapaces de sobrevivir o que, descongeladas, presenten limitaciones para adaptarse de nuevo al cultivo.

### **7.2. *Crecimiento de las células cultivadas***

#### **7.2.1. *Capacidad replicativa***

##### **7.2.1.1. *Parte I***

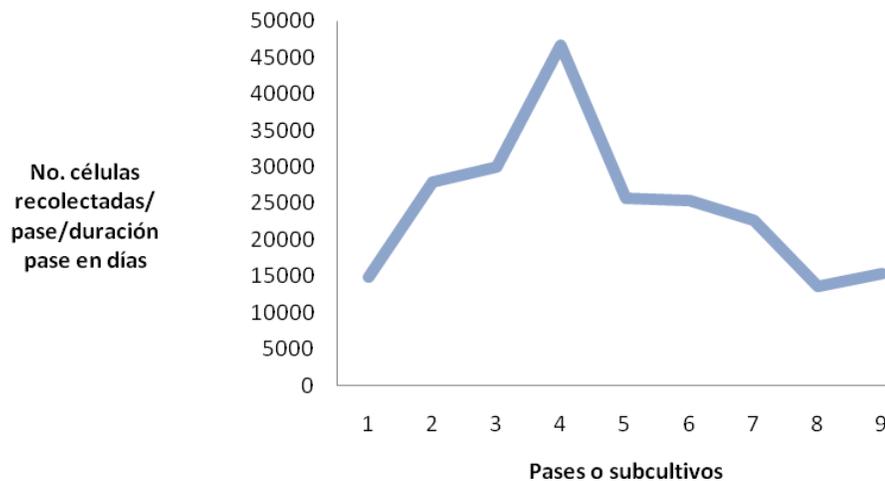
Aunque la tasa de proliferación de las células presenta variaciones durante el transcurso de un mismo pase o subcultivo, se decidió utilizar el parámetro población celular normalizada como estimativo de la capacidad replicativa. Debido a que la duración en días de cada pase fue variable entre cultivos, se decidió normalizar el número de células recolectadas después de cada tripsinización, con relación al número de días que duró el pase.

Los resultados obtenidos en los diferentes pases, tanto en células epiteliales como en fibroblastos del estroma ovárico de la misma donante, fueron analizados con las

pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro Wilk, lo que permitió establecer que las medias no se ajustaron a una distribución normal, ni en la muestra poblacional no estratificada, ni en la estratificada por grupos etarios ( $G1 \leq 36$  años y  $G2 \geq 37$  años).

#### **7.2.1.1.1. Muestra no estratificada**

*Células epiteliales.*- En los cultivos de células epiteliales ováricas se notó una tendencia al aumento en las medianas de la población celular normalizada de todos los cultivos, desde el pase uno hasta el cuatro, cuando llegó a su máximo. A partir de este momento, la población celular normalizada comenzó a decrecer hasta el pase ocho (Ver Figura 7.5)



**Figura 7.5.- Tendencia de la distribución de las medianas de la población celular normalizada en los cultivos primarios de células epiteliales ováricas.**

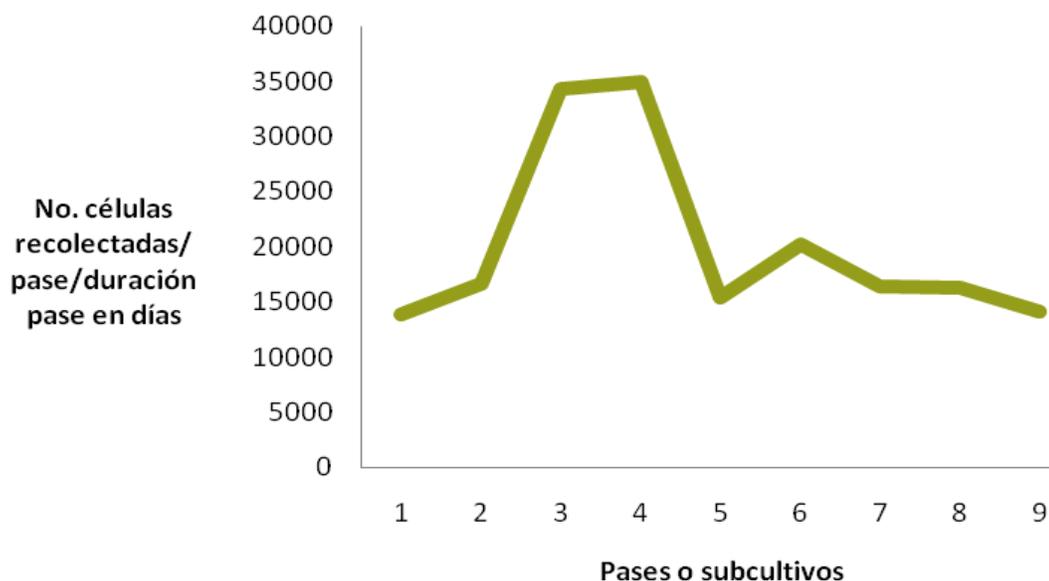
Con el análisis no paramétrico de varianza de Friedman para los ocho primeros pases, se observó una tendencia al aumento de los rangos promedio de la población celular normalizada desde el primer pase hasta el cuarto, cuando comenzaron a disminuir, en concordancia con la distribución de las medianas. Se encontraron diferencias significativas en la población celular normalizada cuando se analizaron los cuatro, cinco, seis, siete y ocho primeros pases (Ver Tabla 7.1).

Pase p<0,0 01	Rango prome dio								
1	1,55	1	1,84	1	2,07	1	2,53	1	3,28
2	2,50	2	3,06	2	3,80	2	4,33	2	4,83
3	3,20	3	3,78	3	4,50	3	5,31	3	6,39
4	2,76	4	3,36	4	4,13	4	5,06	4	6,67
		5	2,96	5	3,35	5	4,28	5	5,78
				6	3,15	6	3,56	6	4,11
						7	2,94	7	3,17
								8	1,78

**Tabla 7.1.- Rangos promedio de la población celular normalizada en los cultivos de células epiteliales ováricas, correspondientes a los análisis efectuados con cuatro, cinco, seis, siete y ocho pases de cultivo.**

Cuando se tomaron en cuenta los cuatro, los cinco y los seis primeros pases, se encontró con la prueba de comparaciones múltiples de Friedman que, en los tres casos, los rangos de la población celular normalizada fueron significativamente mayores en los pases dos, tres y cuatro con relación al primero. Al considerar los siete primeros pases, los rangos de la población celular normalizada fueron significativamente mayores en los pases tres y cuatro con relación al pase uno, así como también en el tres y el cuatro con respecto al pase siete. En adición, cuando se analizaron los ocho primeros pases, los rangos de la población fueron significativamente mayores en los pases tres y cuatro con relación al uno, así como en el tres, el cuatro y el cinco con relación al ocho ( $p<0,05$ ).

*Fibroblastos.*- Se observó una tendencia al aumento de las medianas de la población celular normalizada, desde el primer pase hasta el cuarto cuando alcanzaron el máximo, para después iniciar su descenso (Ver Figura 7.5).



**Figura 7.6.- Tendencia de la distribución de las medianas de la población celular normalizada en cultivos primarios de fibroblastos ováricos.**

Con el análisis no paramétrico de varianza de Friedman, se compararon los rangos promedio de la población celular normalizada en los cuatro, cinco, seis, siete y ocho primeros pases, entre los que se encontraron diferencias significativas (Ver Tabla 7.2).

Pase $p < 0,001$	Rango promedio	Pase $p = 0,036$	Rango promedio	Pase $p = 0,001$	Rango promedio	Pase $p = 0,001$	Rango promedio	Pase $p = 0,007$	Rango 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

**Tabla 7.2.- Rangos promedio de la población celular normalizada en cultivos de fibroblastos ováricos, correspondientes a los análisis efectuados con los cuatro, cinco, seis, siete y ocho primeros pases de cultivo.**

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 tres y cuatro con respecto al uno, mientras que, para los cinco primeros pases, el rango de la población en el pase cuatro fue significativamente mayor que en el uno. Para los seis primeros pases, los rangos de la población en los pases tres y cuatro fueron significativamente mayores que en el uno, mientras que en el tres y el cuatro lo fueron con relación al pase seis. Al analizar los siete primeros pases, se estableció que el rango de población fue significativamente mayor en el pase cuatro que en el uno, así como en el tres y el cuatro con relación al pase siete y en el cuatro respecto del seis. Cuando se analizó el conjunto de los ocho primeros pases, se halló que el rango de población fue significativamente mayor en el pase cuatro con relación al siete y al ocho y, aunque fue mayor en el pase cuatro que en el uno, así como en el cuatro respecto del seis, sin alcanzar el nivel de significancia ( $p < 0,05$ ).

**7.2.1.1.2. Muestra estratificada**

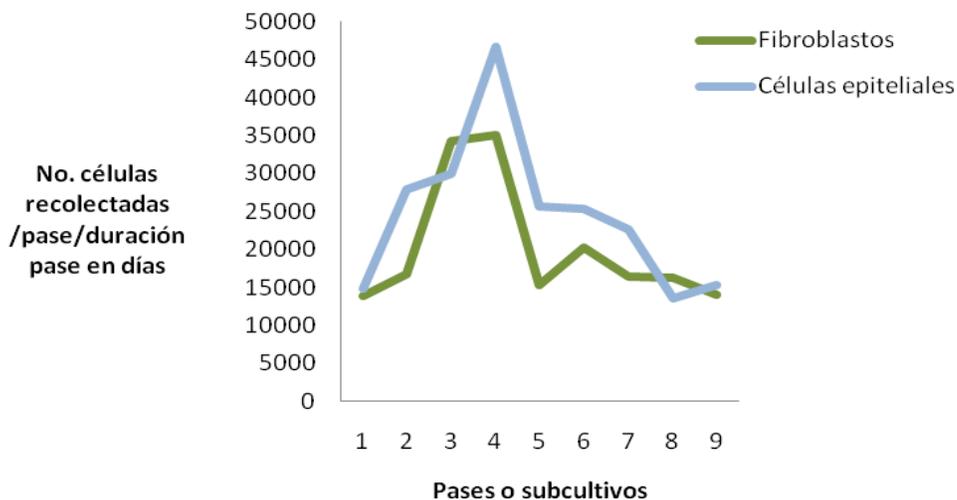
*Células epiteliales.*- Con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney, se encontraron diferencias significativas en los rangos de la población celular normalizada, mayor en el grupo de donantes G1 ( $\leq 36$  años) que en el grupo G2 ( $\geq 37$  años), en los pases uno ( $p=0,001$ ), dos ( $p=0,001$ ), tres ( $p=0,011$ ), cuatro ( $p=0,022$ ), cinco ( $p=0,032$ ) y seis ( $p=0,003$ ).

*Fibroblastos.*- Con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney, se encontró que los valores de distribución de los rangos promedio de la población celular normalizada en G1 fueron significativamente mayores que en G2, en los pases uno ( $p < 0,001$ ), dos ( $p=0,002$ ), tres ( $p=0,002$ ), cuatro ( $p=0,046$ ), cinco ( $p=0,029$ ) y siete ( $p=0,022$ ).

### 7.2.1.1.3. Comparación de la capacidad replicativa entre las células epiteliales y los fibroblastos

La figura 7.7 muestra las tendencias de la distribución de las medianas de las poblaciones celulares normalizadas de los dos tipos de células a lo largo de los diferentes pases del respectivo cultivo. Como se puede apreciar, 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, para alcanzar un máximo en el pase cuatro 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 uno ( $p < 0,001$ ), dos ( $p = 0,001$ ) y seis ( $p = 0,002$ ), pases en los que, según la figura, las células epiteliales exhibieron una mayor población celular normalizada con respecto a los fibroblastos.



**Figura 7.7.- Tendencias de distribución de las medianas de la población celular normalizada de los cultivos primarios de células epiteliales y fibroblastos ováricos.**

### 7.2.1.1.4. Conteo celular

Se efectuaron conteos antes y después del proceso de criopreservación. Los conteos posteriores, una vez descongeladas las células epiteliales y los fibroblastos, fueron de 20000 células/ml en un 80% de las muestras, muy inferiores a los obtenidos antes de la criopreservación. El 20% restante correspondió a conteos de 40000 células/ml (12%) y 60000 células/ml (8%).

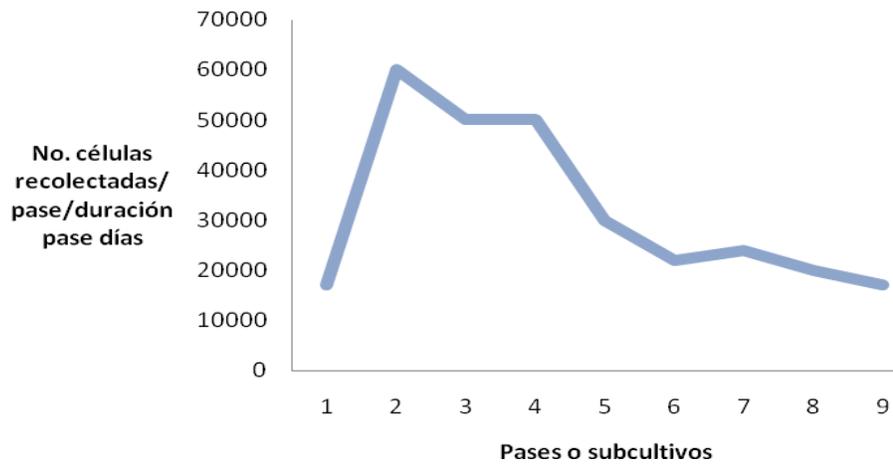
#### **7.2.1.2. Parte II**

##### **7.2.1.2.1. Muestra no estratificada**

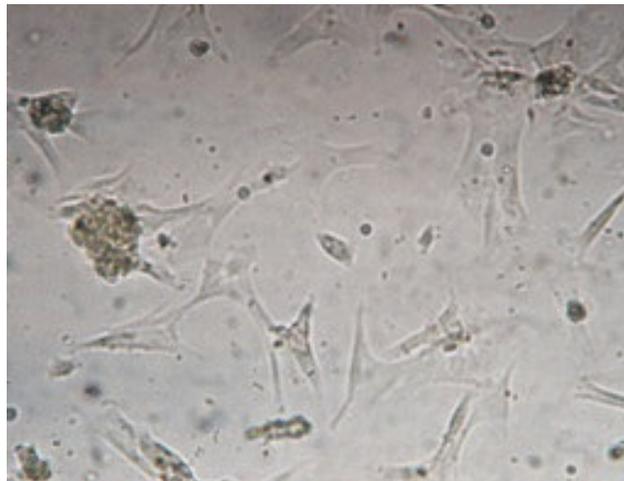
Previa evaluación de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y de transformaciones con logaritmo natural en caso de distribución no normal, se examinaron las medias y las medianas o los rangos de la población celular normalizada en los diferentes pases o subcultivos.

Las medias de la población celular normalizada fueron evaluadas mediante análisis de varianza no paramétrico de Friedman y comparadas con la prueba de comparaciones múltiples de Friedman.

La figura 7.8 muestra la tendencia de distribución de las medianas de la población celular normalizada en los 28 cultivos primarios. Con base en la adquisición de un fenotipo mesenquimático y la dificultad para alcanzar confluencia, se determinó que algunos cultivos alcanzaron el estado senescente en los pases tres o cuatro, mientras otros lo hicieron en pases más avanzados, como el cinco o el seis (Ver Figura 7.9). Por este motivo, el número total de subcultivos analizados varió entre cuatro y diez.



**Figura 7.8.- Tendencia de la distribución de las medianas de la población celular normalizada en cultivos primarios de células epiteliales ováricas.**



**Figura 7.9.- Cultivo de células epiteliales ováricas provenientes de una donante de 28 años de edad.** Las células se tornaron senescentes en el pase cuatro, como lo indica su morfología aplanada reminiscente de las células mesenquimáticas, su gran tamaño y la presencia de fagolisosomas.

Con el análisis de varianza no paramétrico de Friedman se encontraron diferencias significativas en los rangos de la población celular normalizada a partir del cuarto

pase y hasta el séptimo ( $p < 0,001$ ). No se analizaró un número mayor de pases debido a que, en pases mayores al siete el tamaño de muestra fue muy reducido. Al efectuar comparaciones múltiples con la prueba de Friedman, cuando se consideraron los cinco y los seis primeros pases, se encontró que los rangos de la población celular normalizada fueron significativamente mayores en los pases dos, tres y cuatro con relación al uno ( $p < 0,05$ ). Cuando se consideraron los siete primeros pases, se halló que los rangos de la población celular normalizada fueron significativamente mayores en los pases dos, tres y cuatro con relación al uno, así como en los pases tres y cuatro con relación al seis y en el pase cuatro con relación al siete ( $p < 0,05$ ) (Ver Tabla 7.3).

Pases $p < 0,001$	Rango promedio	Pases $p < 0,001$	Rango promedio	Pases $p < 0,001$	Rango promedio
1	1,74	1	2,10	1	2,53
2	3,52	2	4,23	2	4,89
3	3,54	3	4,30	3	5,18
4	3,37	4	4,45	4	5,37
5	2,83	5	3,45	5	3,97
		6	2,48	6	2,95
				7	3,11

**Tabla 7.3.- Rangos promedio de la población celular normalizada de cultivos de células epiteliales ovárica, correspondientes a los análisis efectuados con los cinco, seis y siete primeros pases.**

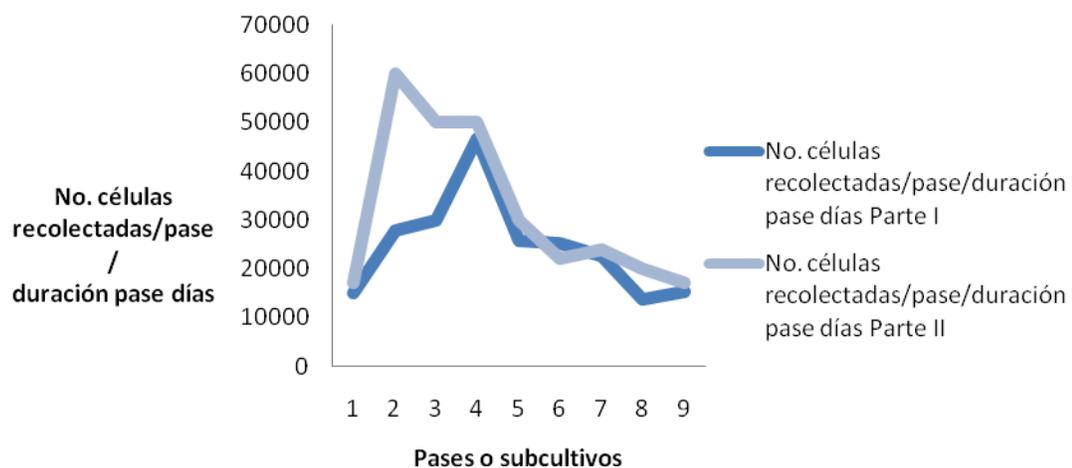
#### **7.2.1.2.2. Muestra estratificada**

Las pruebas de Kolmogorov Smirnov y Shapiro Wilk mostraron que las medias de la población celular normalizada correspondientes sólo a los pases cinco y seis se ajustaron a una distribución normal. Con la prueba t-student para grupos con varianzas heterogéneas, se halló que de estos pases, sólo en el cinco hubo diferencias significativas entre grupos etarios, pase en el que la media de la población fue mayor en G2 respecto a G1 ( $p = 0,024$ ). Con la prueba no paramétrica

exacta de Mann-Whitney, no se encontraron diferencias significativas en los rangos de los demás pases entre los dos grupos etarios.

### 7.2.2. Comparación de las poblaciones normalizadas de células epiteliales entre las dos partes del estudio

Mediante la prueba no paramétrica exacta bilateral de Mann-Whitney, sólo fue posible hallar diferencias significativas en el pase dos de los cultivos, en el que la población celular normalizada fue mayor en la primera parte del estudio ( $p=0,006$ ) (Ver Figura 7.10).



**Figura 7.10.- Tendencias de distribución de las medianas de la población celular normalizada de las células epiteliales de la primera y la segunda parte del estudio.**

### 7.3. Actividad SA- $\beta$ -gal

#### 7.3.1. Parte I

Se determinó la actividad SA- $\beta$ -gal, tanto en las células epiteliales como en los fibroblastos, con el fin de disponer de un criterio de comparación con la actividad enzimática de un segundo grupo de muestras que no fueron sometidas a criopreservación.

En un comienzo, se pensó utilizar como control negativo del ensayo a bacterias  $\beta$ -galactosidasa-negativas como *E. coli*. Sin embargo, al efectuar la prueba con

manitol se determinó que fermentaban la lactosa y producían por tanto la enzima. También se hicieron ensayos con *Salmonella*, bacterias  $\beta$ -galactosidasa-negativas, así como con la línea de células de 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  $\beta$ -gal similares a los de las células normales cultivadas. Por estos motivos se decidió utilizar buffer de lisis como único control negativo y blanco para la lectura de la absorbancia.

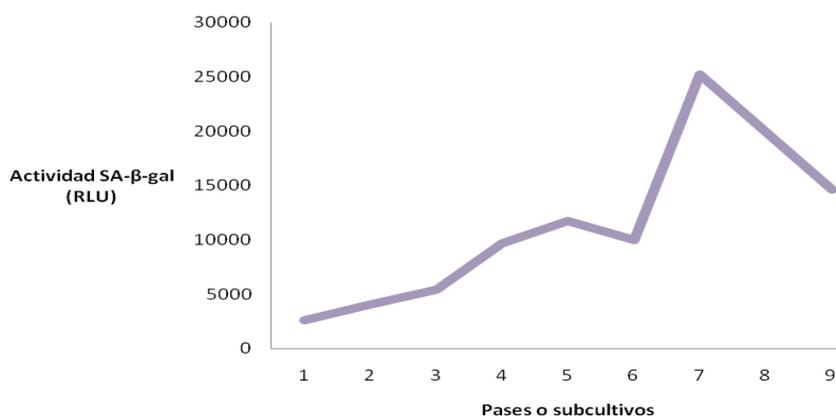
La actividad SA- $\beta$ -gal fue normalizada, tomando como unidad de referencia la cantidad de proteína de cada una de las muestras, lo que permitió disponer de un estimado de la luminiscencia emitida por las células, en *RLU* por microgramo de proteína, por mililitro de suspensión celular.

Previa evaluación de normalidad con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk y de transformaciones con logaritmo natural en caso de distribución no normal, se examinaron las medias y las medianas o los rangos de la actividad SA- $\beta$ -gal en los diferentes pases o subcultivos, tanto en células epiteliales como en fibroblastos del estroma ovárico de la misma donante, primero con los resultados de la muestra poblacional no estratificada y segundo, con los de la muestra estratificada en dos grupos etarios: G1  $\leq$  36 años y G2  $\geq$  37 años.

#### **7.3.1.1. Muestra no estratificada**

En razón de que las medias de la actividad SA- $\beta$ -gal en los dos tipos de células (epiteliales y 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 hallarse diferencias significativas.

*Células epiteliales.*- A lo largo de los seis primeros pases de los cultivos, las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal mostraron tendencia al aumento, especialmente en el pase seis, hasta alcanzar un máximo en el siete, cuando comenzaron a disminuir (Ver Figura 7.11).



**Figura 7.11.- Tendencia de la distribución de las medianas de la actividad SA-β-gal en cultivos primarios de células epiteliales ováricas.**

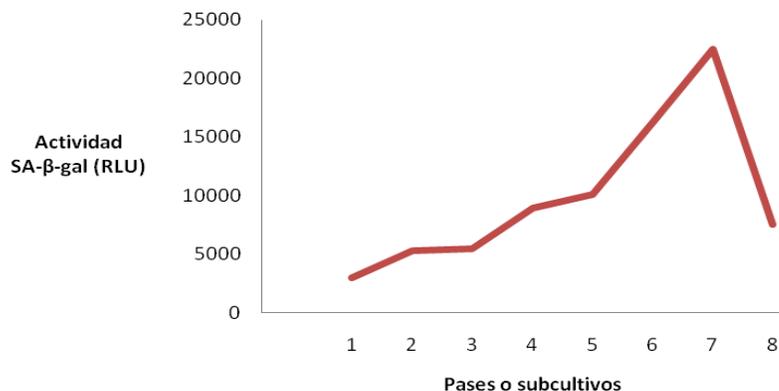
El análisis de varianza no paramétrico de Friedman arrojó diferencias significativas entre los rangos promedio de actividad SA-β-gal cuando se consideraron los seis, siete y ocho primeros pases (Ver Tabla 7.4).

Pases (p<0,001)	Rango promedio	Pases (p=0,002)	Rango promedio	Pases (p=0,015)	Rango promedio
1	1,71	1	2,00	1	1,75
2	2,36	2	2,91	2	2,00
3	3,21	3	3,73	3	4,25
4	4,29	4	4,45	4	5,75
5	4,86	5	5,45	5	5,75
6	4,57	6	5,09	6	7,50
		7	4,36	7	4,50
				8	4,50

**Tabla 7.4.- Rangos promedio de la actividad SA-β-gal normalizada, correspondientes a los análisis efectuados con los seis, siete y ocho primeros pases de los cultivos de células epiteliales ováricas.**

Los rangos promedios de la actividad SA- $\beta$ -gal entre los diferentes pases fueron comparados con la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de Friedman. Así, en los datos relativos a los seis primeros pases, se encontró que el rango de la actividad enzimática fue significativamente mayor en el pase cinco que en los pases uno, dos y tres ( $p < 0,05$ ) y que no hubo diferencias significativas entre los pases cinco y cuatro. Con relación al pase cuatro, el rango de la actividad SA- $\beta$ -gal fue también significativamente mayor, comparado con los pases uno y dos ( $p < 0,05$ ) y no hubo suficiente evidencia estadística para las diferencias entre dicho pase y el tres. Al tomar en cuenta los siete primeros pases, los rangos de la actividad SA- $\beta$ -gal en los pases cuatro, cinco y seis fueron significativamente mayores comparados con el pase uno, y en pase cinco con relación al pase dos ( $p < 0,05$ ). Analizando el conjunto de ocho pases, sólo se hallaron diferencias significativas entre el pase uno y el seis, con un rango de actividad enzimática mayor en este último pase ( $p < 0,05$ ).

*Fibroblastos.*- Los rangos de la actividad SA- $\beta$ -gal mostraron tendencia al aumento desde el primer pase hasta el sexto, para alcanzar un máximo en el siete, cuando se inició una notable disminución (Ver Figura 7.12).



**Figura 7.12.- Tendencia de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal en cultivos primarios de fibroblastos del estroma ovárico.**

El análisis de varianza no paramétrico de Friedman no arrojó diferencias significativas entre los rangos promedio de actividad SA- $\beta$ -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) (Ver Tabla 7.5).

<b>Pases <math>p=0,085</math></b>	<b>Rango promedio</b>
1	1,50
2	3,00
3	4,00
4	6,00
5	2,50
6	6,00
7	5,00
8	8,00

**Tabla 7.5.- Rangos promedio de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada en los ocho primeros pases de los cultivos de fibroblastos del estroma ovárico.**

*Comparación de la actividad SA- $\beta$ -gal entre células epiteliales y fibroblastos ováricos*

Con el fin de comparar los resultados relativos a la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada entre las células epiteliales y los fibroblastos estromales del ovario de la misma paciente en 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, con relación al mismo pase de los cultivos de células epiteliales ( $p=0,033$ ). En los pases dos y cinco, 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).

### **7.3.1.2. Muestra estratificada**

Debido a que las medias de la actividad SA- $\beta$ -gal entre grupos etarios, tanto en células epiteliales como en fibroblastos, no se ajustaron a una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney.

*Células epiteliales.*- El rango de la actividad enzimática en G2 fue significativamente mayor que en G1, en los pases uno ( $p=0,008$ ) y tres ( $p=0,014$ ), mientras que en los pases dos ( $p=0,061$ ), cuatro ( $p=0,091$ ) y cinco ( $p=0,129$ ), los rangos en G2 fueron mayores que en G1 y cercanos al nivel de significancia.

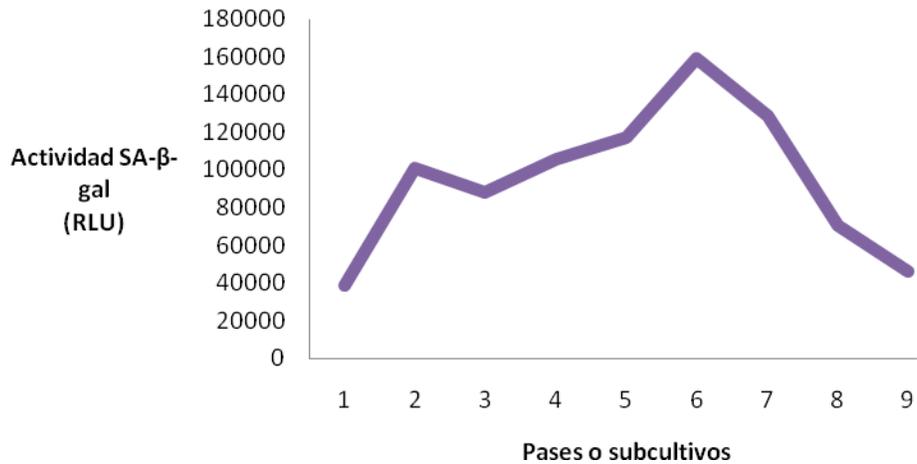
*Fibroblastos.*- Los rangos de la actividad enzimática no presentaron diferencias significativas entre grupos etarios.

### **7.3.2. Parte II**

Previa evaluación de normalidad con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk y de transformaciones con logaritmo natural en caso de distribución no normal, se examinó la actividad SA- $\beta$ -gal en los diferentes pases o subcultivos, primero con los resultados de la muestra poblacional no estratificada y segundo, con los de la muestra estratificada en dos grupos etarios:  $G1 \leq 36$  años y  $G2 \geq 37$  años.

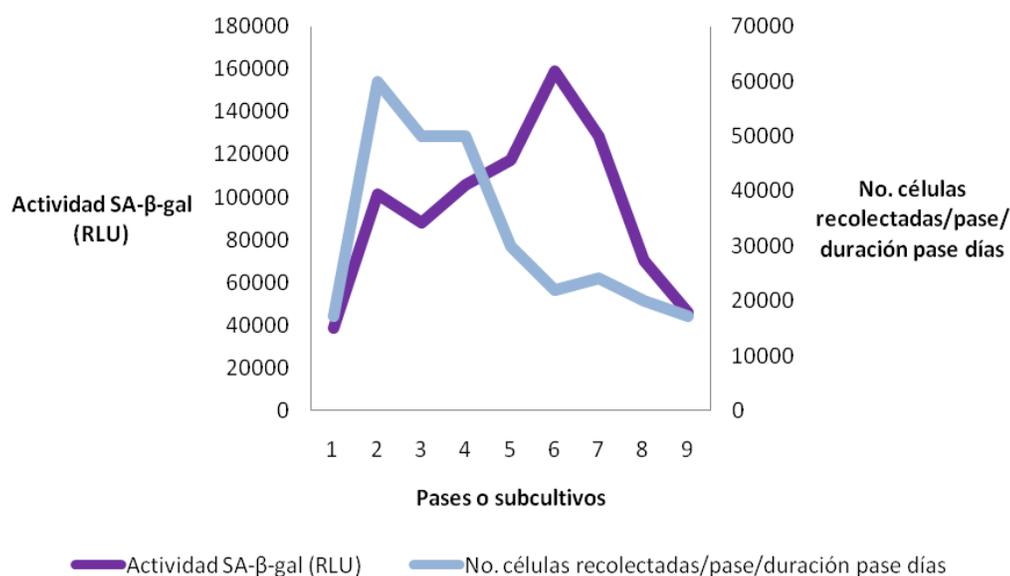
#### **7.3.2.1. Muestra no estratificada**

La figura 7.13 muestra la relación entre la actividad SA- $\beta$ -gal y la historia replicativa de los cultivos. Aunque con un incremento inicial al final del pase uno y parte del dos, la actividad enzimática presentó fluctuaciones a partir de este momento y hasta el pase cuatro. A partir del pase cuatro, durante el pase cinco y, en forma especialmente notoria durante el pase seis, ocurrió un aumento en la actividad enzimática, para después disminuir en los pases subsiguientes.



**Figura 7.13.- Tendencia de la distribución de las medianas de la actividad SA-β-gal en cultivos primarios de células epiteliales ováricas.**

Cuando se compararon las tendencias de la distribución de las medianas de la actividad SA-β-gal y de la población celular normalizada en cultivos primarios de células epiteliales ováricas (Ver Figura 7.14), se observó que el aumento en la actividad enzimática a partir del pase cuatro y hasta el seis, ocurrió en forma simultánea, primero con el inicio de la fase III, estacionaria o senescente (pase cuatro) - en la que la capacidad replicativa se mantuvo relativamente estable - y segundo, con la disminución de dicha capacidad durante los pases cinco a siete. A partir de este pase, es evidente la declinación tanto de la capacidad replicativa como de la actividad SA-β-gal.



**Figura 7.14.- Tendencias de la distribución de las medianas de la actividad SA-β-gal y de la población celular normalizada en cultivos primarios de células epiteliales ováricas.**

La actividad SA-β-gal a lo largo de los diferentes pases fue comparada mediante el análisis de varianza paramétrico de medidas repetidas y el no paramétrico de Friedman. Las diferencias entre las medias, obtenidas con el análisis de varianza paramétrico fueron a su vez comparadas con la prueba de comparaciones múltiples ajustada por Bonferroni, mientras que las diferencias entre los rangos promedio obtenidas con el análisis de varianza no paramétrico de Friedman lo fueron con la prueba de comparaciones múltiples de Friedman.

El análisis de varianza no paramétrico de Friedman, cuando se consideraron los seis y los siete primeros pases mostró diferencias significativas entre los rangos promedio de la actividad enzimática de cada pase ( $p < 0,001$ ), mientras que, para los ocho primeros pases no hubo diferencias significativas ( $p = 0,064$ ) (Ver Tabla 7.6).

Pases $p < 0,001$	Rango promedio	Pases $p < 0,001$	Rango promedio	Pases $p = 0,064$	Rango promedio
1	2,45	1	2,79	1	2,00
2	3,35	2	3,74	2	3,29
3	3,50	3	4,00	3	4,00
4	3,35	4	3,68	4	5,57
5	3,80	5	4,16	5	5,86
6	4,55	6	5,21	6	7,00
		7	4,42	7	4,43
				8	3,86

**Tabla 7.6.- Rangos promedio de la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada, correspondientes a los análisis efectuados con los seis, siete y ocho primeros pases de los cultivos de células epiteliales ováricas.**

La prueba de comparaciones múltiples de Friedman mostró que hubo diferencias significativas en los rangos promedios de actividad SA- $\beta$ -gal entre el primero y el sexto pase, cuando se consideraron los seis, siete y ocho pases respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Previa transformación con logaritmo natural, se encontró que las medias de la actividad SA- $\beta$ -gal a lo largo de los pases se ajustaban a una distribución normal, motivo por el cual se efectuó un análisis de varianza paramétrico multivariado de medidas repetidas. Se hallaron diferencias significativas entre los seis y siete primeros pases ( $p = 0,025$  y  $p = 0,021$ , respectivamente) (Ver Tablas 7.7 y 7.8)

Pases	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
1	10,83	0,25	10,31	11,36
2	11,23	0,30	10,60	11,85
3	11,38	0,22	10,92	11,84
4	11,33	0,19	10,92	11,73

5	11,52	0,23	11,04	12,01
6	11,96	0,28	11,36	12,55
7	11,84	0,30	11,20	12,47

**Tabla 7.7.- Medias marginales estimadas de la actividad SA- $\beta$ -gal en los siete primeros pases de los cultivos de células epiteliales ováricas.**

Pases	Edad	N	Media	Desviación estándar	Error estándar de la media
1	$\leq 36$	6	10,67	1,00	0,41
	$\geq 37$	23	10,32	1,78	0,37
2	$\leq 36$	6	11,45	0,90	0,37
	$\geq 37$	21	11,10	1,28	0,28
3	$\leq 36$	6	11,55	0,63	0,26
	$\geq 37$	19	11,08	1,05	0,24
4	$\leq 36$	5	10,97	0,64	0,29
	$\geq 37$	18	11,41	0,83	0,19
5	$\leq 36$	5	11,05	0,68	0,31
	$\geq 37$	18	11,75	1,08	0,25
6	$\leq 36$	5	11,93	1,69	0,76
	$\geq 37$	15	12,05	1,11	0,29
7	$\leq 36$	5	11,97	1,19	0,53
	$\geq 37$	14	11,79	1,40	0,37
8	$\leq 36$	2	11,48	1,52	1,07
	$\geq 37$	5	11,18	0,75	0,33
9	$\leq 36$	1	9,92	-	-
	$\geq 37$	4	10,84	0,56	0,28

**Tabla 7.8.- Estadísticos descriptivos de la actividad SA- $\beta$ -gal en cultivos primarios de células epiteliales ováricas, previa transformación con logaritmo natural.**

La prueba de comparaciones múltiples por ajuste de Bonferroni mostró que, cuando se consideraron los seis primeros países, hubo diferencias significativas en las medias de la actividad SA- $\beta$ -gal entre los países uno y seis ( $p=0,023$ ) mientras que, cuando se tomaron en cuenta los siete primeros países, las diferencias entre ambos países estuvieron cerca del nivel de significancia establecido ( $p=0,067$ ) (Ver Tablas 7.9 y 7.10).

**A.**

Países	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
1	10,77	0,25	10,25	11,29
2	11,25	0,28	10,66	11,85
3	11,40	0,21	10,96	11,83
4	11,35	0,19	10,96	11,74
5	11,58	0,23	11,10	12,05
6	12,02	0,28	11,45	12,60

**B.**

(I) País	(J) Países	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación(a)	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a)	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
1	2	-0,482	0,285	1,000	-1,437	0,474
	3	-0,625	0,285	0,608	-1,580	0,329
	4	-0,578	0,294	0,960	-1,565	0,408
	5	-0,805	0,301	0,224	-1,814	0,204
	6	-1,251(*)	0,339	0,023	-2,387	-0,115

**Tabla 7.9.- A. Estimación de las medias, desviación estándar e intervalos de confianza de 95% de la actividad SA-β-gal, cuando se consideraron los seis primeros pases de los cultivos primarios de células epiteliales ováricas. B. Comparación entre el pase uno y el seis (celda sombreada)**

**A**

Pases	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
1	10,83	0,25	10,31	11,36
2	11,23	0,30	10,60	11,85
3	11,38	0,22	10,92	11,84
4	11,33	0,19	10,92	11,73
5	11,52	0,23	11,04	12,01
6	11,96	0,28	11,36	12,55
7	11,84	0,30	11,20	12,47

**B**

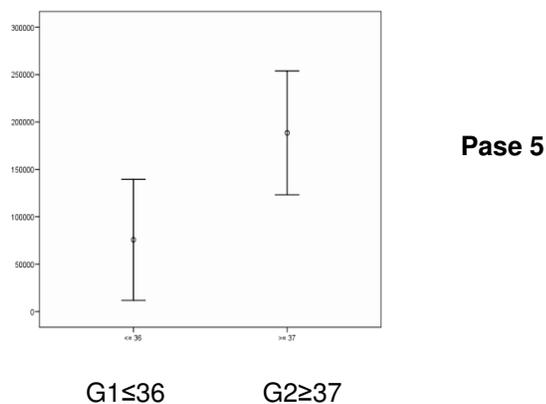
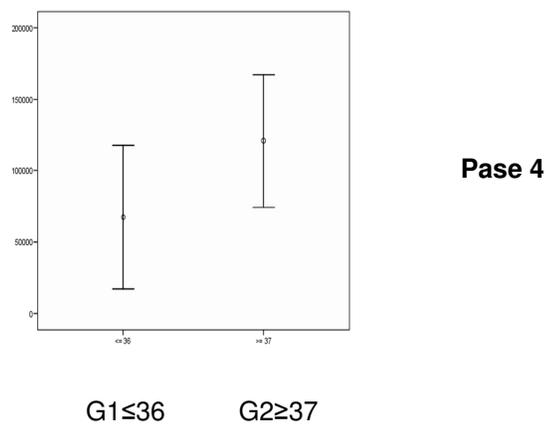
(I) Pase	(J) Pases	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación(a)	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a)	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
<b>1</b>	<b>2</b>	-0,392	0,285	1,000	-1,398	0,615
	<b>3</b>	-0,546	0,288	1,000	-1,564	0,471
	<b>4</b>	-0,491	0,296	1,000	-1,537	0,555
	<b>5</b>	-0,690	0,293	0,630	-1,725	0,345
	<b>6</b>	-1,123	0,330	0,067	-2,290	0,044
	<b>7</b>	-1,003	0,361	0,262	-2,279	0,274

**Tabla 7.10.- A. Estimación de las medias, desviación estándar e intervalos de confianza de 95% de la actividad SA-β-gal, cuando se consideraron los siete**

**primeros pases de los cultivos primarios de células epiteliales ováricas. B. Comparación entre el pase uno y el seis (celda sombreada)**

**7.3.2.2. Muestra estratificada**

Se hallaron diferencias significativas entre las medias de la actividad SA- $\beta$ -gal de los dos grupos etarios, únicamente en los pases cuatro y cinco. En razón de que los resultados presentaron distribución normal, la prueba paramétrica aplicada fue t-student, la que permitió determinar que, tanto en el pase cuatro como en el cinco, la actividad enzimática en G2 fue significativamente mayor que en G1 ( $p=0,04$  y  $p=0,004$  respectivamente) (Ver Figura 7.15).

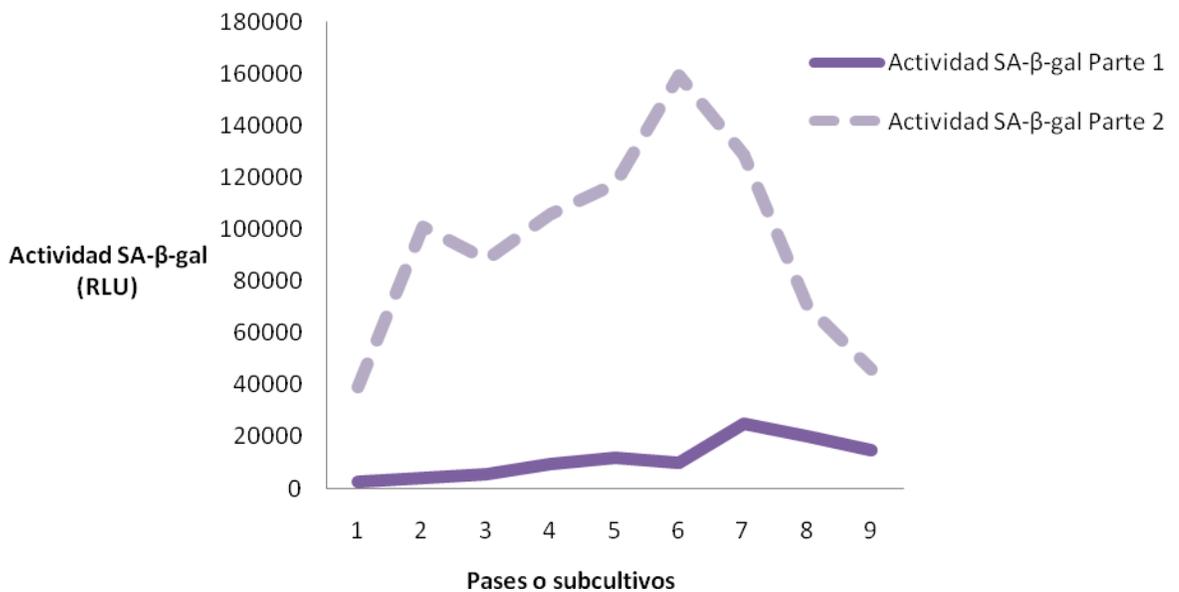


**Figura 7.15.- Comparación de los intervalos de confianza de 95% de los promedios de la actividad SA- $\beta$ -gal en dos grupos etarios, en los pases cuatro y cinco de los cultivos primarios de células epiteliales ováricas.**

### 7.3.3. Comparación de la actividad SA-β-gal de las células epiteliales entre las dos partes del estudio

Con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney se compararon los rangos de la actividad SA-β-gal entre las dos muestras independientes de células epiteliales de la primera y segunda parte del estudio. Las muestras analizadas correspondieron a las no estratificadas por grupos etarios.

Así, se hallaron diferencias significativas (Ver Figura 7.16), de modo que la actividad SA-β-gal fue significativamente mayor en la muestra correspondiente a la segunda parte, cuando se consideraron los seis ( $p < 0,001$ ) y los siete primeros pases ( $p = 0,003$ ) (Ver Tabla 7.11).



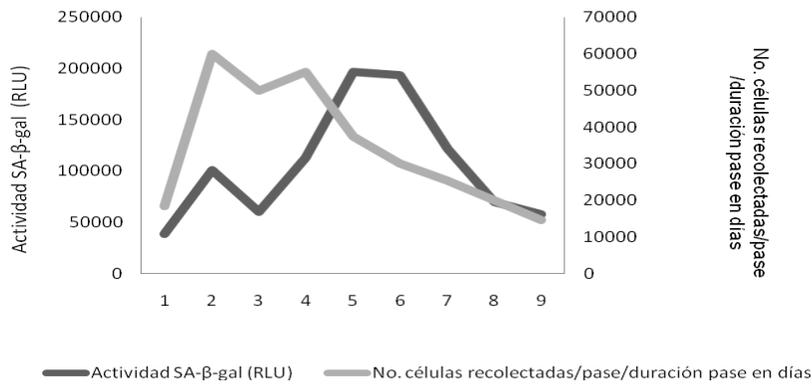
**Figura 7.16.- Tendencias de la distribución de las medianas de la actividad SA-β-gal en las muestras no estratificadas de las dos partes del estudio.**

Parte	Estadístico	Actividad SA-β-gal										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Media	13585,68	53048,18	189197,90	24892,94	70978,61	35010,17	122647,40	87841,67	80032,81	17042,21	32484,99
	DS	43623,44	257493,34	1077877,43	35675,26	166346,20	60722,65	245645,27	141536,18	138524,71	11818,80	.
	Mediana	2597,46	4022,59	5449,45	9647,42	11726,33	9956,64	25182,63	19996,36	14644,77	17042,21	32484,99
	N	40	33	37	35	26	22	18	9	4	2	1
2	Media	76815,92	133312,59	113158,36	109359,15	164063,24	365338,87	282579,30	108596,48	49423,28	50850,80	9707,20
	DS	11737,453	162231,39	131312,97	87129,47	126932,04	608092,20	329368,87	95241,50	28600,52	9165,68	.
	Mediana	38925,33	101096,21	88267,39	105512,40	117197,36	159246,88	128770,16	70147,67	46130,78	50850,80	9707,20
	N	29	27	25	23	23	20	19	7	5	2	1
Total	Media	40160,71	89167,16	158536,80	58388,16	114671,39	192309,55	204774,60	96921,90	63027,52	33946,50	21096,10
	DS	88049,19	221766,95	832984,06	73664,62	154917,10	448474,52	298837,66	120105,98	88685,78	21344,12	16106,33
	Mediana	7860,24	15401,92	19225,23	28406,46	41559,14	47219,64	49752,59	40983,92	24282,47	34884,52	21096,10
	N	69	60	62	58	49	42	37	16	9	4	2

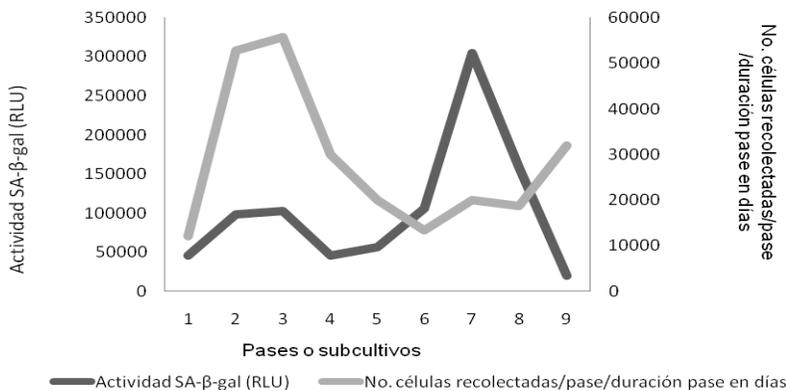
**Tabla 7.11.- Estadísticos descriptivos (media, mediana y desviación estándar) de la actividad SA-β-gal en los diferentes pases de los cultivos de células epiteliales ováricas en las dos partes del estudio (N: No. de muestras)**

### 7.3.4. Inicio de la senescencia y edad de las donantes

Cuando se observaron las curvas de actividad SA- $\beta$ -gal y de población celular normalizada en G1, se pudo apreciar que, a partir del pase cuatro, las tendencias de distribución de las medianas de ambos factores describieron un comportamiento antagónico pues, mientras es notorio el aumento de la actividad enzimática hasta alcanzar un pico en el pase siete, la población celular normalizada continúa el descenso que inició desde el comienzo del pase cuatro. Con relación a G2, dicha divergencia aparece en el pase tres, como lo indica la elevación de la actividad enzimática y el descenso simultáneo de la población celular normalizada durante dicho pase (Ver Figura 7.17).



**A.G1**

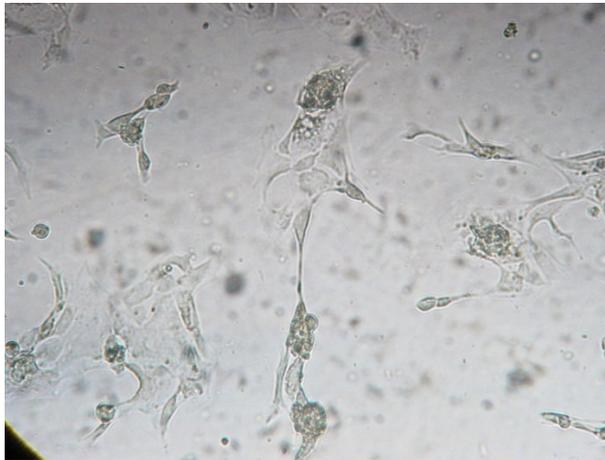


**B. G2**

**Figura 7.17.- Tendencias de la distribución de las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal y de la población celular normalizada de las células epiteliales ováricas cultivadas, en los dos grupos etarios: A. G1. B. G2.**

#### 7.4. Inducción de senescencia

Con posterioridad al tratamiento inductor de senescencia aplicado a fibroblastos y a células epiteliales ováricas (durante la primera y la segunda parte del estudio, respectivamente) con  $H_2O_2$  y de haberlos cultivado durante cinco días más en medio carente del agente oxidante, se observó al 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- $\beta$ -gal de las células epiteliales y de los fibroblastos no inducidos (Ver Figura 7.1).



**Figura 7.18.- Fibroblastos inducidos a senescencia.** Cuando este tipo de células son inducidas a senescencia, abandonan su forma ahusada para adoptar la típica morfología aplanada, con procesos celulares elongados y numerosos autofagolisosomas que evidencian activación de las vías de autofagia.

Aunque la gran mayoría de las células epiteliales inducidas a senescencia en la parte II del estudio exhibieron valores elevados de actividad enzimática, algunas mostraron valores aún más bajos que los de las células normales (Ver Tabla 7.12). Estas células inducidas fueron utilizadas como control positivo en los ensayos de actividad SA- $\beta$ -gal en la parte correspondiente del estudio.

Cultivo	Inducidas a senescencia	No inducidas
78 Pase 1	44038,74	30973,85
78 Pase 2	175540,65	110559,41
78 Pase 3	240130,00	141957,88
78 Pase 4	140823,07	25417,30

54 Pase 2	27269,60	21173,39
54 Pase 3	86314,90	60172,08
54 Pase 4	94395,46	42762,72
54 Pase 5	9897,95	41559,14

55 Pase 1	1355,96	59276,84
55 Pase 2	16236,62	103716,56
55 Pase 3	7004,09	135127,91
55 Pase 4	7905,79	142917,50

**Tabla 7.12.- Actividad SA- $\beta$ -gal en células epiteliales inducidas a senescencia y sus correspondientes no inducidas.** En un número considerable de cultivos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad enzimática aumentó con relación a la de los correspondientes cultivos que no fueron tratados con el agente oxidante (celdas sombreadas), por ejemplo en los cuatro primeros pases del cultivo 78. En algunos, como 54, la actividad enzimática aumentó sólo en ciertos pases, mientras que en otros cultivos como 55, la actividad SA- $\beta$ -gal fue menor que la de los cultivos no tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 7.5. Cuantificación de la expresión de hTERT y TRF2

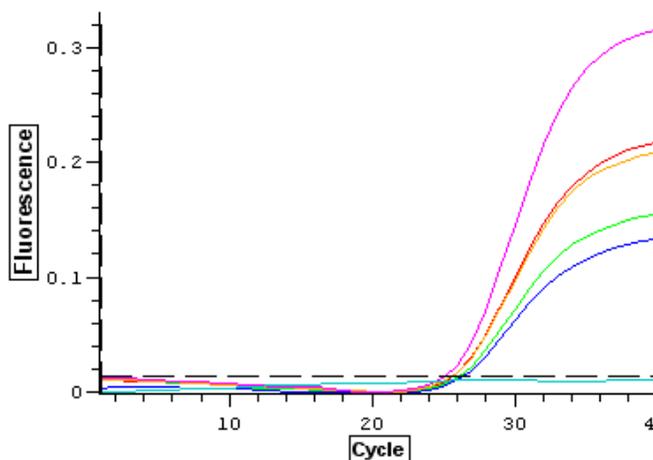
- ***Cuantificación y verificación de la integridad del ARN***

Previo tratamiento con ADNasa I, se cuantificó y verificó la integridad del ARN extraído de las células en cultivo, mediante espectrofotometría y gel de agarosa denaturalizante. Así, después de cuantificarlo y de calcular la razón entre las

absorbancias a 260 y a 280 nm, fueron seleccionados sólo aquellos ARN con un mínimo de 500 ng de masa y con una razón de absorbancias entre 1,8 y 2. Este procedimiento obligó a descartar las muestras que no cumplieron dichas condiciones, de modo que el tamaño de muestra de donantes se redujo de 28 a 22, con un promedio de seis pases examinados para cada una. En algunos cultivos hubo pases en los que el material recolectado no fue suficiente para hacer los análisis.

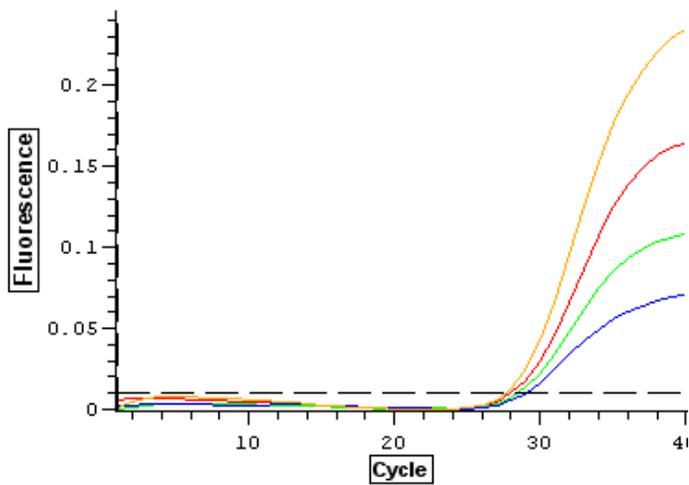
- **Estandarización de las condiciones de la qPCR**

Se llevaron a cabo ensayos de estandarización de la amplificación de los genes hTERT, TRF2 y GAPDH con un gradiente de temperatura (entre 56°C y 62°C), con el fin de establecer la temperatura óptima para el anillamiento de los primers y de verificar su especificidad. Los resultados mostraron que para hTERT fue 60°C (Ver Figura 7.19), mientras que para TRF2 y GAPDH fue 59°C (Ver Figuras 7.20 y 7.21). La lectura de la fluorescencia del producto amplificado de hTERT se efectuó a 80°C.



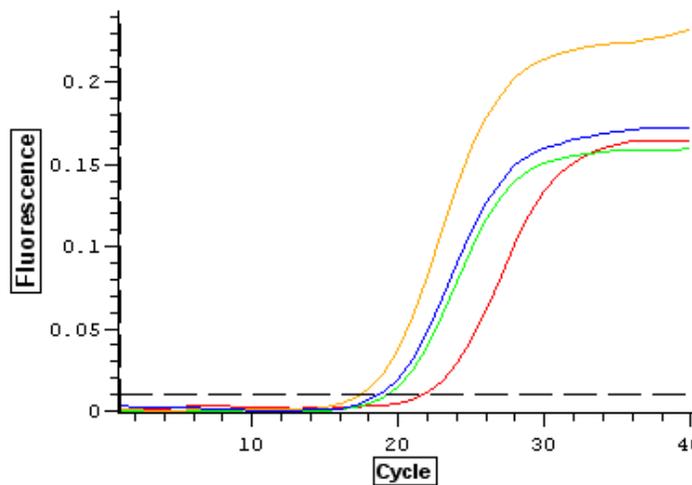
Temperatura (°C)	CT
56	25,608
59	26,108
60	25,107
61	25,557
62	26,361
Control negativo	Ninguno

**Figura 7.19.- Fluorescencia emitida por los productos de amplificación de hTERT bajo condiciones de un gradiente de temperatura.**



Temperatura (°C)	CT
56	28,028
59	27,630
60	28,448
62	29,042
Control negativo	Ninguno

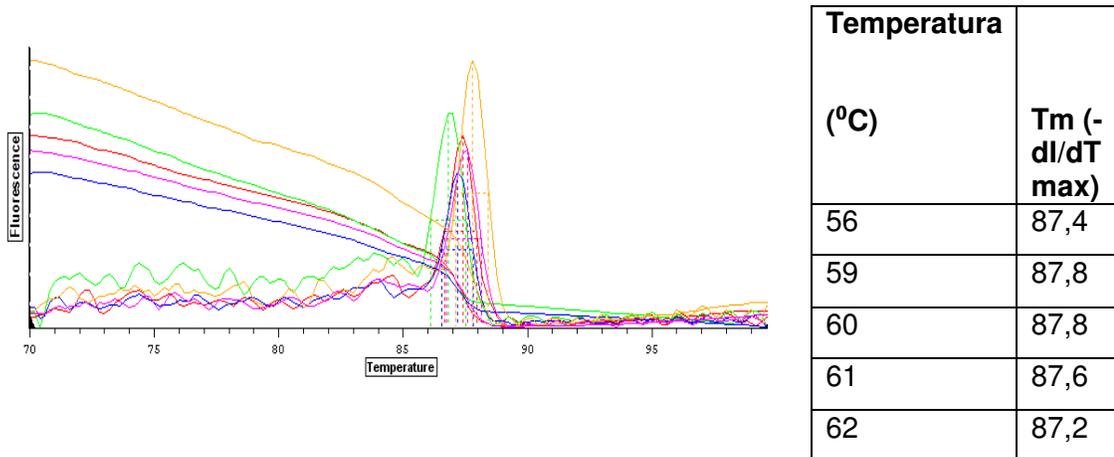
Figura 7.20.- Fluorescencia emitida por los productos de amplificación de TRF2 bajo condiciones de un gradiente de temperatura.



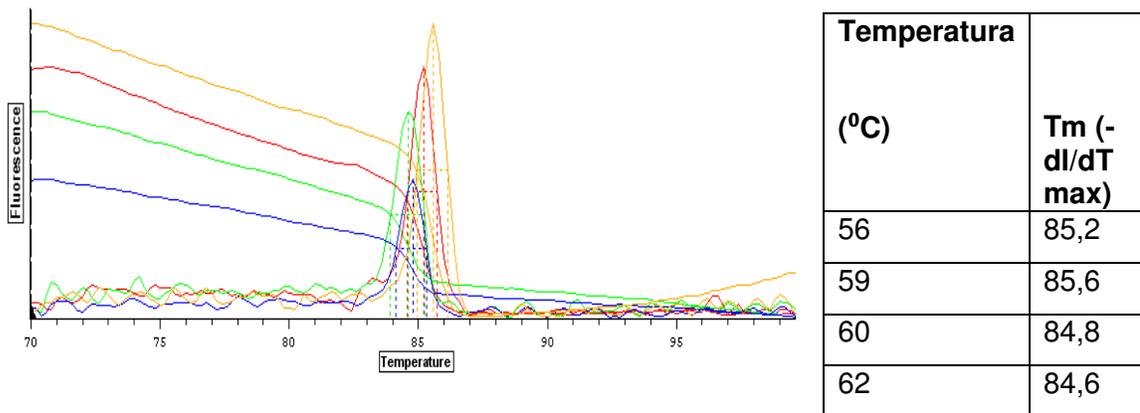
Temperatura (°C)	C(T)
56	21,711
59	17,436
62	18,720
60	19,267
Control negativo	Ninguno

Figura 7.21.- Fluorescencia emitida por los productos de amplificación de GAPDH bajo condiciones de un gradiente de temperatura.

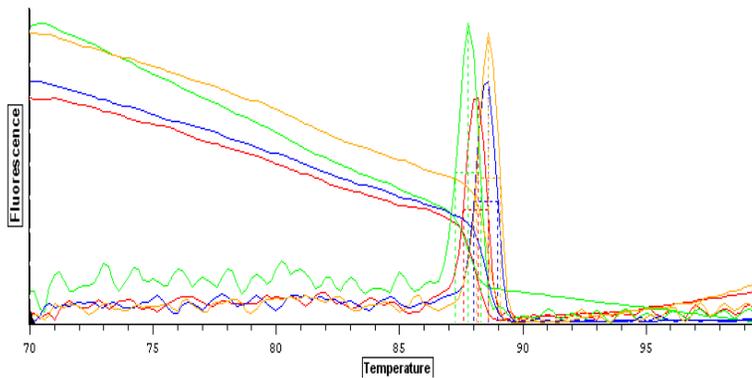
Las curvas de melting correspondientes a cada producto amplificado mostraron un único pico, lo que indica que los primers anillaron sobre regiones específicas de cada uno de los genes analizados (Ver Figuras 7.22, 7.23 y 7.24).



**Figura 7.22.-** Curvas de melting de hTERT generadas bajo un gradiente de temperatura.



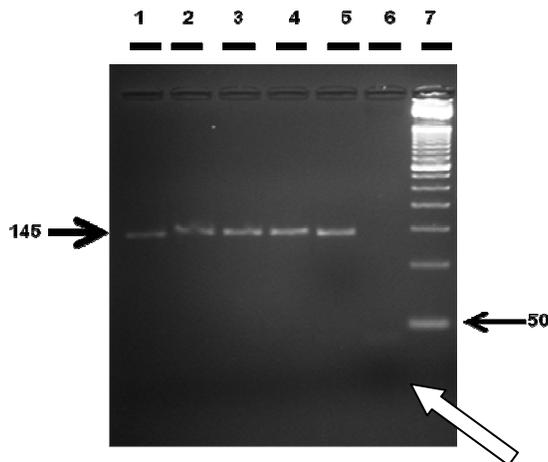
**Figura 7.23.-** Curvas de melting de TRF2 generadas bajo un gradiente de temperatura.



Temperatura (°C)	Tm (-dl/dT max)
56	88,2
59	87,8
62	88,6
60	88,6

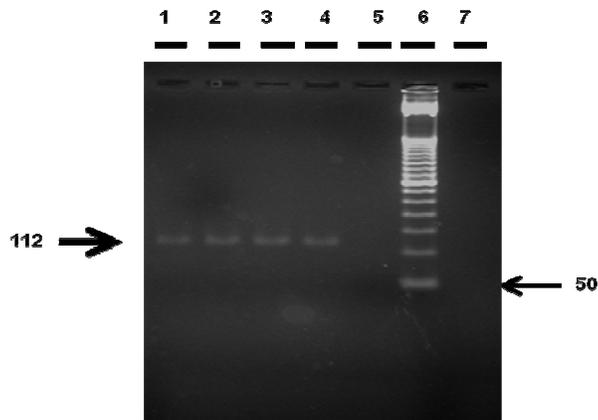
**Figura 7.24.- Curvas de melting de GAPDH generadas bajo un gradiente de temperatura.**

En adición a las curvas de melting generadas bajo un gradiente de temperatura para verificar la amplificación de un solo producto, el ADNc plasmídico y el obtenido a partir de fibroblastos de cordón umbilical fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 3%, lo que permitió comprobar que los productos amplificados correspondientes a hTERT, TRF2 y GAPDH presentaban el tamaño esperado (Ver Figuras 7.25, 7.26 y 7.27).

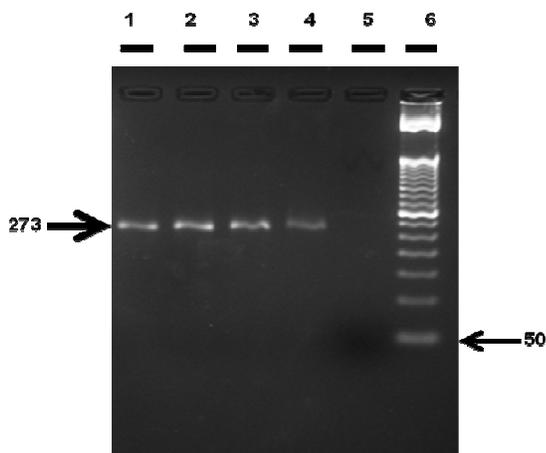


**Figura 7.25.- Visualización del producto amplificado de hTERT sobre gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.** En los carriles 1 a 5 se observa el producto de amplificación de hTERT, bajo condiciones de temperatura de 56°C, 59°C, 60°C, 61°C y 62°C, respectivamente. El carril 6 corresponde al control negativo y el 7 al marcador de peso molecular. En el carril 6 se observa una banda muy tenue, que

corresponde a un dímero de primers, aproximadamente a 40 pb, un poco por debajo de la primera banda del marcador de peso molecular (ver flecha).



**Figura 7.26.- Visualización del producto amplificado de TRF2 sobre gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.** En los carriles 1 a 4 se observa el producto de amplificación de TRF2, bajo condiciones de temperatura de 56°C, 59°C, 60°C y 62°C respectivamente. El carril 5 corresponde al control negativo y el 6 al marcador de peso molecular.

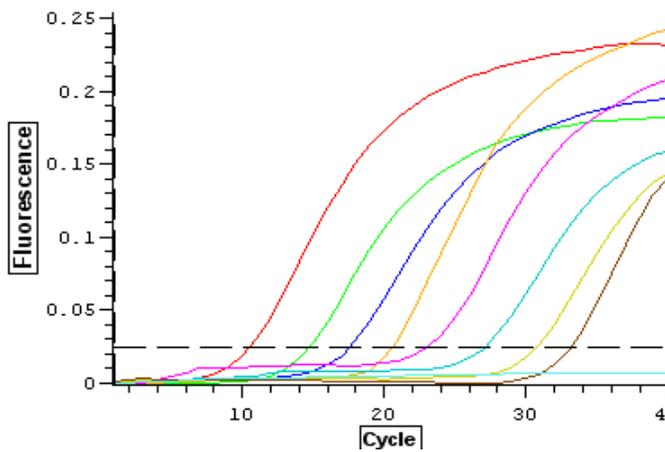


**Figura 7.27.- Visualización del producto amplificado de GAPDH sobre gel de agarosa al 3% con bromuro de etidio.** En los carriles 1 a 4 se observa el producto de amplificación de GAPDH, bajo condiciones de temperatura de 56°C, 59°C, 60°C y 62°C respectivamente. El carril 5 corresponde al control negativo y el 6 al marcador de peso molecular.

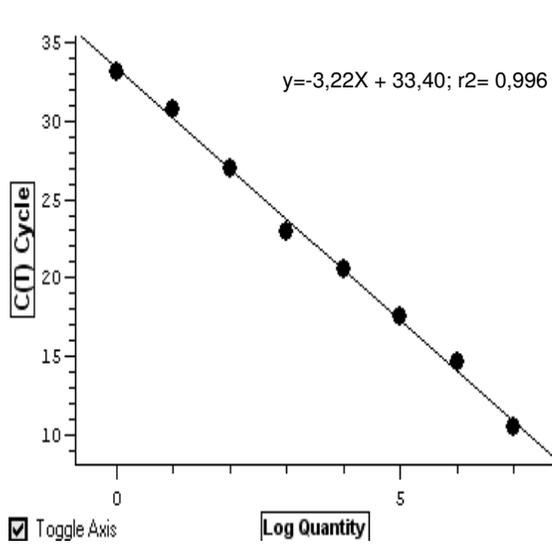
- **Curvas de eficiencia**

- *hTERT*

Como se puede apreciar en la figura 7.28, a medida que aumentó la dilución del ADNc plasmídico, también aumentó el ciclo de detección de la amplificación. Por tanto, de acuerdo con lo observado en la figura 7.29, el número de copias de hTERT y el CT están correlacionados linealmente en forma inversa. El límite de detección de hTERT fue 63 moléculas, para un CT de 33. La figura 7.30 muestra que, para cada dilución de ADNc plasmídico hubo un solo pico de fluorescencia, lo que evidencia que los primers anillaron en regiones específicas y que hTERT amplificó en forma exclusiva.

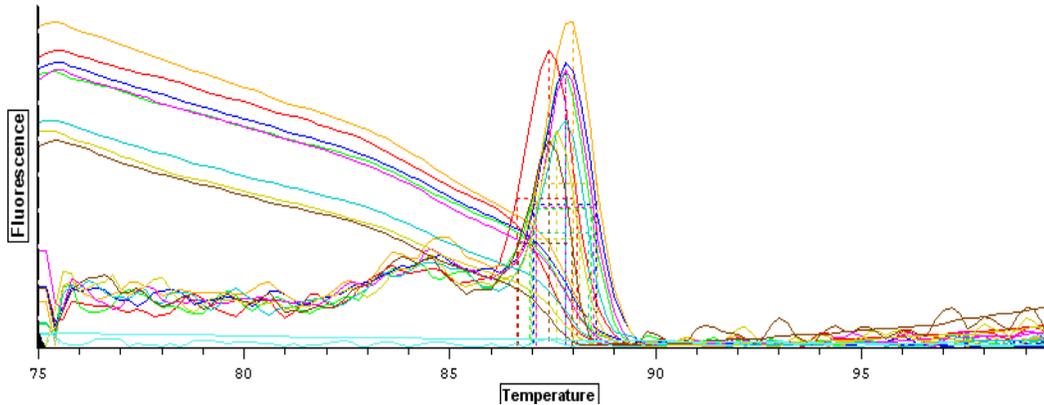


**Figura 7.28.- Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de la amplificación de hTERT, correspondientes a las diluciones seriadas del plásmido, y el ciclo umbral de detección (CT) de amplificación para cada una.**



Dilución (moléculas/ul)	CT
$6,365 \times 10^8$	10,474
$6,365 \times 10^7$	14,635
$6,365 \times 10^6$	17,484
$6,365 \times 10^5$	20,582
$6,365 \times 10^4$	22,889
$6,365 \times 10^3$	27,019
$6,365 \times 10^2$	30,714
63,65	33,123
Blanco	Ninguno

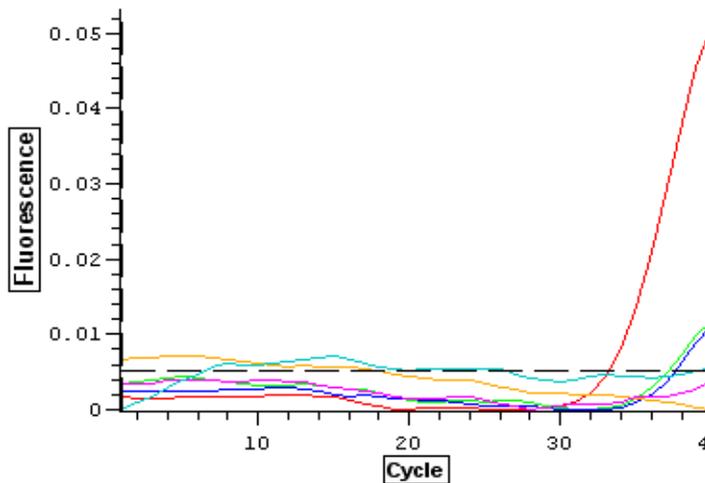
**Figura 7.29.- Curva de eficiencia de hTERT.** Correlación lineal entre el logaritmo del número de moléculas de ADN plasmídico amplificadas y el ciclo umbral de detección de la amplificación (CT). Se observa que a un mayor número de copias del gen, lo que corresponde a una menor dilución, el CT es más bajo.



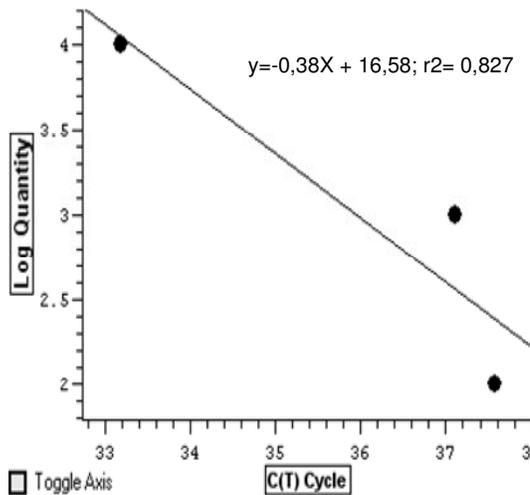
**Figura 7.30.- Curvas de melting de hTERT para cada una de las diluciones de ADNc plasmídico.** Cada curva representa la cinética de disociación de los fragmentos amplificados de hTERT para cada una de las diluciones (Tm entre 87,4°C y 87,8°C).

- Límite inferior de detección para hTERT

La determinación de un límite inferior de detección para hTERT se efectuó con base en la observación de que cuando se procesaron las muestras de células epiteliales en distintos pases de cultivo, no obstante la gran mayoría no amplificó para hTERT, hubo unas pocas en las sí se produjo amplificación, aunque los CTs estuvieron por encima de 33, que corresponde al último ciclo incluido en la curva de eficiencia. Fue así como se obtuvo un mayor número de diluciones seriadas, preparadas a partir de la mayor dilución de ADNc plasmídico que previamente había amplificado. Los resultados mostraron que puede haber detección de la amplificación más allá del ciclo 33 (Ver Figura 7.31) aunque, como se aprecia en la Figura 7.32, no existe correlación lineal entre el nivel de fluorescencia en el momento de la detección y el número de moléculas amplificadas, lo que hace que dicho cálculo no sea factible, a diferencia de lo que ocurrió con las diluciones utilizadas para la elaboración de la anterior curva de eficiencia. No obstante haber reducido la cantidad de primers utilizados, aparecieron picos de fluorescencia a temperaturas inferiores a 80°C, indicativos de presencia de dímeros.

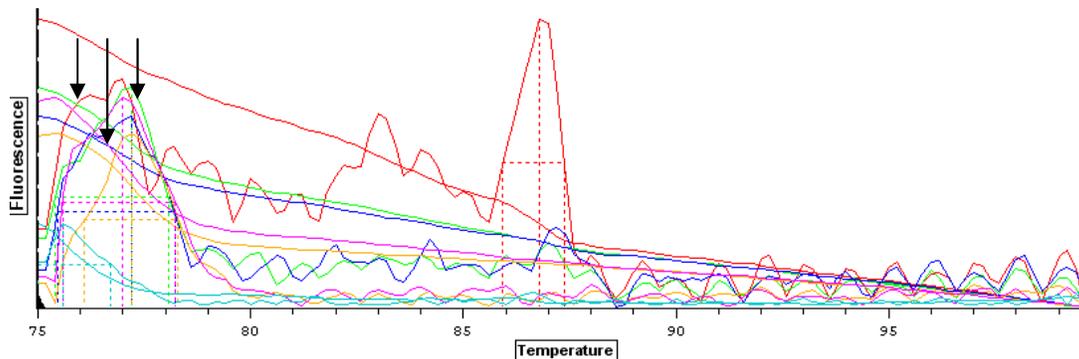


**Figura 7.31.- Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de la amplificación de hTERT y los ciclos umbrales de detección de la amplificación (CT), para diluciones de ADNc plasmídico mayores a las examinadas en la curva de eficiencia.**



Dilución (moléculas/ul)	CT
63	33,191
6,3	37,116
0,63	37,569
0,063	Ninguno
0,0063	Ninguno
Blanco	Ninguno

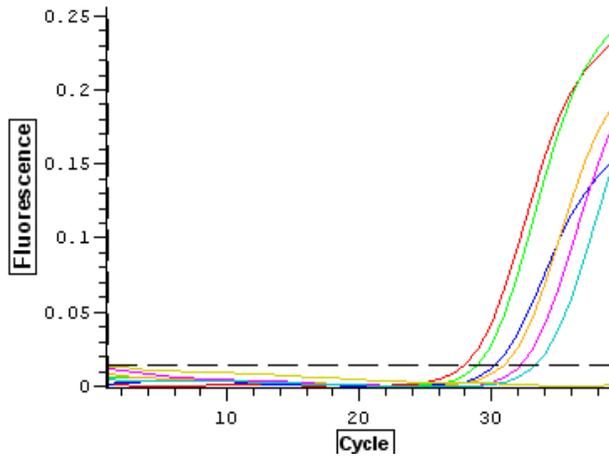
**Figura 7.32.- Relación entre el logaritmo del número de moléculas de hTERT amplificadas a partir de cada dilución de ADNc y el ciclo umbral de detección (CT).** El límite inferior de detección fue 0,63 moléculas, para un CT de 37.



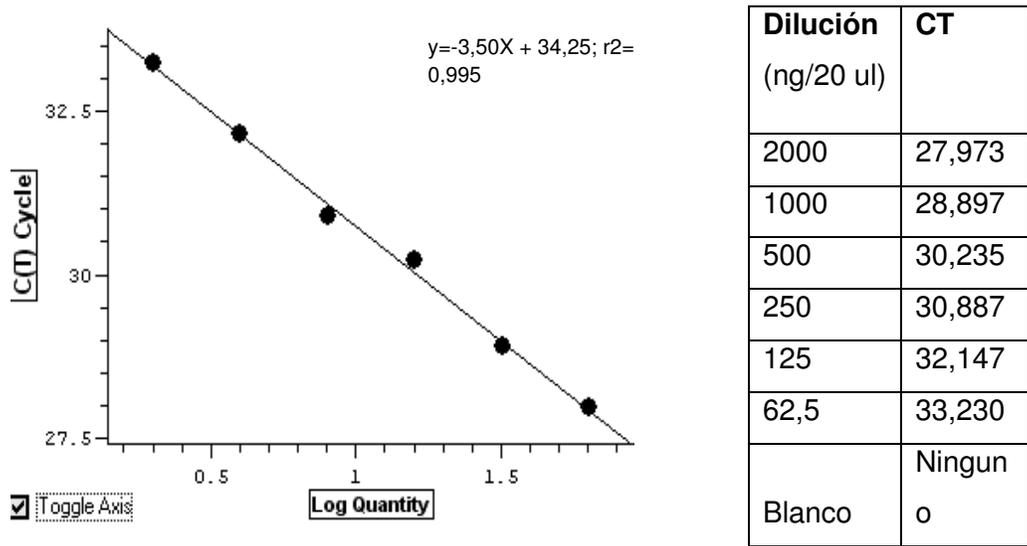
**Figura 7.33.- Curvas de melting de hTERT.** Cada curva representa la cinética de disociación de los fragmentos amplificados de hTERT, correspondientes a las diluciones seriadas de ADNc plasmídico adicionales a las examinadas en la anterior curva de eficiencia ( $T_m$  entre 87,4°C y 87,8°C). A temperaturas inferiores a 80°C se observan picos que indican la formación de dímeros (flechas a la izquierda de la figura). La lectura de la fluorescencia después de cada ciclo se efectuó a 80°C, muy por encima de la  $T_m$  de los primers.

- *TRF2*

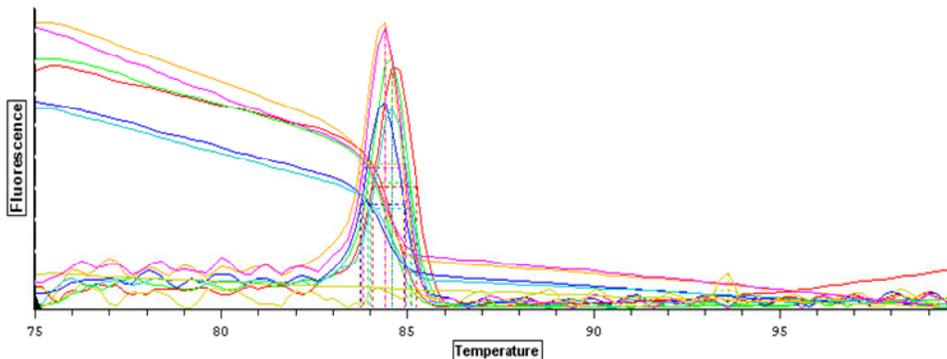
Como se puede observar en las figuras 7.34 y 7.35, las diluciones seriadas de ADNc de fibroblastos de cordón umbilical amplificaron en presencia de los primers utilizados, y cada una de ellas generó un nivel de fluorescencia diferente y cuantificable. A un mayor logaritmo de la concentración del ADNc, aumentó el tiempo de detección de la amplificación y el CT fue por tanto mayor. En las curvas de melting (Ver Figura 7.36) se verificó que, para cada dilución del ADNc, hubiese un solo pico de fluorescencia, confirmatorio de la especificidad de los primers y de la amplificación exclusiva de TRF2.



**Figura 7.34.- Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de amplificación de TRF2, correspondientes a las diluciones seriadas del ADNc obtenido a partir de los fibroblastos de cordón umbilical y el ciclo umbral de detección (CT).**



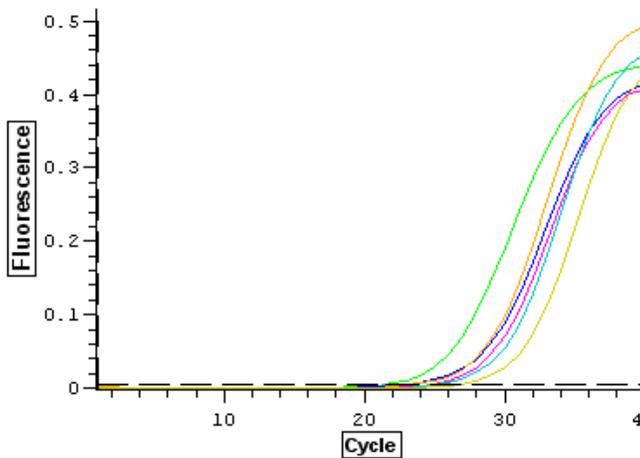
**Figura 7.35.- Curva de eficiencia de TRF2.** Correlación lineal entre logaritmo de la concentración del ADNc obtenido a partir de fibroblastos de cordón umbilical y ciclo umbral de detección de la amplificación del gen (CT).



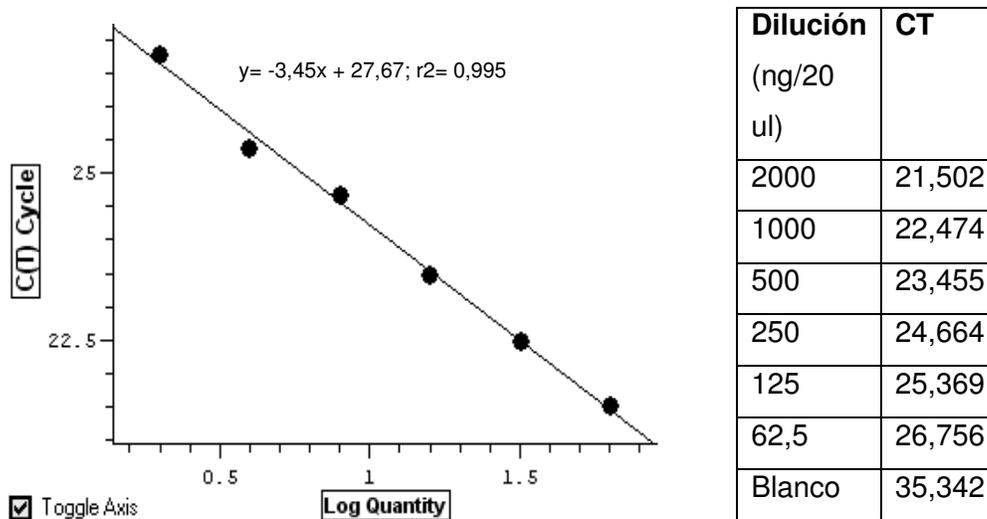
**Figura 7.36.- Curvas de melting de TRF2.** Cada curva representa la cinética de disociación de los fragmentos amplificados de TRF2, correspondientes a las diluciones seriadas de ADNc proveniente de fibroblastos obtenidos a partir de cordón umbilical ( $T_m$  entre 84,6°C y 86,6°C).

- *GAPDH*

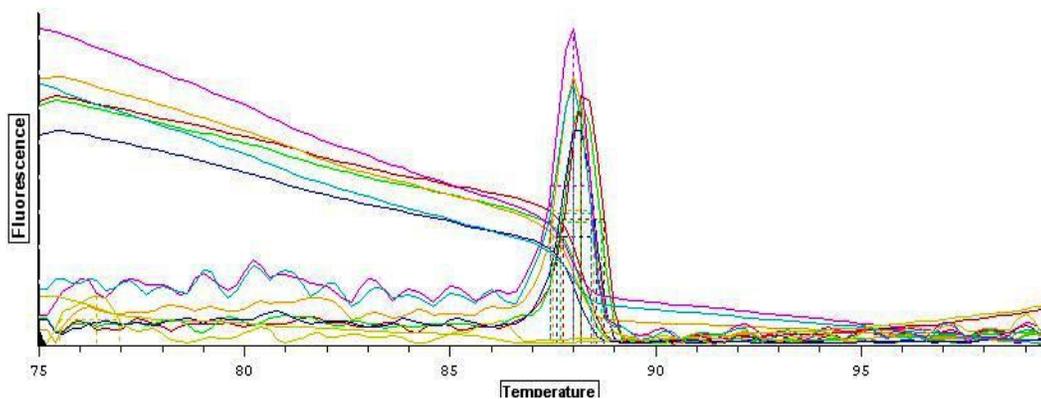
En forma semejante a lo ocurrido con TRF2, cada dilución de GAPDH dio origen a un nivel específico de fluorescencia, detectable a un determinado CT (Ver Figura 7.37). Igualmente, a medida que aumentó la concentración del ADNc, disminuyó el ciclo umbral de detección de la amplificación (Ver Figura 7.38). La especificidad de los primers y la consecuente amplificación de GAPDH fueron confirmadas con la generación de curvas de melting específicas para cada una de las diluciones analizadas (Ver Figura 7.39).



**Figura 7.37.- Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de la amplificación de GAPDH -correspondientes a las diluciones seriadas del ADNc obtenido a partir de fibroblastos de cordón umbilical- y el ciclo umbral de detección (CT).**



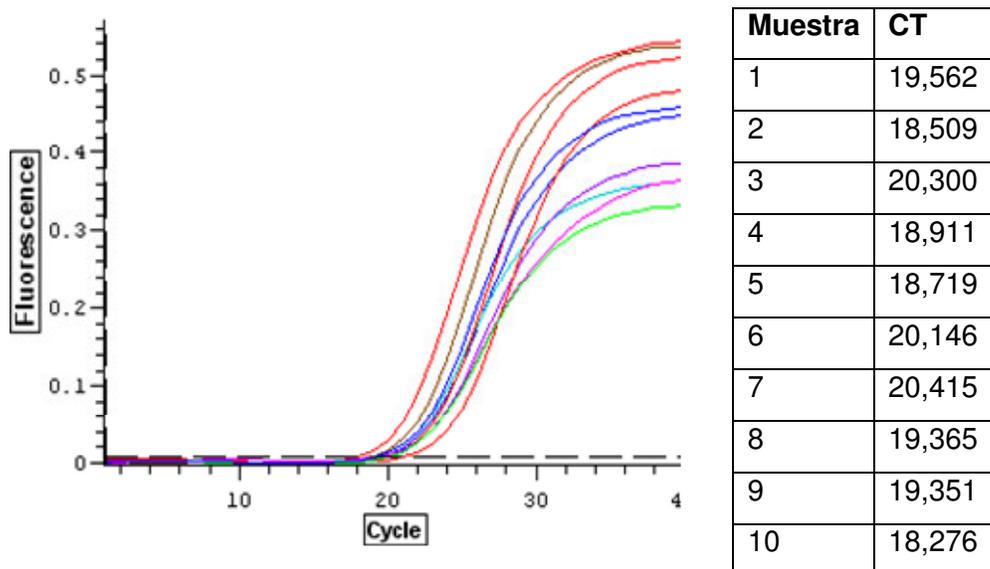
**Figura 7.38.- Curva de eficiencia de GAPDH.** Correlación lineal entre logaritmo de la concentración de ADNc de fibroblastos de cordón umbilical y ciclo umbral de detección de la amplificación del gen (CT).



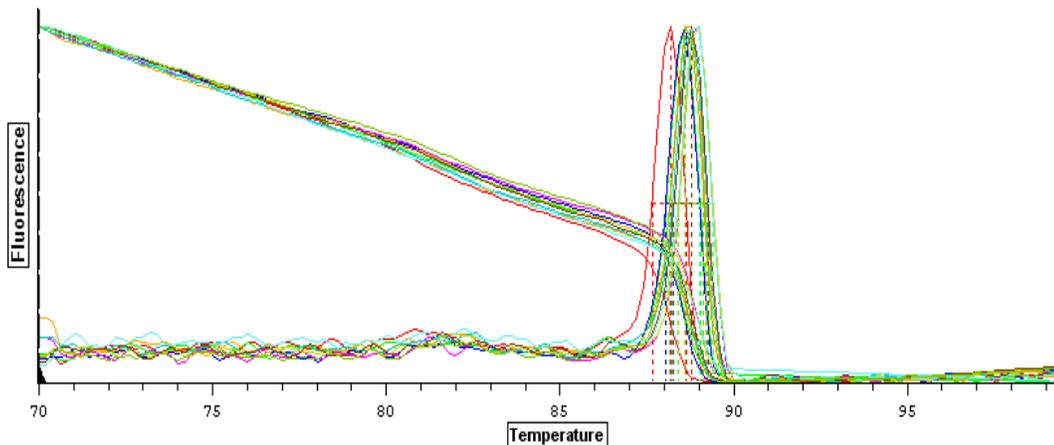
**Figura 7.39.- Curvas de melting de GAPDH.** Cada curva representa la cinética de disociación de los fragmentos amplificados de GAPDH, correspondientes a las diluciones seriadas de ADNc ( $T_m$  entre 88,2°C y 88,4°C).

- **Validación del ensayo qRT-PCR para GAPDH**

Los resultados del ensayo mostraron que los ciclos umbrales de detección GAPDH de las muestras analizadas variaron en un estrecho rango (18-20) (Ver Figura 7.40), lo que hizo que pudiese ser contemplado como posible gen de referencia, mientras que las curvas de melting correspondientes a cada una de las muestras aseguraron la identidad del producto amplificado.



**Figura 7.40.- Relación entre la fluorescencia emitida por los productos de amplificación de GAPDH, provenientes de muestras de células epiteliales ováricas de distintas donantes, en diferentes pases de cultivo y el ciclo umbral de detección (CT).**



**Figura 7.41.- Curvas de melting de los fragmentos amplificados de GAPDH de muestras de células epiteliales ováricas seleccionadas al azar.** El único pico de fluorescencia observado en cada curva indica la amplificación exclusiva de GAPDH en todos los casos.

- **Eficiencia**

La eficiencia de la amplificación puede ser definida como el porcentaje (entre 0 y 1) o como el tiempo que tarda un producto en amplificar por ciclo (entre 1 y 2) (Yuan *et al* 2006).

$$E_{hTERT} = (10^{(-1/-S)}) = 10^{(-1/-3,22)} = 2,04$$

$$E_{TRF2} = (10^{(-1/-S)}) = 10^{(-1/-3,5)} = 1,94$$

$$E_{GAPDH} = (10^{(-1/-S)}) = 10^{(-1/-3,45)} = 1,93$$

Así, hTERT, TRF2 y GAPDH tuvieron eficiencias de 2,04, 1,94 y 1,93 respectivamente, cercanas al óptimo(2). Estos valores fueron tomados en consideración con el objetivo de ajustar los resultados de la expresión de cada gen.

### 7.5.1. qPCR de las muestras

La expresión relativa de cada gen se calculó con la fórmula de Livak y Schmittgen 2001, en la que Expresión Relativa = Eficiencia amplificación  $(CT_{pase\ x} - CT_{pase\ 1})$ .

Una vez procesados los resultados fueron sometidos a evaluación de normalidad con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, las que demostraron que la expresión relativa de los genes en estudio no se ajustó a una distribución normal.

**7.5.1.1. Expresión relativa de hTERT, TRF2 y GAPDH en células epiteliales**

- Estadísticos descriptivos de TRF2 y GAPDH

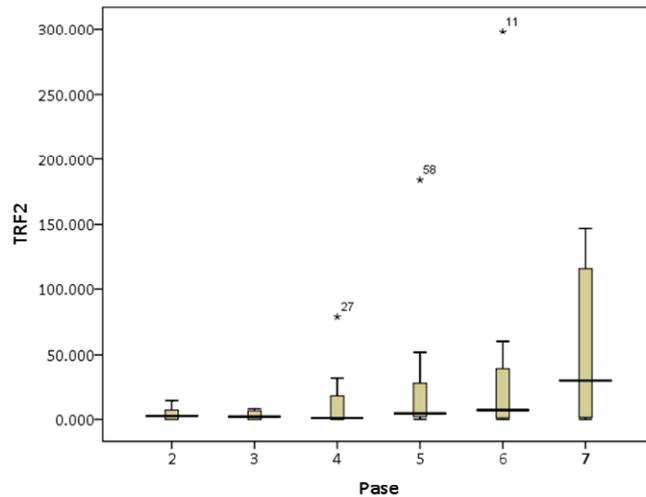
Las medias de la expresión relativa de TRF2 en cada pase fueron diferentes: disminuyeron desde el pase dos hasta el cuatro, para después aumentar (Ver Tabla 7.13).

**Descriptive Statistics<sup>a</sup>**

Pase		N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
2	TRF2	10 10	.000	15.000	4.10000	5.108816
3	TRF2	12 12	.000	8.000	3.16667	3.298301
4	TRF2	11 11	.000	79.000	1.3818E1	24.939199
5	TRF2	12 12	.000	184.000	2.6250E1	52.405976
6	TRF2	9 9	.000	298.000	4.7444E1	96.255014
7	TRF2	8 8	.000	147.000	5.5250E1	61.780140

**Tabla 7.13.- Media y desviación estándar de la expresión relativa de TRF2 en cada pase de los cultivos analizados (N: No. muestras analizadas).**

Debido a que las desviaciones estándar aumentaron a medida que los cultivos envejecieron, la diferencia entre las medias se tornó irrelevante, como lo muestra la siguiente figura:



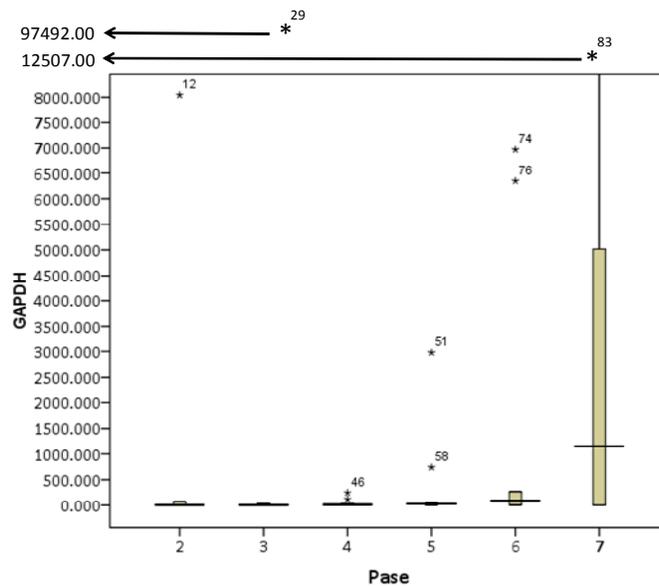
**Figura 7.42.- Box-plot que muestra la distribución en cuartiles de los resultados de la expresión relativa de TRF2 a lo largo de los pases examinados.**

Con relación a la expresión relativa de GAPDH, aunque las medias también mostraron diferencias, las desviaciones estándar fueron tan grandes, que se minimizó el efecto de dicha variación (Ver Tabla 7.14 y Figura 7.43).

Descriptive Statistics <sup>a</sup>						
Pase		N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
2	GAPDH	10	.000	8045.000	8.2200E2	2538.052096
	Valid N (listwise)	10				
3	GAPDH	12	.000	9.749E4	8.1324E3	2.814097E4
	Valid N (listwise)	12				
4	GAPDH	11	.000	247.000	4.2818E1	75.828515
	Valid N (listwise)	11				
5	GAPDH	12	.000	2977.000	3.2616E2	860.280486
	Valid N (listwise)	12				
6	GAPDH	9	.000	6971.000	1.5428E3	2905.731898
	Valid N (listwise)	9				
7	GAPDH	8	.000	1.251E4	3.1066E3	4521.301359
	Valid N (listwise)	8				

a. No statistics are computed for one or more split files because there are no valid cases.

**Tabla 7.14.- Media y desviación estándar de la expresión relativa de GAPDH en cada pase de los cultivos analizados.**



**Figura 7.43.- Box-plot que muestra la distribución en cuartiles de los resultados de la expresión relativa de GAPDH a lo largo de los pases examinados.** Se puede apreciar que, a medida que aumentó el pase y los cultivos envejecieron, no sólo aumentaron las medias sino que, en forma notoria, aumentó la variabilidad en la expresión.

- *Análisis de la expresión relativa de TRF2*

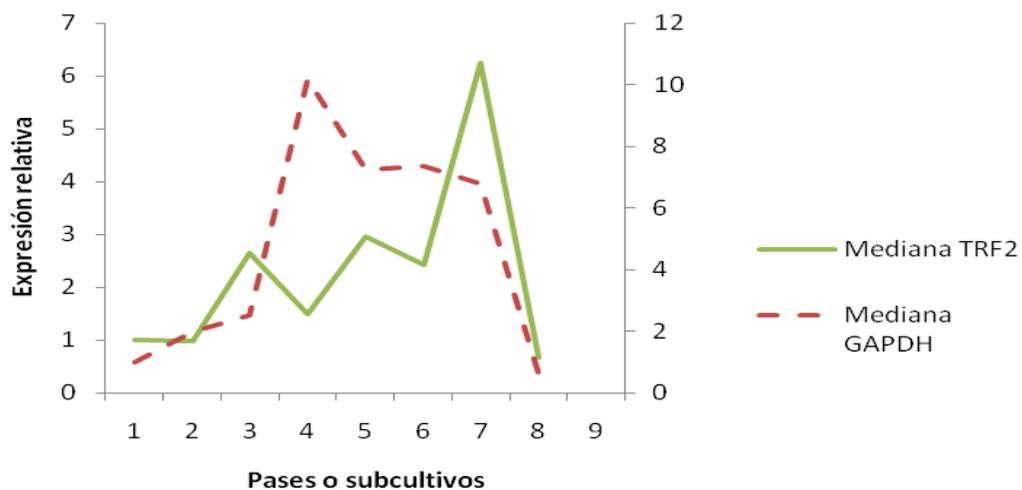
Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de covarianza (ANCOVA) con el objetivo de evaluar el efecto de la edad de las donantes y de comparar los resultados por pases, en busca de diferencias entre ellos. En este caso la covariable fue la edad.

El análisis mostró que ni la edad ni el pase afectaron el resultado de la expresión ( $p=0,1280$  y  $p=0,1608$  respectivamente). Debido a que el análisis de covarianza corresponde a un modelo de regresión que incluye el efecto de los pases y de la edad, se aplicó la prueba F general en la tabla de análisis de varianza, para evaluar el aporte de dichas variables. En este caso, el valor  $p=0,1013$  indicó que el aporte no fue significativo, lo que corroboró los primeros resultados del análisis.

- *Análisis de la expresión relativa de GAPDH*

La expresión relativa de este gen fue examinada también con análisis de covarianza. De acuerdo con esta prueba, no hubo diferencias significativas en la expresión relativa entre los diferentes pases ( $p=0,5394$ ) aunque, en apariencia, cuando se examinó el efecto de la edad sobre la expresión hubo un resultado significativo ( $p=0,0069$ ). Sin embargo, al aplicar la prueba F general para la significación conjunta de los coeficientes de la regresión utilizada en el análisis de covarianza, el valor p no fue significativo ( $p=0,0895$ ). Además, debe tenerse en cuenta que los valores del intervalo de confianza de 95% utilizados para estimar el aporte de la edad a los resultados de la expresión fueron tan pequeños (-1071,4 ~ -179,5), que no deben ser tomados en consideración.

Como complemento de los análisis anteriores, la figura siguiente muestra las tendencias de distribución de las medianas de expresión de TRF2 y de GAPDH a lo largo de los diferentes pases de cultivo de células epiteliales:



**Figura 7.44.- Tendencia de la distribución de medianas de la expresión de TRF2 y GAPDH en cultivos de células epiteliales ováricas.**

- *Análisis de la expresión relativa de hTERT*

En la gran mayoría de los cultivos analizados, no se produjo amplificación de este gen (Ver Tabla 7.15).

Es de resaltar el hecho de que sólo en una muestra amplificó a un CT inferior a 33, es decir a un ciclo menor al determinado en la curva de eficiencia. Aunque el número de moléculas de ADNc plasmídico estaba previamente calculado, lo que hubiese permitido la cuantificación absoluta del producto amplificado, no fue posible hacerlo debido a que las demás muestras registraron amplificación en ciclos muy superiores a 33, cuando ya no existe correlación lineal entre el logaritmo del número de moléculas de ADNc plasmídico y el ciclo de detección de la fluorescencia. Por este motivo, no se consideró plausible normalizar los CT obtenidos mediante la fórmula de Livak y Schmittgen 2001, que condiciona la expresión relativa, no sólo a la eficiencia de la amplificación sino a un referente o calibrador, en este caso el CT registrado en el pase uno.

**Pase \* hTERT Crosstabulation**

			hTERT		Total
			0	1	
Pase 1	Count	12	2	14	
	% within Pase	85.7%	14.3%	100.0%	
2	Count	14	2	16	
	% within Pase	87.5%	12.5%	100.0%	
3	Count	7	6	13	
	% within Pase	53.8%	46.2%	100.0%	
4	Count	16	2	18	
	% within Pase	88.9%	11.1%	100.0%	
5	Count	14	5	19	
	% within Pase	73.7%	26.3%	100.0%	
6	Count	12	3	15	
	% within Pase	80.0%	20.0%	100.0%	
7	Count	10	1	11	
	% within Pase	90.9%	9.1%	100.0%	
Total	Count	85	21	106	
	% within Pase	80.2%	19.8%	100.0%	

**Tabla 7.15.- Frecuencias de detección de la amplificación de hTERT en cultivos primarios de células epiteliales durante siete pases. “0” indica ausencia de expresión y “1” expresión del gen.**

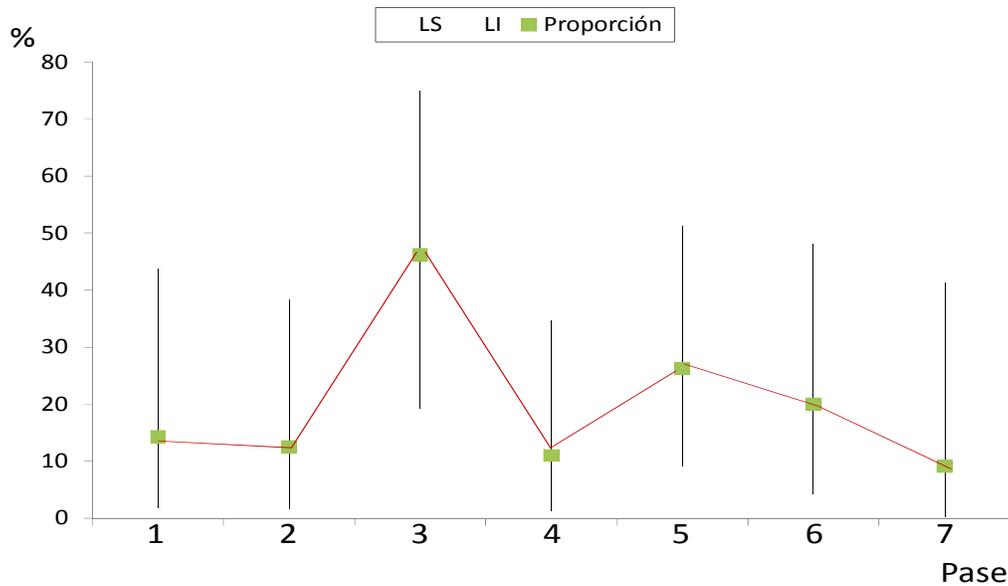
En las muestras en las que hTERT amplificó, los resultados mostraron una gran variabilidad, lo que indica que las diferencias no fueron relevantes. Es de resaltar

que en el pase tres la frecuencia tuvo un aumento marcado, aunque no alcanzó a ser significativamente diferente (Ver Figura 7.45 y Tabla 7.16).

Para evaluar el efecto de la edad de las donantes sobre la expresión relativa del gen y comparar el efecto de la edad de los cultivos en términos de pases, se ajustó un modelo de regresión logística. Este modelo permite estimar el efecto de las variables independientes -edad y pases- sobre una respuesta de tipo dicotómica, es decir, expresión o no expresión del gen. Así, los valores p obtenidos en cada uno de los pases no alcanzaron el nivel de significancia, pues fueron superiores a 0,05, lo que indica que ni la edad ni el pase afectaron la expresión. Además, el valor p para la significación conjunta del modelo, obtenido con la prueba de Wald,  $p=0,3633$ , reafirmó esta conclusión.

<b>Pases</b>	<b>p&gt;[Z]</b>
2	0,876
3	0,078
4	0,771
5	0,425
6	0,695
7	0,678
Edad	0,673
cons	0,375

**Tabla 7.16.- Valores p obtenidos en el modelo de regresión logística aplicado para analizar la expresión relativa de hTERT**



**Figura 7.45.- Frecuencias de expresión relativa de hTERT durante siete pases de cultivo de células epiteliales, con intervalos de confianza.** Como se puede apreciar, la amplitud de los intervalos de confianza para cada pase evidencia que no hubo diferencias significativas.

#### **7.5.1.2. Expresión relativa de hTERT, TRF2 y GAPDH en fibroblastos**

Con el fin de determinar posibles diferencias significativas en la expresión de los genes hTERT, TRF2 y GAPDH en el grupo de cinco cultivos de fibroblastos, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas entre pases (Ver Tabla 7.17).

	grupo	N	Rango promedio
<b>hTERT</b>	1	1	1,00
	2	1	3,00
	3	1	2,00
	<b>Total</b>	3	
<b>TRF2</b>	1	4	10,25
	2	3	17,67
	3	4	12,25
	<b>Total</b>	26	
	4	5	16,00
	5	5	12,20
	6	5	13,40
<b>GAPDH</b>	1	4	8,25
	2	4	14,50
	3	4	13,00
	<b>Total</b>	27	
	4	5	16,60
	5	5	14,00
	6	5	16,40

	hTERT	TRF2	GAPDH
<b>Chi-cuadrado</b>	2,000	2,399	3,172
<b>gl</b>	2	5	5
<b>Sig. asintótica</b>	0,368	0,792	0,673
<b>Sig. exacta</b>	1,000	-	-
<b>Probabilidad en el punto</b>	1,000	-	-

**Tabla 7.17.- Rangos promedio de expresión relativa de hTERT, TRF2 y GAPDH en fibroblastos y estadísticos de contraste obtenidos con la prueba de Kruskal-Wallis**

### **7.5.2. Relación entre la expresión de hTERT, TRF2 y GAPDH y la actividad SA-β-gal**

Se examinó la posibilidad de que existiera relación entre la expresión relativa de los tres genes estudiados y la actividad SA-β-gal, mediante la aplicación de la prueba no paramétrica de correlación de Spearman, con los siguientes resultados:

- La expresión relativa de TRF2 y la actividad SA-β-gal mostraron correlación directa en el pase dos ( $r=0,583$ ,  $p=0,050$ ), e inversa en el tres ( $r=-0,655$ ,  $p=0,014$ ) y el cinco ( $r=-0,636$ ,  $p=0,018$ ).

- La expresión relativa de GAPDH y la actividad SA- $\beta$  -gal mostraron correlación inversa en los pases dos ( $r=-0,624$ ,  $p=0,027$ ), cuatro ( $r=-0,600$ ,  $p=0,026$ ), cinco ( $r=-0,573$ ,  $p=0,026$ ) y siete ( $r=-0,643$ ,  $p=0,043$ ).
- La expresión relativa de hTERT y la actividad SA- $\beta$  -gal mostraron correlación directa en el pase tres ( $r=0,771$ ,  $p=0,036$ ).

## 7.6. Cariotipo

### 7.6.1. Pase uno

En la parte I del estudio, de los 26 cultivos examinados en el pase uno, 61,5% presentaron complemento cromosómico anormal. Estos complementos anormales incluyeron aberraciones numéricas, todas en mosaico, como poliploidías (Ver Figura 7.46), endorreduplicaciones y monosomías. En una única metafase de un cultivo aparecieron anomalías estructurales, manifestadas como deleciones localizadas en los cromosomas 3 y 11. Ningún cultivo presentó fragilidades o roturas (Ver Tabla 7.18).

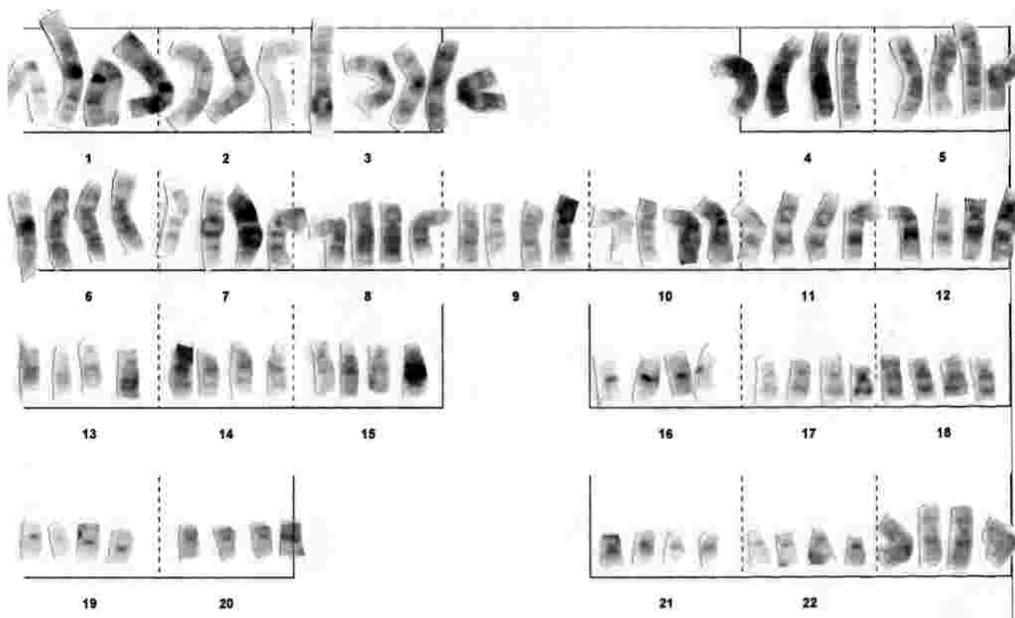


Figura 7.46.-Tetraploidía 96, XXXX <4n>

E d a d	Complemento cromosómico	% metafa ses nor males /total metafa ses	% metafa ses anorma les/total metafa ses	% poliploi días /total Metafa ses	% poliploi días/ metafa ses anorma les	% endo duplica ciones/ total metafa ses	% endo duplica ciones/ metafa ses anor males	% monoso mías/ total metafa ses	% monoso mías/ meta fases anorma les
34	45,XX,-18 [2] / 46,XX [16]	88.9	11.1	0	0	0	0	11.1	100
20	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
36	end 46, XX [2] / 65 - 124 <5n> [14] / 46,XX [22]	57.9	42.1	36.8	87.5	5.3	12.5	0	0
36	81 - 92 <4n> [3] / 46,XX [23]	88.5	11.5	11.5	100.0	0	0	0	0
21	92, XXXX <4n> [2] / 46,XX [3]	60.0	40.0	40.0	100.0	0	0	0	0
29	77 - 82 <4n> [5] / 46,XX [4]	44.4	55.6	55.6	100.0	0	0	0	0
30	end 46, XX [2] / 92 - 125 <5n> [2] / 46,XX [7]	63.6	36.4	18.2	50.0	18.2	50.0	0	0
28	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
55	78, XXXX <4n>	0	100.0	100.0	100.0	0	0	0	0
47	end 46, XX [2] / 46,XX [4]	66.7	33.3	0	0	33.3	100.0	0	0
46	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0

39	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
30	end 46, XX [4] / 46,XX [8]	66.7	33.3	0	0	33.3	100.0	0	0
30	end 46, XX [3] / 79 - 90 XXXX <4n> [2] / 46,XX [13]	72.2	27.8	11.1	40.0	16.7	60.0	0	0
38	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
42	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
31	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
51	end 46, XX [2] / 46,XX [9]	81.8	18.2	0	0	18.2	100.0	0	0
51	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
52	83 - 86 XXXX <4n> [3] / 46,XX [16]	84.2	15.8	15.8	100.0	0	0	0	0
22	end 46, XX [3] / 46,XX [13]	81.3	18.8	0	0	18.8	100.0	0	0
51	74 - 92 XXXX <4n> [7] / 46,XX [5]	41.7	58.3	58.3	100.0	0	0	0	0
50	70, XXXX <3n> [1]	0	100.0	100.0	100.0	0	0	0	0
50	80, XXXX <4n> [1]	0	100.0	100.0	100.0	0	0	0	0
54	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0
59	46, XX	100.0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 7.18.- Datos demográficos de las donantes y valores de las variables de las aberraciones citogenéticas en cada cultivo (pase uno).**

Una vez se estableció que las medias del número total de células en metafase y de células con metafase normal se ajustaban a una distribución normal, se efectuó la prueba paramétrica t-student con los dos grupos etarios ( $G1 < 50$  y  $G2 \geq 50$ ). Esta prueba permitió determinar que los dos factores fueron significativamente mayores en G1 con relación a G2 ( $p=0,001$  y  $p=0,002$ , respectivamente). En contraste, no se hallaron diferencias significativas, ni en la frecuencia de células con metafase normal, ni en la de células con metafase anormal ( $p=0,052$  en ambos casos).

Previa comprobación de distribución no normal con la prueba de Shapiro Wilk, confirmada con transformación con raíz cuadrada, se aplicó la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney para el número de células con metafase anormal que presentaban poliploidías, endorreduplicaciones o monosomías. Así, se estableció que hubo diferencias significativas en el promedio del número de células con metafase anormal entre ambos grupos, mayor en G1 que en G2 ( $p=0,018$ ). En adición, el número de células con endorreduplicación estuvo cerca de ser significativamente mayor en G1 ( $p=0,052$ ) y no hubo diferencias significativas en la frecuencia de células con poliploidías o con monosomías entre los dos grupos.

Teniendo en cuenta que el riesgo de aparición de cáncer derivado del epitelio superficial del ovario aumenta con la edad, en especial después de la menopausia, se decidió aplicar el análisis estadístico con dos rangos etarios, así:

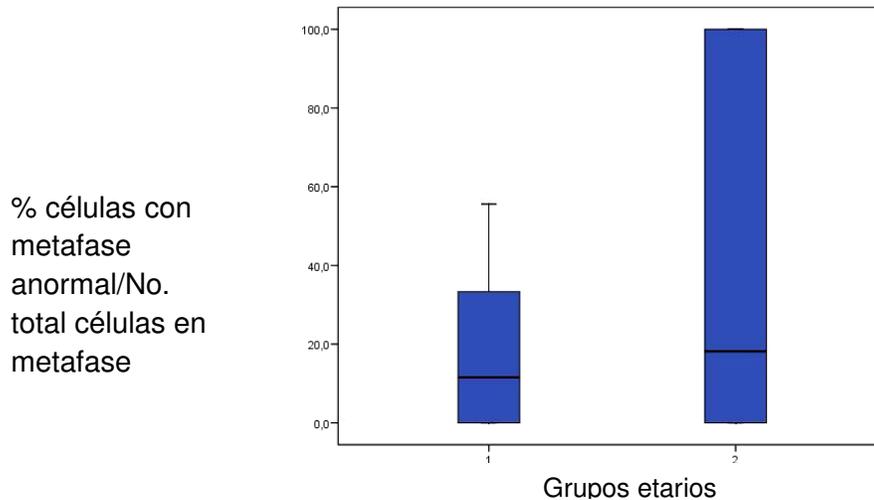
$G1 < 50$  años y  $G2 \geq 50$  años. Con esta estratificación, la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney mostró que, en el grupo de las donantes menores de 50, el número total de células en metafase y el de células con metafase normal fue significativamente mayor que en el de las donantes de 50 años o más ( $p=0,043$  y  $p=0,028$ , respectivamente) (Ver Tabla 7.19).

Previa transformación con la función raíz cuadrada, se demostró con la prueba t-student ajustada para varianzas heterogéneas que, la frecuencia de las células con metafase normal fue mayor en los cultivos de las donantes menores de 50, con respecto a los de las de 50 años o más ( $p=0,005$ ). En cuanto a las anomalías numéricas específicas, después de efectuar transformaciones y de aplicar la prueba exacta t-student para varianzas heterogéneas, se encontró una diferencia significativa en la frecuencia de células con poliploidías, mayor en el grupo de las donantes de 50 años o más, que en el de las menores de 50 ( $p=0,044$ ) (Ver Tabla 7.19).

Grupo etario	Estadístico	% metafases normales/total metafases	% metafases anormales/total metafases	% poliploidías/total metafases	% poliploidías/metáfases anormales	% endoduplicaciones/total metafases	% endoduplicaciones/metáfases anormales	% monosomías/total metafases	% monosomías/metáfases anormales
p		.05	.139	.044	.095	.126	.199	.654	.654
< 50 n=17	Media	.818	18.228	10.190	28.088	7.384	24.853	.654	5.88
	DS	.1893	18.933	17.438	42.089	11.945	40.121	2.6948	24.254
	Mediana	.885	11.538	0	0	0	0	0	0
≥ 50 n=9	Media	.564	43.589	41.569	55.556	2.020	11.111	0	0
	DS	.459	45.937	47.565	52.704	6.060	33.333	0	0
	Mediana	.818	18.182	15.789	100	0	0	0	0
Total	Media	.730	27.007	21.052	37.596	5.527	20.096	.427	3.85
	DS	.325	32.497	33.917	46.906	10.480	37.818	2.179	19.612
	Mediana	.830	16.986	0	0	0	0	0	0

**Tabla 7.19.- Medidas descriptivas y pruebas estadísticas de las variables de las aberraciones citogenéticas de los cultivos de las muestras de las donantes, clasificadas por grupos etarios (DS: desviación estándar).**

Al analizar la figura 7.47, se observa que la media y la mediana de las frecuencias de las metafases anormales fueron mayores en el grupo de 50 o más años, mientras que en el de las menores hubo incluso frecuencias iguales a cero.



**Figura 7.47.- Promedio e intervalo de confianza del 95% de la frecuencia de células con metafase anormal sobre el número total de células en metafase, por grupos etarios (G1<50, G2≥50).**

Con la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney se estableció que, en el grupo de las menores de 50, la frecuencia de células con endorreduplicaciones fue mayor que en el de 50 o más años ( $p=0,126$ ), aunque sin alcanzar diferencias significativas, mientras que la frecuencia de endorreduplicaciones con relación al número total de células con anomalías no presentó diferencias significativas entre los dos grupos etarios (Ver Tabla 7.19).

### **7.6.2. Pase cuatro**

Debido a la dificultad para alcanzar confluencia en este pase, sólo fue posible analizar seis cultivos, cinco de donantes menores de 50 (G1) y uno de una donante mayor de 50 (G2). Un 66,7% de los cultivos presentó anomalías de tipo numérico, todas en mosaico entre línea normal y tetraploidía y línea normal y endorreduplicación. No se hallaron anomalías significativas de tipo estructural, como tampoco fragilidades ni roturas (Ver Tabla 7.20). Debido al reducido tamaño de muestra, no se efectuó análisis estadístico.

Grupo etario	E d ad	Complemento cromosómico	No total meta fases	No meta fases nor ma les	% meta fases norma les/No total meta fases	No meta fases anor males	% meta fases anor males/ No total meta fases	No poli ploi días	% poli ploi días / No total meta fases	% poli ploi días /No meta fases anor males	No endo dupli ca cio nes	% endo dupli ca cio nes/ No total meta fases	% endo dupli ca cio nes /No meta fases anor males	No mo no mías	% mo no so mías / No total meta fa ses	% mo no so mías /No meta fases anor males
1	34	46, XX	4	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	20	70 - 83 <4n> [2] /46, XX [2]	4	2	50	2	50,0	2	50,0	100	0	0	0	0	0	0
1	36	80 - 100 <4n> [10]/ 46, XX [14]	24	14	58,3	10	41,7	10	41,7	100	0	0	0	0	0	0
1	36	80 - 90 <4n> [2] / 46, XX [4]	6	4	66,7	2	33,3	2	33,3	100	0	0	0	0	0	0

1	42	46, XX	3	3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	63	end 46, XX [1] / 46, XX [1]	2	1	50	1	50,0	0	0	0	1	50	100	0	0	0

**Tabla 7.20.- Datos demográficos y de valores de las variables de aberraciones citogenéticas de las muestras de las pacientes del**

### **7.6.3. Relación entre la actividad SA- $\beta$ -gal y la presencia de anomalías cromosómicas**

Mediante la aplicación de la prueba no paramétrica exacta de Mann-Whitney, no fue posible hallar diferencias significativas en la actividad SA- $\beta$ -gal normalizada entre las células epiteliales de la parte I del estudio que presentaron anomalías cromosómicas y las que no las presentaron. Los resultados del pase cuatro no fueron analizados desde el punto de vista estadístico, debido al reducido tamaño de muestra.

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. Establecimiento de cultivos primarios**

La técnica de cultivo utilizada permitió obtener una monocapa de células epiteliales, en los que la contaminación con células estromales fue muy rara. El éxito de la pureza del cultivo, en términos de presencia exclusiva de células epiteliales, dependió en gran medida de la forma de separar el epitelio del estroma subyacente. Usualmente ambas capas se desprenden con facilidad sin necesidad de aplicar fuerza, lo que hace que no se dispersen las células del estroma y por tanto no se contamine el cultivo con fibroblastos estromales. Si, por el contrario, en el proceso de separación, se sostienen con mucha firmeza las dos capas, los cultivos presentarán células epiteliales y fibroblastos y, cuando esto ocurre, las células epiteliales quedan rápidamente sobrepasadas en número por los fibroblastos, células que terminan por prevalecer en forma total en el cultivo. Cuando se presentó este tipo de contaminación, los cultivos fueron descartados.

Con el método de recolección de células epiteliales por medio de cepillado o brushing no fue posible obtener un número suficiente de células para dar inicio a los cultivos. Es probable que, en el lapso comprendido entre la recolección y la siembra, las células se hayan debilitado, debido a la carencia del soporte físico y metabólico que *in situ* les proporcionan tanto las células como la matriz extracelular del estroma. Al respecto, se ha demostrado que uno de los factores inductores de la diferenciación epitelial es la presencia de tejido conectivo, como el que constituye el

estroma subyacente al epitelio ovárico. Por otra parte, es posible que las células recolectadas mediante este método correspondan a células terminalmente diferenciadas, lo que explicaría su fenotipo estacionario y la ausencia de replicación (Hikita *et al* 2000).

Existe evidencia de que cuando aparece el fenotipo senescente, lo que ocurre en los pases 3-5 (Siemens y Auersperg 1988, Auersperg y Maines-Bandiera 2000, Auersperg *et al* 2001, Dunfield *et al* 2002, Shepherd *et al* 2006), las células comienzan a expresar el marcador mesenquimático vimentina, además de secretar colágeno tipo III y, aunque pueden retener marcadores de diferenciación epitelial como las queratinas, en general pierden otros como la desmoplaquina y la villina (Auersperg *et al* 2001). A medida que son subcultivadas, las células pierden paulatinamente los marcadores de diferenciación epitelial como las queratinas y tienden a asumir cada vez más un fenotipo fibroblástico, proceso que se caracteriza por eventos como la reducción de la cohesión intercelular, la modificación en la polaridad, además de un incremento en la secreción de colágenos tipo I y III. En cultivos de otros tipos de células epiteliales, también de origen mesodérmico, han sido descritas conversiones epitelio-mesenquimáticas semejantes a las que ocurren con las células del epitelio superficial ovárico en cultivo (Mani *et al* 2008, Polyak *et al* 2009, Trimboli *et al* 2008).

Los hechos antes reseñados sugieren la factibilidad de comparar el fenotipo de las células epiteliales ováricas explantadas en cultivo, con el que se expresa *in vivo* cuando el epitelio ha sufrido ruptura debido a la ovulación y por tanto las células sobrevivientes dan inicio al proceso de reparación tisular.

### **8.1.1. Selección del medio de cultivo**

Diversos medios de cultivo han sido utilizados para cultivar células ESO. El más común es la mezcla 1:1 de los medios MCDB105 (modificación del medio F12) y M199, suplementada con SFB a concentraciones que oscilan entre 10 y 20% y adicionada con antibióticos como gentamicina o bien, con una combinación de estreptomycin y penicilina. Como resultado del uso de sólo un 2% de CO<sub>2</sub> en la fase gaseosa, esta mezcla de medios presenta una capacidad de amortiguación que minimiza las variaciones de pH cuando los cultivos son removidos de la incubadora,

lo que determina una menor necesidad de buffering o amortiguación (Kruk *et al* 1990). La mezcla MCDB105/M199 está especialmente para cultivar células que poseen receptores hormonales. No sólo permite un rápido crecimiento de ESO sin que se altere su fenotipo epitelial, sino además hace que el cultivo alcance un mayor número de pases antes de la aparición de la senescencia (Auersperg *et al* 2001).

Otro medio utilizado para cultivar células epiteliales ováricas es Waymouth 752/1 el que, según reportes, no es capaz de inducir un crecimiento celular apropiado en cultivos de células humanas. Aunque el medio Waymouth 752/1 ha demostrado ser efectivo para el crecimiento de ESO en ratón, en humanos no permite alcanzar una viabilidad celular aceptable. Al respecto, se ha determinado que ESO humano prolifera sólo cuando  $[Ca^{++}]$  en el medio es mayor a 0,8 mM, condición que no cumple Waymouth 752/1, en el que  $[Ca^{++}]$  es igual a 0,8 mM, muy inferior a la de otros medios tales como MCDB105, M199 o MCDB202, en los que oscila entre 1,0 y 2,2 mM (Adams y Auersperg 1981, Auersperg *et al* 2001).

Formulaciones utilizadas en estudios previos dan cuenta de la adición del factor epidérmico de crecimiento (EGF; 20 ng/ml) e hidrocortisona (0,4 ug/ml) al medio seleccionado para cultivar las células ESO, usualmente MCDB202/M199. Sin embargo, aunque esta mezcla aumenta la tasa de crecimiento y el número de doblajes poblacionales, también produce alteraciones fenotípicas irreversibles de tipo fibroblástico (Dunfield *et al* 2002). En nuestro estudio utilizamos la mezcla de medios MCDB105/M199 suplementada con SFB al 10% y 0,05% de penicilina-estreptomicina de 10000 U, con base en la observación de que promovió un buen crecimiento epitelial y no indujo transición hacia un fenotipo fibroblástico, al menos durante los pases presenescencia, hecho de ocurrencia común en las células epiteliales ováricas en cultivo. Además de la mezcla MCDB105/M199, en un comienzo se utilizó también el medio MegaCell MEM/F12-Ham (Minimum Essential Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham), cuya composición corresponde a la formulación basal clásica de los medios de cultivo, enriquecida con piruvato de sodio, elementos traza y Hepes como amortiguador (MegaCell Media, Sigma-Aldrich 2009). Si bien este medio había sido promocionado como idóneo para el cultivo de un amplio espectro de tipos celulares y con el valor agregado de incluir SFB al 3% en su composición, lo que evitaría una suplementación adicional, no produjo los resultados esperados en cuanto a la obtención de una buena capacidad replicativa.

Aunque MCDB105 es una modificación del medio F12 y comparte los mismos ingredientes, la composición relativa varía entre los dos medios, de modo que MCDB105 contiene concentraciones de cisteína y de calcio más cercanas al óptimo necesario para el crecimiento de las células epiteliales. En adición, los elevados niveles de glutamina y de prolina presentes en dicho medio facilitarían una mayor síntesis de matriz extracelular para contribuir así a la expresión del fenotipo celular aplanado y en forma de adoquín, característico de dichas células (Kruk *et al* 1990).

### **8.1.2. Caracterización de las células epiteliales**

Las células epiteliales ováricas pueden ser caracterizadas mediante criterios morfológicos, acompañados por la identificación de diversos marcadores de diferenciación terminal, a saber:

- Queratinas 7, 8, 9 y 19 las que, conjuntamente con la 18, están presentes en los epitelios simples cúbicos, lo que permite diferenciarlas de otras células ováricas que pueden aparecer como contaminantes del cultivo, por ejemplo fibroblastos, células mesoteliales, células endoteliales y leucocitos (Czernobilsky 1985).
- Deshidrogenasa 17 $\beta$ -hidroxisteroide y mucina, que las distingue de las células del mesotelio extraovárico.
- Laminina, no expresada en los fibroblastos.
- Ausencia de Factor VIII y de receptores de lectina Ulex, presentes en las células endoteliales (Auersperg *et al* 1994, Auersperg *et al* 2001).

En el presente estudio, la identidad de las células epiteliales objeto no sólo fue comprobada con base en los criterios morfológicos y en el carácter excluyente de este tipo de cultivos, sino también mediante la visualización de las señales fluorescentes emitidas cuando FITC se activa, una vez se ha acoplado el anticuerpo anticitoqueratina con su sustrato. Aunque FITC permitió verificar la identidad de los cultivos de células epiteliales, una de las desventajas de su uso consistió en que la fluorescencia cayó rápidamente, de modo que la observación al microscopio tuvo que hacerse lo más pronto posible.

Los cultivos seleccionados para efectuar los análisis incluidos en el presente trabajo fueron aquellos en los que se descartó contaminación con fibroblastos, decisión que estuvo fundamentada por una parte, en la caracterización con el método

inmunocitoquímico y, por otra, en la observación de que, en caso de ocurrir, los fibroblastos rápidamente sobrepasarían en número a la población de células epiteliales, de modo que al final del proceso de subcultivo en forma seriada, todas las células resultantes serían fibroblastos. En caso de contaminación con leucocitos, es oportuno anotar que la posibilidad de confusión es mínima, pues el medio utilizado para cultivar las células epiteliales no permite el crecimiento de este tipo de células y, en adición, éstas no se adhieren a la superficie del frasco de cultivo. Por otra parte, con el fin de evitar la contaminación con células del mesotelio extraovárico se tuvo la precaución de obtener secciones extremadamente finas y limpias de la superficie ovárica.

### **8.1.3. Criopreservación**

La criopreservación es un proceso que permite estabilizar las células vivas mediante la aplicación de temperaturas bajas o criogénicas, lo que hace que ellas queden “detenidas” en el tiempo. Aunque el proceso no está comprendido a cabalidad, se sabe que el metabolismo celular se detiene cuando la totalidad del agua disponible se ha convertido en hielo. El peligro principal que corren las células criopreservadas consiste en la aparición de desbalance osmótico y de cristales de hielo. Si el enfriamiento se lleva a cabo lentamente, comienza a formarse hielo por fuera de la célula, lo que arrastra agua desde interior de ésta hacia el medio extracelular, generando un desbalance osmótico a través de la membrana plasmática. Si el enfriamiento es rápido, aunque no alcanza a ocurrir tal desbalance, el agua presente en el interior celular se cristaliza (Mazur *et al* 1972). Se prefiere entonces, no sólo un enfriamiento lento, sino también la utilización de un agente crioprotector como DMSO, que pueda minimizar los efectos deletéreos de la formación de cristales de hielo y del desbalance osmótico. El DMSO en particular, asegura un mayor grado de deshidratación antes de que ocurra la congelación intracelular. Debido a que minimiza el desbalance osmótico, el DMSO es usualmente seleccionado como agente crioprotector.

En el proceso de criopreservación es necesario tomar en consideración factores como la viabilidad celular y las condiciones de crecimiento, así como el número de células recolectadas y el tipo de manejo que se les da. El número de células es importante pues asegura un buen conteo postcongelación. Los conteos obtenidos

estuvieron muy por debajo de los valores óptimos de  $10^6$ - $10^7$ , lo que afectó en forma negativa la recuperación de células viables. Debe tenerse en cuenta además, que el porcentaje de recuperación depende de la fase de crecimiento del cultivo en el momento de la criopreservación.

## **8.2. Crecimiento de las células cultivadas**

Con el objetivo de describir la cinética de crecimiento de los cultivos, se consideraron las cuatro etapas clásicas descritas por Hayflick y Moorhead (Hayflick y Moorhead 1961): etapa I, llamada también fase lag o fase de consolidación del cultivo, etapa II o fase de crecimiento exponencial (IIa rápido y IIb lento), etapa III o fase estacionaria o de senescencia y etapa IV o fase de muerte celular.

### **8.2.1. Capacidad replicativa**

- ***Células epiteliales***

En la primera parte del estudio, la distribución de medianas de la población celular normalizada de las células epiteliales mostró una tendencia al aumento, a partir de la finalización del pase uno hasta el cuatro, pase en el que alcanzó un máximo y comenzó a descender. En la segunda parte, las células epiteliales mostraron una elevada capacidad replicativa durante los pases dos, tres y parte del cuatro, pase en el que también comenzó a declinar. Estos hechos sugieren la posibilidad de que el pase uno pueda ser considerado como fase I o lag del cultivo, en el que las células sufren el proceso de adaptación a nuevas condiciones, mientras que los pases dos y tres podrían ser equiparados con la fase IIa o de crecimiento exponencial. Aunque aún elevada en el pase tres en ambas partes del estudio, los cultivos experimentaron una disminución (con relación a la fase IIa) en su población celular normalizada, lo que indicaría el curso de la fase IIb (terminación de la fase de crecimiento exponencial), para continuar en descenso durante los pases siguientes, en lo que podría ser el curso de la fase III o estacionaria (Ver Figura 7.16), en la que la capacidad replicativa ha disminuido en forma sensible.

- ***Fibroblastos***

En este tipo de células, la población celular normalizada se mantuvo relativamente estable durante el pase uno y el comienzo del dos, pases 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 dos, la totalidad del tres y parte del cuatro, la población celular normalizada 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 (Ver Figura 7.6), sería factible pensar que la fase IIa estaría comprendida entre la etapa final del pase dos y gran parte del tres, mientras que la IIb se extendería desde la parte final del pase tres, hasta mediados del pase cuatro. 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 cuatro, cuando es aparente el descenso en los valores de las medianas de la población celular normalizada.

- ***Comparación de la capacidad replicativa entre células epiteliales y fibroblastos***

Los resultados del análisis estadístico que comparó la población celular normalizada entre estos dos tipos de células están en concordancia con la figura 7.7, 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 uno y dos de las células epiteliales y los fibroblastos en favor de las primeras mientras que, en los pases restantes, con excepción del seis, no hubo diferencias significativas. En este orden de ideas, las dos curvas de tendencia muestran un comportamiento similar a partir del pase tres, exceptuando el pase seis, 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 hipótesis de la transición epitelio-mesenquimática que pueden experimentar las células epiteliales de la superficie del ovario bajo determinadas circunstancias. Esta transición no sólo permite que estas

células exhiban muchas de las características de los fibroblastos del estroma subyacente (Auersperg *et al* 1999, Ahmed *et al* 2007), 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 (Greenaway *et al* 2008). Merece tenerse en cuenta además, que en nuestro estudio, las células epiteliales y los fibroblastos tuvieron una única procedencia, pues fueron obtenidos a partir de una misma donante, lo que minimiza posibles sesgos en la comparación.

### **8.3. Actividad SA- $\beta$ -gal**

La actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia -más comúnmente conocida como SA- $\beta$ -gal- corresponde a la actividad  $\beta$ -galactosidasa detectable a pH 6 en cultivos de células que han sufrido senescencia replicativa o bien, acelerada (Dimri *et al* 1995). Mientras la SA- $\beta$ -gal se activa a pH 6, la  $\beta$ -gal lisosómica de mamíferos lo hace a pH 4 y la procariótica, que se usa como reportera en estudios de transfección lo hace a pH 7,5 (Bronstein *et al* 1994, López *et al* 2005). Aunque la diferencia en el pH de activación entre las formas lisosómica y la asociada a la senescencia se atribuyó inicialmente a la existencia de dos enzimas diferentes, en la actualidad se acepta que la SA- $\beta$ -gal es la misma  $\beta$ -gal de origen lisosómico y que su actividad aumentada en células senescentes se debe al incremento característico de la masa de lisosomas en el estado de senescencia (Lee *et al* 2006, Coates *et al* 2007), relacionada posiblemente con la inducción de autofagia (Kurz *et al* 2000, Gerland *et al* 2003).

No obstante su amplia utilización y confiabilidad como biomarcador de senescencia, el origen de la actividad SA- $\beta$ -gal y su papel en la senescencia han sido motivo de debate durante años y es así como existen reportes sobre su actividad enzimática a pH 6 en células cultivadas no senescentes, relacionada con un alto grado de confluencia (Lee *et al* 2006, Untergasser *et al* 2003), e incluso se ha propuesto que dicha actividad se debe a un incremento en la actividad o en la cantidad de alguna otra enzima capaz de hidrolizar los residuos terminales  $\beta$ -D-galactosa presentes en glicoproteínas, esfingolípidos y queratánulfato (Gossrau *et al* 1991). Sin embargo, Lee *et al* 2006, demostraron que la SA- $\beta$ -gal está codificada por el gen de la  $\beta$ -

galactosidasa lisosómica (GLB1) y, que aunque los niveles de la enzima aumentan durante el estado senescente, su actividad no es indispensable para el inicio de dicho estado.

El análisis estadístico de los resultados del ensayo para determinar la actividad SA- $\beta$ -gal en los cultivos provenientes de las 48 donantes de la primera parte del estudio, mostraron que dicha actividad presentó variaciones significativas en los diferentes pases de los cultivos de células epiteliales. A lo largo de los seis primeros pases, las medianas de la actividad SA- $\beta$ -gal mostraron tendencia al aumento, especialmente en el pase seis, hasta alcanzar un máximo en el siete, cuando comenzaron a disminuir. En esta primera parte no fue posible analizar la relación entre actividad SA- $\beta$ -gal y capacidad replicativa –evaluada en función del factor población celular normalizada- en razón de que estos parámetros fueron examinados en tiempos diferentes: las poblaciones celulares normalizadas antes de la criopreservación y la actividad enzimática después del proceso de descongelación. No obstante, en razón de que el incremento en la actividad SA- $\beta$ -gal ha sido asociado con el estado senescente (Maier *et al* 2007), se podría pensar que este estado tomaría lugar a partir de los pases seis y siete de los cultivos.

En la segunda parte del estudio se examinó la actividad SA- $\beta$ -gal en 28 cultivos primarios de células epiteliales ováricas, que también fueron subcultivadas en forma seriada hasta agotar su capacidad replicativa. En general, aunque se observó un comportamiento antagónico entre la actividad enzimática y la población celular normalizada, cuando los cultivos se encontraban en la fase III (a partir del pase cuatro), la actividad SA- $\beta$ -gal comenzó a mostrar un aumento significativo, que se hizo más notorio hacia el pase seis. De acuerdo con la Figura 7.13, los valores más elevados de capacidad replicativa precederían en el tiempo a los valores más elevados de actividad enzimática (aproximadamente entre dos y cuatro pases), lo que es explicable si se considera que la senescencia, en el contexto del cultivo, es antagónica con la proliferación celular y, que además, una disminución en la capacidad replicativa no necesariamente está ligada con un pico simultáneo de actividad enzimática, sino que éste puede hacer su aparición con posterioridad a dicha disminución, en consonancia con evidencias de que la senescencia se manifiesta como un fenotipo progresivo (Young y Narita 2009). El incremento en la actividad SA- $\beta$ -gal fue un evento caracterizado por su heterogeneidad, lo que indica

que la activación de la SA- $\beta$ -gal está más relacionada con la ocurrencia de una determinada fase del crecimiento que con la edad cronológica del cultivo y, con mayor razón, si se tiene en cuenta que la duración en días de cada pase de los diferentes cultivos fue muy variable entre cultivos. Maier *et al* 2007 reportaron que el aumento en la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos de fibroblastos precede a la fase III postmitótica, lo que haría de ella un buen predictor de la esperanza de vida del cultivo. Nosotros encontramos que dicho aumento, no sólo está asociado con la fase III, sino que además la precede. En este orden de ideas, la actividad SA- $\beta$ -gal podría ser considerada como biomarcador tanto del estado senescente, como del inicio del descenso de la capacidad replicativa que caracteriza a la fase IIb en este tipo de células. Por otra parte, tanto las fluctuaciones observadas en la actividad SA- $\beta$ -gal –previas a la fase III-, como la variabilidad en el momento de ocurrencia de su pico de actividad entre cultivos, podrían estar asociadas con la presencia de clones distintos del mismo tejido epitelial, cada uno con diferente potencial de diferenciación. Si se tiene en cuenta que se ha postulado la existencia en el epitelio superficial del ovario de por lo menos dos clases de células que corresponderían a diferentes estadios de un mismo tipo celular (Auersperg *et al* 1984, Wong *et al* 1998, Piek *et al* 2004), es posible que esta heterogeneidad al inicio de la fase III de crecimiento sea la responsable de dichas fluctuaciones y de la variabilidad en la aparición del pico de actividad SA- $\beta$ -gal.

En nuestro estudio, una vez la mediana de la población celular normalizada alcanzó su valor más elevado, lo que ocurrió hacia el pase dos (fase IIa), se mantuvo relativamente estable hacia el pase cuatro cuando comenzó a disminuir, tendencia que se mantuvo hasta el final de todos los cultivos. Estos resultados muestran que la fase III estacionaria o senescente en las células del epitelio superficial del ovario comienza en el pase cuatro, en simultaneidad con la declinación de la capacidad replicativa. Es factible pensar que, en forma cercana al inicio de la fase III, durante este estado coexistan varias poblaciones celulares: aquellas que se encuentran en estado de replicación, otras senescentes o en estado de quiescencia y una más de células en proceso de muerte. Sin embargo, dicho equilibrio se rompería durante la fase III o estacionaria de los cultivos, debido a la entrada de un cada vez mayor número de células al estado senescente, lo que se traduce en una capacidad replicativa en franca disminución a partir de esta fase en adelante..

Aunque se desconoce el significado de su función en la fase estacionaria, se ha postulado que el aumento en la actividad SA- $\beta$ -gal está asociado con la acumulación de materiales no degradables en el compartimento lisosómico, como las moléculas producto de daño oxidativo o la lipofuscina (Piek *et al* 2004, Liton *et al* 2008). En consecuencia, las alteraciones resultantes en la función de los lisosomas pueden ser el prelude de patogénesis del tejido al que pertenecen las células cultivadas, debido a que afectan tanto la vía autofágica como la formación de autofagolisosomas (Ballabio 2009), mecanismos responsables de la renovación de los organelos intracelulares y de la digestión de agregados proteicos (Liton *et al* 2009).

Por otra parte, la declinación de las medianas, tanto de la actividad enzimática, como de la población celular normalizada a partir del pase siete (Ver Figura 7.14), merece ser investigada en estudios ulteriores que evalúen las razones para esta disminución.

Con relación a las diferencias halladas en la actividad SA- $\beta$ -gal de las células epiteliales entre los dos grupos etarios, significativamente mayores en las muestras de las donantes del grupo etario G2 ( $\geq 37$  años) en los pases cuatro y cinco, constituyen evidencia de la asociación que existe entre el envejecimiento y la mayor actividad SA- $\beta$ -gal exhibida por dichas células en los pases que corresponderían precisamente a la fase III estacionaria, cuando ya se ha iniciado la senescencia. Este hecho está en concordancia con reportes previos que han establecido asociación entre el grado de envejecimiento y la senescencia celular (Sharpless 2004, Beausejour y Campisi 2006). Al respecto, se ha propuesto a las proteínas P53 y/o Rb como actoras principales de la vía central inductora de la senescencia, en conjunto con la expresión de genes reguladores como p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP</sup>, and p14<sup>ARF</sup> (Stein *et al* 1999, Sharpless 2004). En las células senescentes, tanto la expresión de p16<sup>INK4a</sup>, como la hipofosforilación de Rb aumentan en forma simultánea (Alcorta *et al* 1996, Stein *et al* 1999), de modo que al aumento de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> pueden contribuir factores como activación de la vía de señalización MAP kinasa, la activación de oncogenes o el crecimiento en cultivo (Lin *et al* 1998, Serrano *et al* 1997, Zhu *et al* 1998, Zindy *et al* 1997). Por otra parte, debido a que la actividad cdk4/6 está inhibida por p16<sup>INK4a</sup>, lo que conduce a la detención del ciclo celular, en los organismos envejecidos el aumento de la expresión de p16<sup>INK4a</sup> está en

asociación directa con la pobre capacidad de regeneración de los tejidos en proceso de envejecimiento. Así, la evidencia indica que el vínculo principal entre la senescencia y el envejecimiento está mediado por el aumento en la expresión de p16<sup>INK4a</sup> (Sharpless 2004). Se podría proponer, de acuerdo con lo observado en la figura 7.17, que el inicio de la senescencia tiene lugar cuando las curvas de distribución de medianas de la actividad SA-β-gal y de la población celular normalizada muestran una tendencia antagónica. En este orden de ideas, nuestro hallazgo relacionado con un inicio más temprano del estado senescente en las células epiteliales cultivadas provenientes del grupo de donantes de mayor edad, podría ser explicado por un posible aumento en la expresión de p16<sup>INK4a</sup>.

Por otra parte, es interesante notar que, cuando se comparó la actividad SA-β-gal normalizada en las células epiteliales que no fueron sometidas a criopreservación con las que sí lo fueron, dicha actividad fue significativamente mayor en las últimas. Si bien es cierto que la determinación de la actividad SA-β-gal se llevó a cabo en dos momentos diferentes, lo que pudo afectar los resultados, cabe preguntarse si la criopreservación fue capaz de alterar en forma sustancial la vía central inductora de la senescencia (Ben-Porath y Weinberg 2005) o bien, la expresión del gen GBL1 codificante de la β-gal y/o la actividad de la enzima en las células que fueron sometidas a dicho proceso, con la consecuente disminución en los valores de actividad SA-β-gal y un retraso concomitante en la iniciación del estado senescente.

#### **8.4. Inducción de senescencia**

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 (Duan *et al* 2005, Bassaneze *et al* 2008).

En respuesta a la agresión generada por agentes oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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)-kB, la activación de p53 y las proteínas de choque térmico, de cuyo balance e interacción depende la respuesta final de la célula (Finkel y Holbrook 2000).

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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 manera negativa en la supervivencia de las células tratadas y explicaría por qué motivo en unas pocas células (epiteliales o fibroblastos inducidos a senescencia) 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hara *et al* 2006a), en cuyo caso dicho complejo actuaría a nivel nuclear para promover apoptosis, evento que también explicaría los bajos valores de luminiscencia debida a actividad SA-β-gal obtenidos.

## **8.5. Cuantificación de la expresión de hTERT y TRF2**

### **8.5.1. qPCR**

La reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) constituye en la actualidad una poderosa herramienta en el campo de la investigación biológica, pues permite monitorizar y cuantificar en forma directa la expresión génica, mediante la amplificación de cantidades muy pequeñas de fragmentos específicos de los genes a estudiar, a medida que la reacción se lleva a cabo. Esto hace que la recolección de los datos pueda efectuarse a lo largo de la reacción, incluso durante sus fases más tempranas, y no al final, como ocurre con la denominada End-Point PCR. Así, este procedimiento reduce la probabilidad de aparición de eventos no deseados -como variabilidad y contaminación- y elimina la necesidad de hacer análisis posteriores a la reacción, por ejemplo con geles de agarosa, en los que los resultados están basados en la discriminación por tamaño,

lo que le resta precisión. Por otra parte, en todas las reacciones de la qPCR se llega a un momento en el tiempo, en el que la amplificación alcanza un nivel de fluorescencia que puede ser detectado por el termociclador, mientras que el software acoplado se encarga de calcular el CT correspondiente a la fluorescencia emitida. Esto hace factible cuantificar con una alta resolución la expresión de los genes estudiados, a diferencia de la End-Point PCR, en la que los resultados no sólo se expresan exclusivamente en forma cualitativa, sino con un bajo nivel de resolución. Estas características hacen de la qPCR un método altamente sensible, específico y reproducible, con la ventaja de que, gracias a que combina la amplificación de fragmentos de ácidos nucleicos con la detección de la fluorescencia en un solo ensayo, permite prescindir de la electroforesis en geles como requisito para identificar los productos.

El método aplicado en el presente trabajo correspondió al denominado “two-step qPCR” (del inglés *two-step quantitative polymerase chain reaction* o *reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real en dos pasos*), en el que la transcripción reversa del ARN y la amplificación del ADNc así obtenido se efectúan en dos tubos diferentes.

Para monitorizar la amplificación del ADN se utilizó SYBR Green. Aunque la principal desventaja de este colorante fluorescente consiste en que reporta la amplificación de cualquier ADN, incluso la de productos no específicos, el procedimiento se caracterizó por la sencillez y estuvo basado en el hecho de que el colorante emite fluorescencia sólo cuando está acoplado a la doble cadena de ADN, de modo que, a medida que aumentó el número de copias del ADN, aumentó la fluorescencia detectada por el termociclador. La sensibilidad del método es además elevada, en razón de que a una sola molécula amplificada pueden unirse múltiples moléculas del colorante.

Antes de evaluar la expresión de un determinado gen, es recomendable cuantificar el producto amplificado mediante una estrategia que, en forma ideal, exprese la cantidad exacta de ARNm en las muestras analizadas. Aunque la estrategia perfecta no existe, se consideró cuantificar en forma absoluta los resultados de hTERT y, en forma relativa, los de TRF2.

- **Cuantificación absoluta**

Para cuantificar en forma absoluta, lo usual es elaborar una curva de calibración o patrón que relacione la señal fluorescente de la PCR con el número de moléculas de ADNc utilizadas como sustrato de la reacción (Bustin 2000, Pfaffl y Hageleit 2001, Fronhoffs *et al* 2002). La curva puede hacerse de varias maneras: a partir de productos de PCR diluídos, de plásmidos, de ADN o ARN recombinantes o de muestras de tejido. Sin embargo, para que este tipo de cuantificación sea confiable, se requiere que las eficiencias de amplificación tanto del ARNm de interés como del ARN o el ADN utilizados en la curva de calibración sean iguales (Souaze *et al* 1996, Pfaffl 2001) y, de cualquier manera, no deja de ser una cuantificación relativa, pues está relacionada con la curva de calibración. En el presente estudio, se había planeado cuantificar la expresión de hTERT en forma absoluta, mediante la curva de eficiencia obtenida a partir de diluciones seriadas de un número conocido de moléculas de ADNc plasmídico. Sin embargo, los resultados mostraron que, con una sola excepción, no hubo expresión de la enzima en ciclos más tempranos que el 33, ciclo que había sido determinado como umbral de detección de la fluorescencia para este gen. Las demás muestras que amplificaron, lo hicieron más allá del ciclo 33, hecho que no permitió calcular la cantidad de copias del ADNc plasmídico mediante la curva de calibración inicial. En estas circunstancias, se perdió la relación lineal previa, de modo que para analizar la expresión, se tuvo en cuenta el ciclo umbral de detección neto arrojado por el equipo.

- **Cuantificación relativa**

La cuantificación relativa provee una medida de los cambios relativos en la expresión del ARNm. No requiere curvas de calibración y puede efectuarse mediante correlación con algunos parámetros biológicos como ARN o ADN total, ADNc o bien, mediante la comparación de la expresión del gen de interés con la de otro gen de interés o con la del gen o la del panel de genes utilizados como normalizadores o controles endógenos de la cantidad de ARN extraído de las muestras y sometido a retrotranscripción (Pfaffl 2006, Kubista *et al* 2006). El proceso de normalización permite ajustar las medidas de expresión relativa entre las diferentes muestras, lo que minimiza las posibles fuentes de variabilidad en los ensayos y facilita la comparación de los resultados bajo condiciones diferentes. Como fuentes de error se podrían considerar diferentes cantidades de muestra,

diferentes eficiencias en la extracción del ARN y en la transcripción reversa, así como precisión en el uso de las pipetas (Kubista *et al* 2006).

En el presente estudio, en un comienzo se planeó cuantificar en forma relativa la expresión de TRF2, utilizando para ello un gen HKG de referencia.

- *Genes de referencia*

Para el efecto de normalizar con otros genes diferentes al de interés, se puede calcular la expresión relativa del gen de interés con relación a la de uno o varios genes de referencia. Como genes de referencia se deben seleccionar genes que se expresen con estabilidad, aunque estén sujetos a condiciones variables -como por ejemplo cuando pertenecen a distintos tipos de tejidos o cuando deben pasar a través de los diferentes estados del desarrollo- o a cambios en los parámetros experimentales. Por este motivo, usualmente los genes escogidos son los de tipo housekeeping (HKG), cuya expresión es constitutiva. Sin embargo, no existe un gen de referencia que pueda ser utilizado en forma universal. En modelos animales experimentales se ha demostrado que la expresión de los genes HKG puede variar en forma significativa entre tipos de tejidos y condiciones experimentales diferentes (Foss *et al* 1998, Bustin 2002, Bas *et al* 2004).

Como candidato a gen normalizador para la expresión de TRF2, en el presente estudio se examinó a GAPDH.

- *Expresión relativa de GAPDH*

En forma previa a la qPCR de las muestras experimentales, se determinó en forma cuantitativa la expresión de GAPDH en un total de diez muestras de cultivos de diferentes pases y donantes seleccionadas al azar. Debido en primer lugar, a que los niveles de expresión de GAPDH han sido reportados como menores que los de TRF2 y, en segundo lugar, a que los ciclos umbrales de detección del gen se mantuvieron dentro de un pequeño rango de variación inferior a dos ciclos, se asumió que se expresaba en forma relativamente estable y se procedió a efectuar la qPCR, tanto para GAPDH como para los genes de interés, con todas las muestras de células: las epiteliales y el grupo de control de fibroblastos ováricos de las mismas donantes. Sin embargo, al analizar los resultados, se encontró una elevada

variabilidad en los CT de GAPDH, muy superior a lo que hubiera sido deseable (menos de 50% de la variabilidad en la expresión del gen de interés).

GAPDH codifica una enzima que participa en las vías glicolítica y gluconeogénica, en las que cataliza la fosforilación oxidativa reversible del gliceraldehído-3-fosfato, función que permite inferir que la expresión de GAPDH es mayor en los tejidos que presentan una elevada demanda energética, como el muscular esquelético o el cardíaco (Barber *et al* 2005). En conjunto con  $\beta$ -actina, 18S del ARN ribosomal e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT), es uno de los genes HKG de referencia utilizados con mayor frecuencia, debido a que ha funcionado en forma apropiada como referente en el marco de experimentos semicuantitativos o no cuantitativos, como por ejemplo, en ensayos de protección de RNAsa, Northern blot y RT-PCR convencionales (Huggett *et al* 2005). Sin embargo, desde hace más de 25 años y a medida que tomó auge la qPCR, comenzó a hacerse evidente que su expresión estaba sujeta a regulación y que no era tan estable como se había creído. Así, Piechaczyk *et al* 1984, observaron que aunque no había variación en la tasa de transcripción del gen en diferentes tejidos de rata examinados, su contenido de ARNm sí era diferente. Por su parte, Barber *et al* 2005, analizaron la expresión del gen en un panel de 72 tejidos humanos y encontraron diferencias significativas entre los distintos tipos de tejidos - lo que se explica con base en demandas glicolíticas distintas - y aún entre donantes de un mismo tejido. A pesar de esto, ellos reportaron variaciones muy pequeñas en los niveles de expresión de GAPDH dentro de un mismo tejido. Así, para tejido ovárico, estimaron un total de 197059 copias de ARNm del gen por 100 ng de ARN total, e incluso propusieron este valor como posible estándar normalizador para ser utilizado en otros estudios. Es probable que a la elevada variabilidad en la expresión relativa de GAPDH en los cultivos primarios de las células estudiadas, contribuya el hecho de que también está involucrado en funciones celulares diferentes a las metabólicas básicas antes enunciadas. Se ha demostrado que, a nivel nuclear, GAPDH participa entre otros, en procesos de transcripción (Zheng *et al* 2003), regulación del ciclo celular (Carujo *et al* 2006), replicación y reparación del ADN (Meyer-Siegler *et al* 1991), exportación de ARNt (Singh y Green 1993), mantenimiento de los telómeros (Demarse *et al* 2009) y muerte celular (Ishitani *et al* 1996, Hara *et al* 2006b, Sen *et al* 2008). Con relación a la apoptosis, GAPDH tiene un papel dual: tanto a favor como en contra. El efecto

proapoptótico ocurre en células normales, como resultado de la acción de gran variedad de estresores, muchos de ellos asociados con estrés oxidativo, cuando GAPDH es S-nitrosilado por NO, gracias a la activación de la óxido nítrico-sintasa inducible ((NOSi). Esto hace que pierda su actividad catalítica y se una con la E3-ubiquitinligasa denominada Siah1 (*del inglés "seven in absentia homolog 1"*) para formar un complejo que ingresa al núcleo y da inicio a una cascada de degradación de proteínas y a la apoptosis (Ishitani *et al* 1996, Hara *et al* 2006b). En forma semejante, Sen *et al* 2008 demostraron que, en el núcleo, la proteína de unión p300/CREB acetiltransferasa (CBP) acetila a GAPDH en la lisina 160 lo que, a su vez, resulta en la activación de p300/CBP y, por tanto, en la activación posterior de blancos corriente abajo como p53, con la consecuente inducción de muerte celular. Por otra parte, el papel antiapoptótico de GAPDH se ha reportado en células cuya membrana mitocondrial externa se ha permeabilizado, evento que usualmente conduce a la activación de las caspasas y la apoptosis, pero carecen de proteínas blanco corriente abajo de la vía mitocondrial, como APAF-1. Sin embargo, si los niveles de GAPDH son elevados, se mantiene el  $\Delta\Psi_m$  - a través del aumento del ATP - de modo que se interrumpe la activación de las caspasas y las células pueden progresar hacia la transformación maligna (Ferraro *et al* 2003, Revillion *et al* 2000). Pero además, Colell *et al* 2007 demostraron que, bajo condiciones de permeabilización de la membrana mitocondrial externa, el GAPDH nuclear protege a las células contra la muerte independiente de caspasas y promueve la supervivencia, debido a que induce la expresión de una proteína llamada atg12 (*del inglés "autophagy-related protein 12"*). Según Colell *et al* 2007, atg12 puede facilitar la autofagia, de manera que se puedan eliminar las mitocondrias dañadas en forma irreversible, mientras que, al mismo tiempo, los elevados niveles de GAPDH se encargan de aumentar la glicólisis y por tanto el ATP requerido para la supervivencia celular.

En el presente estudio fue interesante notar que las mayores fluctuaciones tanto en las medias como en las medianas de expresión de GAPDH ocurrieron cuando la edad de los cultivos aumentó más allá del pase cuatro. No deja de ser tentadora la posibilidad de relacionar este incremento en la variabilidad de la expresión del gen con el momento en el que, según nuestros resultados, se inició la senescencia de las células epiteliales. Se podría hipotetizar por ejemplo, que tanto la tendencia al

aumento como las fluctuaciones en los niveles de GAPDH estarían relacionados con un intento desesperado de la células cultivadas por sobrevivir, que se traduciría en la activación por una parte de la vía autofágica y, por otra, de la glicolítica, con el supuesto de así evadir la muerte y asegurar las reservas energéticas necesarias para la supervivencia.

Habría sido deseable normalizar la expresión de TRF2 mediante coamplificación de un panel de múltiples genes HKG. Sin embargo, este método implica validaciones costosas y dispendiosas, lo que hace que, en la práctica, sea común el uso de un solo gen de referencia. Sin embargo, la elevada variabilidad en la expresión de GAPDH nos llevó a considerar otras opciones de normalización, diferentes a la efectuada con genes de referencia, como se explica más adelante.

- *Estrategias de normalización*

Cuando se trata de normalizar con genes de referencia, se puede escoger entre dos modelos básicos, a saber:

- cálculo rápido de expresión relativa (Livak y Schmittgen 2001), basado en un supuesto de eficiencia de 100%, tanto para el gen de estudio como para el de referencia, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

en la que  $-\Delta\Delta CT = -\Delta CT^{\text{gen estudio (muestra-control)}} - \Delta CT^{\text{gen referencia (muestra-control)}}$

En esta fórmula, la expresión relativa del gen de interés depende del control no sometido a tratamiento y es presentada como el número de veces que cambia con relación a la expresión del gen de referencia. Para procesar los datos con esta fórmula, se debe asumir que la expresión del control no tratado es siempre igual a 1 (Livak y Schmittgen 2001).

- cálculo de expresión relativa corregida (Pfaffl 2006), basado en la razón de la eficiencia de amplificación del gen de estudio con relación a la del gen de referencia, y elevada cada una a la diferencia de los valores de CT de la muestra y del control respectivo, según la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{[E \text{ gen estudio}]^{\Delta CT^{\text{gen estudio (muestra-control)}}}}{[E \text{ gen referencia}]^{\Delta CT^{\text{gen referencia (muestra-control)}}}}$$

$$[E \text{ gen referencia}]^{\Delta CT^{\text{gen referencia (muestra-control)}}}$$

Sin embargo, la aplicación de los dos modelos anteriores fue descartada en razón de la elevada variabilidad que mostró la expresión de GAPDH.

Un tercer modelo, llamado  $\Delta C'_T$ , es aplicable en los casos en que la cantidad de ARN de entrada es muy baja o cuando se desea investigar cómo es la expresión de un gen candidato a normalizador, o la de un gen de interés, cuando ambos se encuentran bajo idénticas condiciones experimentales de tratamiento (en el presente estudio, las condiciones de cultivo). A diferencia del modelo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , el modelo  $\Delta C'_T$  no utiliza datos generados dentro de la propia PCR en tiempo real, sino que requiere normalizar con alguna medida externa al experimento - como la absorbancia a la radiación UV - de modo que se pueda calcular la cantidad de ARN sometido a retrotranscripción (Livak y Schmittgen 2001). En este caso, asumiendo una eficiencia del 100%, la fórmula es la siguiente:

Expresión relativa =  $2^{-\Delta C'_T}$ , en la que  $\Delta C'_T = CT_{\text{tiempo } x} - CT_{\text{tiempo } 0}$

Esta fórmula puede ser aplicada para analizar la expresión relativa de un gen, tomando en consideración la eficiencia real de la amplificación. Los datos obtenidos con TRF2 y GAPDH fueron normalizados de acuerdo con el modelo  $\Delta C'_T$ , debido a la concordancia entre las condiciones de nuestro estudio y las requeridas para su aplicación, en lo que se refiere al hecho de que ambos genes estuvieron sometidos a las mismas condiciones de cultivo y a que la cantidad de ARN de entrada había sido previamente normalizada, con base en la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. En consecuencia, los valores de eficiencia de amplificación obtenidos en nuestro estudio (1,94 para TRF2 y 1,93 para GAPDH) fueron elevados a la diferencia de CTs (CT del pase analizado menos CT del primer pase). Aunque hubiera sido deseable cuantificar la expresión de los genes en un tiempo cero (0), la cantidad de tejido recolectado fue tan pequeña que no permitió hacerlo. A este respecto, debe tenerse en cuenta que el primer pase de cultivo se caracteriza por reproducir en forma muy cercana a la realidad cuanto acontece a nivel de las células *in situ*.

En este orden de ideas, los datos obtenidos en la qPCR fueron normalizados mediante dos estrategias: según el modelo  $\Delta C'_T$  y según la cantidad de ARN de entrada. A este respecto, se puede afirmar que la estrategia de normalizar sólo con

base en la cantidad de ARN de entrada es válida cuando no existen opciones diferentes (Bergkvist *et al* 2008, Kubista *et al* 2006, Kubista 2010), en especial cuando se trabaja con cultivos celulares, en los que hallar un gen con expresión estable constituye un verdadero reto. Vale la pena anotar que existen reportes que muestran que la normalización con ARN total proveyó incluso mejores resultados en comparación con la efectuada con un gen normalizador como GAPDH, tal como lo señalaron Abranches *et al* 2006 quienes, mediante qPCR, determinaron niveles de expresión génica en cultivos de células madre nerviosas.

- ***Expresión relativa de TRF2***

En el presente estudio no se hallaron diferencias significativas en la expresión de TRF2, que estuvieran asociadas con la edad cronológica de las donantes o con la edad de los cultivos en términos de pases. No obstante, al analizar la tendencias de las medias, se notó una disminución desde el pase dos hasta el cuatro, seguida por un aumento a partir del cuatro y así continuó hasta el siete mientras que, cuando se examinó la tendencia de las medianas, se observaron fluctuaciones -aumentos y disminuciones- y, hacia el pase siete, un marcado incremento que no puede ser considerado como significativo, debido al reducido tamaño de muestra disponible en este pase. Es evidente entonces que, a medida que los cultivos envejecieron, disminuyó la capacidad de las células epiteliales para mantener la estabilidad de los niveles de expresión de TRF2 y que en apariencia, se produjeron alteraciones en la expresión del gen. Al respecto, existe evidencia de que la inhibición de TRF2 provoca daño en el casquete telomérico y activación de las vías de señalización dependientes de ATM (*del inglés "Ataxia telangiectasia mutated"*) (Karlseder *et al* 2004), en conjunto con la aparición de focos nucleares de proteínas de respuesta al daño del ADN, como la histona fosforilada  $\gamma$ H2AX, 53BP1 (*del inglés "p53 binding protein 1"*), MDC1 (*del inglés "Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1"*) y NBS1 (*del inglés "Nijmegen breakpoint syndrome"*) (D'Adda di Fagagna *et al* 2003, Zhang *et al* 2006). Se ha demostrado que cuando TRF2 está activado, se une a ATM e impide la activación de éste (Karlseder *et al* 2004). Sin embargo, cuando TRF2 está inhibido, ATM puede actuar como sensor de la ruptura de la doble cadena de ADN, de modo que se autofosforila en la serina 1981, en una forma que

le permite activar sustratos corriente abajo, como las proteínas P53 y Chk2 y factores de reparación del ADN, como H2AX y NBS1 (Burma *et al* 2001). Por otra parte, en las células mitóticas, la inhibición de TRF2 provoca disfunción telomérica y ésta, a su vez, es causante de la activación de las vías de reparación de la doble cadena de ADN y de toda una serie de eventos asociados, como la inducción de p53 y/o de Rb, así como de aumentar la actividad del biomarcador de senescencia SA- $\beta$ -gal (Herbig *et al* 2004, Karlseder *et al* 2002), de modo que es posible inferir que las alteraciones de TRF2 a nivel telomérico pueden inducir senescencia en células proliferantes, como lo comprobaron Zhang *et al* 2006 y como podría inferirse a partir de los resultados obtenidos en la determinación del estado senescente en el presente estudio. Según estos investigadores, la razón para este hecho consiste en que la disfunción de TRF2 es “detectada” por ATM o por las proteínas asociadas, lo que hace que se activen las vías de señalización de respuesta al daño del ADN. En este contexto, P53 estaría jugando un papel central en la decisión que la célula debe tomar ante el daño del ADN: senescencia o apoptosis. En la toma de esta decisión incidirían factores como la extensión del daño y el tipo de modificación posttraduccional experimentada por el gen, que determinaría una conformación especial con afinidad diferencial por posibles genes blanco o por las diversas proteínas que actúan como blancos transcripcionales (Webley *et al* 2000, Whal y Carr 2001, Chuaire-Noack *et al* 2008). En contraposición, se ha reportado que la sobreexpresión de TRF2 está asociada con acortamiento telomérico (Karlseder *et al* 2002), lo que finalmente se puede traducir en envejecimiento o en transformación maligna, eventos acompañados por inestabilidad genómica. De acuerdo con este cuerpo de evidencias, se puede inferir que, cualquiera sea el tipo de alteración en la expresión de TRF2, tiene impacto en el destino de las células afectadas, en el sentido de que eventualmente ellas se tornarían senescentes o apoptóticas o, en el peor escenario posible, en cancerosas (Muñoz *et al* 2006). Las fluctuaciones en la expresión podrían ser interpretadas como señal de disfunción generada por el estrés del cultivo. Es interesante que el estrés de tipo oxidativo y aún el mecánico, hayan sido reportados como desencadenantes de disfunción de TRF2 (Oh *et al* 2003).

- **Expresión relativa de hTERT**

Aunque no fue posible identificar diferencias significativas en las frecuencias de expresión de hTERT, asociadas con la edad cronológica de las donantes, o con la edad de los cultivos en términos de pases, vale la pena anotar que, hacia el pase tres, hubo un incremento marcado. Al respecto, teniendo en cuenta que en este tipo de células la senescencia se inició alrededor del pase cuatro de cultivo, un aumento en la frecuencia de expresión en un pase previo al inicio del estado senescente podría estar mostrando un significado funcional. Es posible, como se ha reportado en estudios previos, que la expresión de hTERT en células presenescentes esté relacionada con la puesta en marcha de mecanismos protectores contra la transformación maligna, más exactamente con el inicio de la senescencia, cuyo papel antitumorigénico ha sido claramente demostrado. Estudios previos han reportado una discreta expresión de hTERT en displasias y metaplasias de tejidos adyacentes a tejidos cancerosos, lo que indica que puede expresarse en lesiones precancerosas y que, por tanto, las células hTERT positivas podrían ser precancerosas (Shao *et al* 2003). Sin embargo, hallazgos de actividad telomerasa en células presenescentes, que han estabilizado su longitud telomérica y retrasado el inicio del estado senescente (Cottliar y Slavutsky 2001), han llevado a replantear la creencia de que las funciones de la enzima se limitan a asegurar la proliferación de las células progenitoras de las cancerosas, así como la renovación de los tejidos normales. En este orden de ideas, existe evidencia creciente de que hTERT participa en otros procesos celulares como la regulación de la apoptosis a nivel de la mitocondria: por una parte, la promueve, mediante la inducción de cambios en el potencial de membrana o de la homeostasis de los metales (Santos *et al* 2004, Santos *et al* 2006) y, por otra, la suprime gracias a la interacción con vías de reparación en el núcleo (Cong y Shay 2008). Otros estudios relacionan a hTERT con la respuesta al daño del ADN, en forma independiente a su papel en el mantenimiento de la longitud telomérica (Masutomi *et al* 2003), así como con la adición de repeticiones teloméricas a puntos de ruptura del ADN intracromosómico (Stellwagen *et al* 2003). Su papel en procesos de reparación del ADN ha sido confirmado por el hallazgo de que hTERT se asocia en forma física con los telómeros y con las proteínas de la maquinaria de reparación (Sharma *et al* 2003). Es importante además reseñar que hTERT juega un papel importante en la regulación de la expresión de un amplio espectro de genes, como por ejemplo los

que promueven o inhiben el crecimiento celular o bien aquellos que codifican para enzimas glicolíticas, hecho que permite establecer una relación entre hTERT y los procesos de metástasis propios del cáncer (Bagheri *et al* 2006).

## **8.6. Anormalidades cromosómicas**

Nuestro estudio mostró que, tanto el número total de metafases como el de metafases normales, fue mayor en los cultivos de los tejidos de las donantes más jóvenes. En los cultivos de las mayores, aunque hubo proliferación, la capacidad de respuesta a las condiciones de cultivo fue más lenta. Esta reducción en la capacidad replicativa, así como los cambios senescentes previamente reportados en la literatura (Ben-Porath y Weinberg 2005, Katakura 2006, Campisi y D'Adda di Fagagna 2007), pueden incidir en la aparición de las anomalías cromosómicas descritas en este estudio. Al respecto, en muchos casos, las células epiteliales mostraron poliploidías desde el primer pase del cultivo. La pregunta obligada es si este tipo de anomalía numérica estaba presente *in vivo*, o por el contrario, fue inducida por el estrés propio del cultivo. Si se tiene en cuenta que las poliploidías aparecen durante la división celular y que además el epitelio superficial del ovario es un tejido sujeto a una elevada tasa de renovación en el sitio de la ruptura provocada por la ovulación, es posible que dichas anomalías hubiesen aparecido con antelación a la toma de la muestra. Esta idea cobraría más fuerza al considerar que el análisis del cariotipo se efectuó en el primer pase, es decir en una forma relativamente próxima a la remoción del tejido. Sin embargo, de haber ocurrido este hecho, confirmaría que la probabilidad de aparición de poliploidías en el epitelio superficial del ovario *in vivo* es mayor en mujeres mayores de 50 años. Por otra parte, las anomalías halladas no correspondieron a casos aislados, sino que fueron de tipo clonal. Este hecho apoya la idea de que la aparición de dichas anomalías no fue inducida por el estrés del cultivo.

La aparición de las poliploidías está relacionada con inestabilidad cromosómica y por tanto con un mayor riesgo de sufrir transformación tumoral, como también con la aparición del estado senescente, lo que puede ser explicado en razón de la replicación del ADN en ausencia de mitosis, comportamiento usual en la senescencia (Sherwood 1988, Wagner *et al* 2001, Walen 2005, Walen 2006). Por este motivo, se considera a las poliploidías como predictoras de riesgo de cáncer y

también como marcadoras de senescencia (Jones y Ravid 2004, Yang *et al* 2007). En este orden de ideas, nuestros resultados sugieren que las células del epitelio superficial del ovario en cultivo se tornaron senescentes en forma temprana y con mayor frecuencia en los tejidos de las donantes mayores de 50 años. Sobre las ventajas adaptativas que este hecho representa a nivel celular, se ha propuesto que en edades tempranas la senescencia celular actúa como mecanismo supresor tumoral (Collado *et al* 2005, Michaloglou *et al* 2005), mientras en las avanzadas promueve la tumorigénesis (Campisi 2003a, Campisi 2003b).

Como factor predictor de riesgo de cáncer, la poliploidización parece ser una etapa crucial en la evolución de aneuploidías y en la carcinogénesis (Atkin 2000). En particular, las tetraploidías corresponden a estados cromosómicos que han sido asociados con desarrollo de aneuploidías e inestabilidad cromosómica (Margolis *et al* 2003), aunque también pueden aparecer en células germinales y somáticas. Las tetraploidías germinales, muy raras, son incompatibles con la vida y se originan como resultado de una mitosis defectuosa durante el desarrollo embrionario temprano (Guc-Scekic *et al* 2002). En las células somáticas humanas son frecuentes, en especial en tejidos con elevada capacidad de autorrenovación, como hígado, placenta y ciertas células hematopoyéticas (Brodsky y Uryvaeva 1977, Zybina y Zybina 2005, Ravid *et al* 2002), y en otros que normalmente no proliferan, como el músculo cardíaco. En este caso, se cree que la poliploidización actúa como mecanismo adaptativo contra el daño del ADN y el estrés oxidativo.

En nuestro estudio, seis de un total de 26 células en metafases (23.1%), así como seis de las 16 células con metafase anormal (37.5%) que fueron analizadas en pase uno, incluyeron tetraploidías, mientras que en el pase cuatro, este tipo de aberración se presentó en tres del total de seis células en metafase (50%) y en tres de las cuatro células con metafase anormal (75%). Es pertinente considerar que las tetraploidías aparecen en forma temprana en la transformación maligna (Olaharski *et al* 2006, Collado *et al* 2005, Barrett *et al* 2003) y son comunes en estados precancerosos y cancerosos de varios tipos de tejidos (Cahill *et al* 1999), como el epitelio superficial del ovario (Greenebaum *et al* 1994, Bayani *et al* 2008), en los que su presencia está correlacionada en forma significativa con un riesgo aumentado de progresión tumoral (Teixeira *et al* 2002, Pérez *et al* 2002, Tanja *et al* 2002, Watter *et al* 2003).

## 9. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron que el método de cultivo utilizado para el crecimiento (técnica de separación epitelio-estroma, disgregación mecánica y enzimática, medios de cultivos), tanto de las células epiteliales como de los fibroblastos ováricos, mostró sus bondades, las que se tradujeron en una capacidad replicativa que, en acuerdo con hallazgos previos, no se extiende más allá de los pases 7-10.
- Las células epiteliales ováricas se tornaron senescentes hacia el pase cuatro, a semejanza de lo ocurrido con los fibroblastos y en simultaneidad con un descenso en la capacidad replicativa de los cultivos. Esta similitud refuerza la hipótesis de interconversión epitelio-mesenquimática que explicaría eventos asociados con la transformación maligna de las células epiteliales.
- La actividad SA- $\beta$ -gal podría ser considerada como biomarcador tanto del estado senescente (III), como del inicio del descenso de la capacidad replicativa que caracteriza a la fase de crecimiento exponencial lento (IIb) en células epiteliales ováricas cultivadas.
- La activación de la SA- $\beta$ -gal está más relacionada con la ocurrencia de una determinada fase del crecimiento, en este caso las fases IIb y III, que con la edad del cultivo, como lo evidenció la heterogeneidad de los valores de actividad enzimática.
- Hubo evidencia de la asociación existente entre el envejecimiento y una mayor actividad SA- $\beta$ -gal en células epiteliales pases que corresponden a la fase III, cuando ya se ha iniciado la senescencia.
- No todas las células responden a la inducción de senescencia con un aumento en la actividad SA- $\beta$ -gal, hecho que sugiere una posible inactivación de las vías de respuesta al estrés de tipo oxidativo.
- Ni la edad cronológica de las donantes ni la edad de los cultivos en términos de pases parecieron afectar la expresión de hTERT, TRF2 y GAPDH, no obstante las tendencias observadas en las medianas de los dos últimos genes muestran una elevada variabilidad en los pases tardíos de cultivo. Esta variabilidad podría constituir un indicio de la ocurrencia de alteraciones

en el control de la expresión de TRF2 y de GAPDH cuando las células se encuentran en estado senescente y en cuya interpretación debe tomarse en consideración la diversidad de funciones que ejercen a nivel celular.

- Se estableció que hubo un incremento cercano al nivel de significancia en la frecuencia de expresión de hTERT - en simultaneidad con un aumento en la actividad SA- $\beta$ -gal - en células presenescentes, evento que podría estar asociado con un intento de estabilizar los telómeros y retrasar así el inicio de la senescencia en células epiteliales ováricas cultivadas.
- La variabilidad de la expresión de GAPDH en los cultivos de células epiteliales del ovario fue muy elevada, motivo por el cual no es aconsejable utilizarlo como gen normalizador en este tipo de cultivos.
- La tendencia hacia la disminución de las medias de expresión de GAPDH en pases tempranos de cultivo de células epiteliales, en correlación inversa con la actividad SA- $\beta$ -gal, sugiere un efecto antagónico con la inducción de senescencia en este tipo de cultivos. Por otra parte, la tendencia al aumento en pases avanzados, también en correlación inversa con la actividad SA- $\beta$ -gal, podría indicar que GAPDH participa en la activación de la vía autofágica.
- Una mayor frecuencia de aparición de poliploidías en cultivos de donantes mayores de 50 años sugiere que la probabilidad de aparición de esta anomalía en el epitelio superficial del ovario *in vivo* es mayor en las mujeres de esta edad.

## 10. RECOMENDACIONES

- Es importante profundizar en el estudio de los marcadores de senescencia en el epitelio superficial del ovario, si se tiene en cuenta que la senescencia celular es marcador *per se* de envejecimiento, que éste a su vez está asociado con mayores probabilidades de aparición de enfermedades hiperproliferativas y que el tejido en cuestión presenta una elevada susceptibilidad a la transformación tumoral. Es aconsejable explorar todo un conjunto de marcadores tales como la presencia de focos de heterocromatina y expresión de genes como p16, DEC, p15 y DCR2.

- Debido a la asociación que existe, tanto entre la acumulación de células senescentes a nivel tisular con el riesgo de carcinogénesis, como entre ésta y la presencia de anormalidades cromosómicas, hallazgos de esta naturaleza deberían tener repercusión en el campo clínico, en situaciones específicas tales como:
  - Identificación de cambios preneoplásicos en el ovario normal contralateral al ovario diagnosticado con cáncer
  - Evaluación de los cambios de actividad SA- $\beta$ -gal o cariotípicos en el epitelio superficial ovárico adyacente al carcinoma de este tejido.
  - Comparación de los niveles de actividad SA- $\beta$ -gal o de anormalidades cromosómicas en los ovarios de gemelas monocigóticas, una de las cuales haya tenido cáncer ovárico.
  - Comparación de los niveles de actividad SA- $\beta$ -gal o del cariotipo de los ovarios removidos profilácticamente en mujeres con riesgo de cáncer y los de la población general (Wong y Auersperg 2003).
  - Análisis de actividad SA- $\beta$ -gal y/o del cariotipo en muestras de tejido ovárico tomadas mediante aspiración dirigida por ultrasonografía o laparoscopia en mujeres que desean preservar su fertilidad o someterse a procedimientos de fertilización *in vitro* (Greenebaum *et al* 1994).
- Se recomienda además efectuar el estudio de la expresión de TRF2 y hTERT en una muestra poblacional de mayor tamaño, con el fin de confirmar o bien, refutar los resultados obtenidos en el presente estudio, así como determinar la actividad telomerasa y la longitud de los telómeros en cultivos de células epiteliales ováricas.
- Vale la pena también efectuar estudios adicionales tendientes a determinar por qué motivo la capacidad replicativa y la actividad SA- $\beta$ -gal de las células cultivadas disminuyeron en forma notoria con posterioridad al pase siete, abandonando el patrón clásico de la curva de crecimiento descrita para explicar el comportamiento replicativo de los cultivos primarios. En este sentido sería deseable identificar marcadores de autofagia como LC3I y LC3II mediante inmunoblot o inmunoprecipitación.

## 11. REFERENCIAS

- Abranches E, O'Neill A, Robertson MJ, Schaffer DV, Cabral JM. 2006. Development of quantitative PCR methods to analyze neural progenitor cell culture state. ***Biotechnol Appl Biochem***. 44:1-8.
- Adams AT, Auersperg N. 1981. Transformation of cultured rat ovarian surface epithelial cells by Kirsten murine sarcoma virus. ***Cancer Res*** 41:2063–2072.
- Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. 2007. Epithelial–mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. ***J Cell Physiol*** 213:581-518
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC.1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 93:13742–13747.
- Alvero AB, Fishman DA, Qumsiyeh MB, Garg M, Kacinski BM, Sapi E. 2004. Telomerase prolongs the lifespan of normal human ovarian surface epithelial cells without inducing neoplastic phenotype. ***J Soc Gynecol Investig*** 11:553-561.
- Atkin NB. 2000. Chromosomal doubling: the significance of polyploidization in the development of human tumors: possibly relevant findings on a lymphoma. ***Cancer Genet Cytogenet*** 116:81-83.
- Auersperg N, Maines-Bandiera SL 2000 Culture and characterization of human ovarian surface epithelium. En: Bartlett JMS (ed) *Ovarian Cancer Methods Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 169–173.
- Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG, Kruk PA. 1994. Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. ***Lab Invest*** 71:510–518.
- Auersperg N, Pan J, Grove BD, Peterson T, Fisher J, Maines-Bandiera S, Somasiri A, Roskelley CD. 1999. E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 96:6249-6254.
- Auersperg N, Siemens CH, Myrdal SE. 1984. Human ovarian surface epithelium in primary culture. ***In vitro*** 20:743-755.

- Auersperg N, Wong AS, Choi K, Kang SK, Leung PCK. 2001. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. *Endocr Rev* 22: 255-288.
- Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ. 2000. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol* 16: 567-576.
- Bagheri S, Nosrati M, Li S, Fong S, Torabian S, Rangel J, Moore DH, Federman S, Laposi RR, Baehner FL, Sagebiel RW, Cleaver JE, Haqq C, Debs RJ, Blackburn EH, Kashani-Sabet M. 2006. Genes and pathways downstream of telomerase in melanoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11306-11311.
- Ballabio A. 2009. Impairment of autophagy in lysosomal storage diseases. *Mol Genet Metab* 96:S14.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21:389-395.
- Barrett MT, Pritchard D, Palanca-Wessel C, Anderson J, Reid BJ. 2003. Molecular phenotype of spontaneously arising 4N (G2-tetraploid) intermediates of neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 63:4211e7.
- Bas A, Forsberg G, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. 2004. Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, b-Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scand J Immunol* 59, 566–573.
- Bassaneze V, Miyakawa AA, Krieger JE. 2008. A quantitative chemoluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Anal Biochem* 372:198-203.
- Bast RC, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. 1998. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers* 13:179-187.
- Bast RC. 2004. Early Detection of Ovarian Cancer: New technologies in pursuit of a disease that is neither common nor rare. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 115: 233-248.

- Baxter MA, Gin RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. 2004. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. **Stem Cells** 22:675-682.
- Bayani J, Paderova J, Murphy J, Rosen B, Zielenska M, Squire JA. 2008. Distinct patterns of structural and numerical chromosomal instability characterize sporadic ovarian cancer. **Neoplasia** 10:1057-1065.
- Beausejour CM, Campisi J. 2006. Balancing regeneration and cancer. **Nature** 443:4004-4405.
- Behrman, HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. 2001. Oxidative stress and the ovary. **J Soc Gynec Invest** 8:S40-S42.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. **Int J Biochem Cell Biology** 37:961-976.
- Bergkvist A, Forootan A, Zoric N, Strombom L, Sjoback R, Kubista M. 2008. Choosing a normalization strategy for RT-PCR. Genetic Engineering & Biotechnology News, Vol 28, No. 13. En: <http://www.tataa.com>. Fecha último acceso: abril 2 de 2010.
- Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW, Bohr VA, Kølvrå S, Christensen K. 2006. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. **Epidemiology** 17:190 -194.
- Blasco MA. 2003. Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. **Eur J Cell Biol** 82:441-446.
- Blasco MA. 2005. Telomeres and human disease: cancer, ageing and beyond. **Nat Rev Genetics** 6:611-622.
- Brodsky WY, Uryvaeva IV. 1977. Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. **Int Rev Cytol** 50: 275-332
- Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GS, Kricka LJ. 1994. Chemoluminescent and bioluminescent reporter gene assays. **Anal Biochem** 219:169-181.
- Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. 2003. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 23:842-846.

- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276:462-467.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193.
- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23–39.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. 1999. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 9:M57–M60.
- Calcagnile O, Gisselsson D. 2007. Telomere dysfunction and telomerase activation in cancer – a pathological paradox? *Cytogenet Genome Res* 118:270-276
- Campisi J, D'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Mol Cell Biol* 8: 729-740.
- Campisi J. 2003. Cancer and ageing: rival demons? *Nature Rev Cancer* 3:339-349.
- Campisi J. 2003. Cellular senescence and apoptosis: How cellular responses might influence ageing phenotypes. *Exp Geront* 38:5-11.
- Campisi J. 2005. Aging, tumor suppression and cancer: High-wire act! *Mech Ageing Dev* 126: 51-58.
- Cancer Facts & Figures 2008. American Cancer Society. En: <http://www.cancer.org/> (Fecha último acceso: octubre 21 de 2009).
- Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. 2002. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 21:3130-3138.
- Carujo S, Estanyol, JM, Ejarque A, Agell N, Bachs O, Pujol MJ. 2006. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SETbinding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity. *Oncogene* 25:4033–4042.
- Choi JH, Choi KC, Auersperg N, Leung PCK. 2004. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrin & Metabolism* 89:5508-5516.
- Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC. 2007. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev* 28: 440-461.

- Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PCK. 2001. The regulation of apoptosis by activin and transforming growth factor-B in early neoplastic and tumorigenic ovarian surface epithelium. *J Clin Endocrin & Metabolism* 86:2125-213.
- Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auesperg N, Leung PCK. 2002. Follicle stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrin & Metabolism* 87:2245-2253.
- Choi KC, Tai CJ, Tzeng CR, Auersperg N, Leung PCK. 2003. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in pre-neoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod* 68:309-315.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Chuaire-Noack L, Sanchez-Corredor MC, Ramirez-Clavijo S. 2008. P53 y su papel en el epitelio superficial del ovario: Revisión. *Invest Clín* 49:561-593.
- Coates SS, Lehnert BE, Sharma S, Kindell SM, Gary RK. 2007. Beryllium induces premature senescence in human fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 322:70-79.
- Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, Beere HM, Green DR. 2007. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell* 129:983-997.
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642.
- Cong Y, Shay JW. 2008. Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Res* 18:725-732.
- Cottliar AS, Slavutsky IR. 2001. Telómeros y actividad de telomerasa: Su participación en el envejecimiento y el desarrollo neoplásico. *Medicina (Buenos Aires)* 61:335-342.

- Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, Sedivy JM, Weinberg RA. 1998. Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 95:14723-14728.
- Czernobilsky B. 1985. Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary. ***Eur J Cell Biol*** 37:175–190.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. ***Nature*** 13:194-198.
- Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, Dey SK. 2005. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. ***Cancer Res*** 65:3735-3744.
- de Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. ***Genes Dev*** 19:2100-2110.
- Demarse NA, Ponnusamy S, Spicer EK, Apohan E, Baatz JE, Ogretmen B, Davies C. 2009. Direct Binding of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase to Telomeric DNA Protects Telomeres against Chemotherapy-Induced Rapid Degradation. ***J Mol Biol*** 394:789-803.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 92:9363-9367.
- Duan J, Zhang Z, Tong T. 2005. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA damage and repair genes and telomere shortening. ***Int J Biochem Cell Biol*** 37:1407-1420.
- Dunfield LD, Shepherd TG, Nachtigal MW. 2002. Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cells. ***Biol Proced Online*** 4: 55-65.
- Elliot WM, Auersperg N. 1993. Growth of normal human ovarian surface epithelial cells in reduced-serum and serum-free media. ***In vitro Cell Dev Biol*** 29A:9-18.

- Fathalla MF. 1971. Incessant ovulation -a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 2:163.
- Ferraro E, Corvaro M, Cecconi F. 2003. Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. *J Cell Mol Med* 7:21–34.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247.
- Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. 2002. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn in on, and turn off again. *Differentiation* 69:188-197.
- Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* 9:67–78.
- Fronhoffs S, Totzke G, Stier S, Wernert N, Rothe M, Bruning T, Koch B, Sachinidis A, Vetter H, and Ko Y. 2002. Method for the rapid construction of cRNA standard curves, in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 16: 99-110.
- Gaytán M, Sánchez MA, Morales M, Bellido C, Millán Y, Martín de las Mulas J, Sánchez-Criado JE, Gaytán F. 2005. Cyclic changes of the ovarian surface epithelium in the rat. *Reproduction* 129:311-321.
- Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, French M. 2003. Association of increased autophagic inclusions labeled for  $\beta$ -galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol* 38:887-895.
- Giles JR, Olson LM, Johnson PA. 2006. Characterization of ovarian surface epithelial cells from the hen: a unique model for ovarian cancer. *Exp Biol Med* 231:1718-1725.
- Gilson E, Géli V. 2007. How telomeres are replicated. *Mol Cell Biol* 8:825-838.
- Gossrau R, Lojda Z, Steward PJ. 1991. Glycosidase. En: Histochemistry: theoretical and applied. Stoward PJ, Everson Pearse AG, Eds: 241-279. Churchill Livingstone, Edinburgh. Citado por: Maier AB, Westendorp RG, Van Heemst D. 2007.  $\beta$ -galactosidase activity as a biomarker of replicative

- senescence during the course of human fibroblast cultures. *Ann NY Acad Sci* 1100:323-332.
- Greenaway J, Moorhead R, Shaw P, Petrik J. 2008. Epithelial-stromal interaction increases cell proliferation, survival and tumorigenicity in a mouse model of human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 108:385-394.
  - Greenebaum E, Yee HT, Liu J. 1994. DNA ploidy of ovarian and adnexal cyst fluid. A useful adjunct to cytology. *Acta Cytol* 38:201-208.
  - Gregoire L, Munkarah A, Rabah R, Morris RT, Lancaster WD. 1998. Organotypic culture of human ovarian surface epithelial cells: a potential model for ovarian carcinogenesis. *In vitro Cell Dev Biol* 34:636-639.
  - Gregoire L, Rabah R, Schmelz EM, Munkarah A, Roberts PC, Lancaster WD. 2001. Spontaneous malignant transformation of human ovarian surface epithelial cells in vitro. *Clin Cancer Res* 7:4280-4287.
  - Greider CW. 1998. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:90-92.
  - Griffith JD, Corneau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503-514
  - Guc-Scekic M, Milasin J, Stevanovic M, Stojanov LJ, Djordjevic M. 2002. Tetraploidy in a 26-month-old girl (cytogenetic and molecular studies) *Clin Genet* 61:62-65.
  - Hannah R, Stroke I, Betz N. 2003. Beta-glo® assay system: a luminescent B-galactosidase assay for multiple cell types and media. *Cell Notes* 6:16-18. En: [www.promega.com](http://www.promega.com). Fecha último acceso: octubre 11 de 2009.
  - Hara MR, Cascio MB, Sawa A. 2006a. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochim Biophys Acta* 1762: 502-509.
  - Hara MR, Thomas B, Cascio MB, Bae BI, Hester LD, Dawson VL, Dawson TM, Sawa A, Snyder SH. 2006b. Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3887–3889.
  - Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
  - Hayflick L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.

- Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 (C1P1), but not p16 (INK4a). *Mol Cell* 14: 501-513.
- Herbst AL. 1994. The epidemiology of ovarian carcinoma and the current status of tumor markers to detect disease. *Am J Obstet Gynecol* 170:1099-1105.
- Hikita C, Vijayakumar S, Takito J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Al-Awqati Q. 2000. Induction of terminal differentiation in epithelial cells requires polymerization of hensin by galectin. *J Cell Biol* 151:1235–1246.
- Horikawa I, Oshimura M, Barrett JC. 1998. Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Mol Carcinog* 22: 65-72.
- Huggett J, Dheda K, Bustin SA, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalization, strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279-284.
- Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, Saunders P, Katsube N, Chuang DM. 1996 Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *J Neurochem* 66:928-935.
- Jacobs I, Bast Jr RC. 1989. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 4:1-12.
- Janzen V, Forkert R, Fleming HE, Saito Y, Waring MT, Dombkowski DM, Cheng T, DePinho RA, Sharpless NE, Scadden DT. 2006. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443:421-426
- Jenkins EC, Velinov MT, Ye L, Gu H, Li S, Jenkins Jr. EC, Brooks SS, Pang D, Devenny DA, Zigman WB, Schupf N, Silverman WP. 2006. Telomere shortening in T lymphocytes of older individuals with Down syndrome and dementia. *Neurobiol Aging* 27:941-945
- Ji Q, Liu PI, Chen PK, Aoyama C. 2004. Follicle stimulating hormone-induced growth promotion and gene expression profiles on ovarian surface epithelial cells. *Int J Cancer* 12:803-814.
- Jones MR, Ravid K. 2004. Vascular smooth muscle polyploidization as a biomarker for aging and its impact on differential gene expression. *J Biol Chem* 279:5306-5313.

- Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, de Lange T. 2004. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2: E240.
- Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. 2002. Senescence induced by altered telomere state not telomere lost. *Science* 295:2446-2449.
- Katakura Y. 2006. Molecular basis for the cellular senescence program and its application to anticancer therapy. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:1076-1081.
- Kido M, Shibuya M. 1998. Isolation and characterization of mouse ovarian surface epithelial cell lines. *Pathol Res Pract* 194:725-730.
- Kim H, Lee OH, Xin H, Chen LY, Qin J, Chae HK, Lin SY, Safari A, Liu D, Songyang Z. 2009. TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. *Nat Struct Mol Biol* 16:372-379.
- Kim YK, Lee EK, Kang JK, Kim JA, You JS, Park JH, Seo DW, Hwang JW, Kim SN, Lee HY, Lee HW, Han JW. 2006. Activation of NF-kappaB by HDAC inhibitor apicidin through Sp1-dependent de novo protein synthesis: its implication for resistance to apoptosis. *Cell Death Differ* 13:2033–2041
- Kirkwood TB, Austad SN. 2000. Why do we age? *Nature* 408:233-238
- Krtolica A, Campisi J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1401-1414.
- Kruk PA, Maines-Bandiera SL, Auersperg N. 1990. A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab Invest* 63:132-136.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. 2006. The Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125.
- Kubista M. 2010. Comunicación personal. Fecha: marzo 26 de 2010.
- Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. 2003. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and *in vitro* fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 79:190-197.
- Kuroda H, Mandai M, Konishi I, Tsuruta Y, Kusakari T, Kariya M, Fujii S. 2001. Human ovarian surface epithelial (OSE) cells express LH/hCG receptors, and

hCG inhibits apoptosis of OSE cells via up-regulation of insulin-like growth factor 1. *Int J Cancer* 91:309-315.

- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113:3613-3622.
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. 2006. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* 5:187-195.
- Li AJ, Baldwin RL, Karlan BY. 2003. Short androgen receptor allele length is a poor prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:3667-3673.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling *Genes Dev* 12:3008–3019.
- Lin KW, Yan J. 2005. The telomere length dynamic and methods of its assessment. *J Cell Mol Med* 4: 977-989.
- Lithgow GJ, Walker GA. 2002. Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mech Ageing Dev* 123:765-771.
- Liton PB, Lin Y, Gonzalez P, Epstein DL. 2009 Potential role of lysosomal dysfunction in the pathogenesis of primary open angle glaucoma. *Autophagy* 5:122-124.
- Liton PB, Lin Y, Luna C, Li G, Gonzalez P, Epstein DL. 2008. Cultured porcine trabecular meshwork cells display altered lysosomal function when subjected to chronic oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3961-3969.
- Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. 2004a. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomere proteins. *J Biol Chem* 279:51338-51342.
- Liu J, Yang G, Thompson-Lanza JA, Glassman A, Hayes K, Patterson A, Marquez RT, Auersperg N, Yu Y, Hahn WC, Mills GB, Bast RC Jr. 2004b. A genetically defined model for human ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 655-1663.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402-408.

- López NE, Martínez CM, Konigsberg M. 2005. La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Rev Educ Bioquim* 24:47-53..
- Lou Z, Chen J. 2006. Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res* 312:2641-2646.
- Lu KH, Patterson AP, Wang L, Marquez RT, Atkinson EN, Baggerly KA, Ramoth LR, Rosen DG, Liu J, Hellstrom I, Smith D, Hartmann L, Fishman D, Berchuck A, Schmandt R, Whitaker R, Gershenson DM, Mills GB, Bast RC Jr. 2004. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis. *Clin Cancer Res* 10:3291-3300.
- MacCalman CD, Farooki R, Blaschuk OW. 1994. Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary. *Clin Exp Metastasis* 12:276-282.
- MacLachlan NJ. 1987. Ovarian disorders in domestic animals. *Environ Health Perspect* 73: 27-33.
- Maier AB, Westendorp RG, VAN Heemst D. 2007. Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1100:323-332.
- Maines-Bandiera SL, Kruk PA, Auersperg N. 1992. Simian virus 40-transformed human ovarian surface epithelial cells escape normal growth controls but retain morphogenetic responses to extracellular matrix. *Am J Obstet Gynecol* 167:729-735.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-715.
- Margolis RL, Lohez OD, Andreassen PR. 2003. G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J Cell Biochem* 88:673-683.
- Margolis RL. 2005. Tetraploidy and tumor development. *Cancer Cell* 8:353-354.
- Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC. 2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114:241-253.

- Mazur P, Leibo SP, Chu EH. 1972. A two factor hypothesis of freezing injury. **Exp Cell Res** 71:345-355.
- MCDB Media. Sigma-Aldrich. En: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). Fecha último acceso: marzo 16 de 2010.
- McNeil L, Hobson S, Nipper V, Rodland KD. 1998. Functional calcium-sensing receptor expression in ovarian surface epithelial cells. **Am J Obstet Gynecol** 178:305-313.
- Medium 199 Modified. Sigma-Aldrich. En: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). Fecha último acceso: marzo 16 de 2010.
- MegaCell Media. Sigma-Aldrich. En: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). Fecha último acceso: marzo 16 de 2010.
- Meyer-Siegler K, Mauro DJ, Seal G, Wurzer J, deRiel JK, Sirover MA. 1991. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proc Natl Acad Sci USA** 88, 8460–8464.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human *naevi*. **Nature** 436:720-724.
- Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, Sharpless NE, Morrison SJ. 2006. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. **Nature** 443:448-452.
- Mu J, Wei LX. 2002. Telomere and telomerase. **Cell Res** 12:1-7.
- Multani AS, Chang S. WRN at telomeres: implications for aging and cancer **J Cell Sci** 120: 713-721.
- Muñoz P, Blanco R, Blasco MA. 2006. Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and ageing. **Cell Cycle** 5:718-721.
- Murdoch WJ, Martinchick JF. 2004. Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and chemoprevention. **Exp Biol Med** 229:546-552.
- Murdoch WJ, Townsend RS, McDonnell AC. 2001. Ovulation-induced DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ewes: Prospective regulatory mechanisms of repair/survival and apoptosis. **Biol Reprod** 65:1417-1424.

- Murdoch WJ, Van Kirk EA. 2002. Steroid hormonal regulation of proliferative p53 tumor suppressor and apoptotic responses of sheep ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 186:61-67.
- Murdoch WJ. 2005. Carcinogenic potential of ovulatory genotoxicity. *Biol Reprod* 73:586-590.
- Narita M. 2007. Cellular senescence and chromatin organization. *Br J Cancer* 96:686-691.
- Oh H, Wang SC, Prahash A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, Michael LH, Youker KA, Entman ML, Schneider MD. 2003. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5378-5383.
- Okada H, Mak TW. 2004. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 4:592-603.
- Okamura H, Katabuchi H, Ohba Takashi. 2003. What we have learned from isolated cells from human ovary? *Mol Cell Endocrinol* 202:37-45.
- Olaharski A, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt M, Guzman P, Mohar A, Eastmond D. 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27:337-343.
- Parrot JA, Mosher R, Kim G, Skinner MK. 2000. Autocrine interactions of keratinocyte growth factor hepatocyte growth factor and kit-ligand in the regulation of normal ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology* 141:2532-2539.
- Pastor CL, Vanderhoof VH, Lim LC, Calis KA, Premkumar A, Guerrero NT, Nelson LM. 2005. Pilot study investigating the age-related decline in ovarian function of regularly menstruating normal women. *Fertil Steril* 84:1462-1469.
- Patil CK, Mian S, Campisi J. 2005. The thorny path linking cellular senescence to organismal aging. *Mech Ageing Dev* 126:1040-1045.
- Pérez E, Roche P, Jenkins R, Reynolds C, Halling K, Ingle J, Wold L. 2002. HER2 testing in patients with breast cancer: Poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Clin Proc* 77:148-154.

- Pfaffl MW, Hageleit M. 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechn Lett* 23:275-282.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007.
- Pfaffl MW. 2006. Relative quantification. En: Dorak T, editor. Real Time PCR (BIOS Advanced Methods). Taylor & Francis; pp. 63–82
- Piechaczyk M, Blanchard JM, Marty L, Dani C, Panabieres F, El Sabouty S, Fort P, Jeanteur P. 1984. Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res* 12:6951–6963.
- Piek JM, Dorsman JC, Shvarts A, Ansink AC, Massuger LF, Scholten P, van Diest PJ, Dijkstra JC, Weegenaar J, Kenemans P, Verheijen RH. 2004. Cultures of ovarian surface epithelium from women with and without a hereditary predisposition to develop female adnexal carcinoma. *Gynecol Oncol* 92:819-826.
- Polyak K, Weinberg RA. 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9:265-273.
- Polychronopoulou S, Koutroumba P. 2004. Telomere length and telomerase activity: variations with advancing age and potential role in childhood malignancies. *J Pediatr Hematol Oncol* 26:342 – 350.
- Pon YL, Wong AST. 2006. Gonadotropin-induced apoptosis in human ovarian surface epithelial cells is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the  $\beta$ -catenin/t-cell factor signaling pathway. *Mol Endocrinol* 20:3336-3350.
- Primer-Blast En: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). (Fecha último acceso: marzo 25 de 2010).
- Rae MT, Hillier SG. 2005. Steroid signaling in the ovarian surface epithelium. *Trends Endocrinol Metab* 16:327-333.
- Ramsey MR, Sharpless NE. 2006. ROS a tumour suppressor? *Nat Cell Biol* 8:1213-1215.

- Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF, Liotta LA. 2004. Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer* 40:2604-2612.
- Ravid K, Lu J, Zimmet JM, Jones MR. 2002. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* 190:7-20.
- Revillion F, Pawlowski V, Hornez L, Peyrat JP. 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* 36:1038–1042.
- Richter T, Saretzki G, Nelson G, Melcher M, Olijslagers S, von Zglinicki T. 2007. TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 128:340-3455.
- Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace J, Tawfik O, Persons DL, Smith PG, Terranova PF. 2000. Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* 21: 585-591.
- RPCC: Registro poblacional de cáncer de Cali, Colombia. En: <http://rpcc.univalle.edu.co/>. Fecha último acceso: octubre 21 de 2009.
- Ryan PL, Valentine AF, Bagnell CA. 1996. Expression of epithelial cadherin in the developing and adult pig ovary. *Biol Reprod* 55:1091-1097.
- Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. 2006. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet* 15:1757-1768.
- Santos JH, Meyer N, Skorvaga M, Annab LA, Van Houten B. 2004. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage, *Aging Cell* 3:399-411.
- Sapi E, Brown WD, Aschkenazi S, Lim C, Munoz A, Kacinski BM, Rutherford T, Mor G. 2002. Regulation of Fas Ligand expression by estrogen in normal ovary. *J Soc Gynecol Investig* 9:243-250.
- Satoh M. 1991. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J Anat* 177:85-107.
- Sen N, Hara MR, Kornberg MD, Cascio MB, Bae BI, Shahani N, Thomas B, Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH, Sawa A. 2008. Nitric oxide-induced

nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis. **Nat Cell Biol**10:866-873.

- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell** 88:593–602.
- Shao JC, Wu JF, Wang DB, Qin R, Zhang H. 2003. Relationship between the expression of human telomerase reverse transcriptase gene and cell cycle regulators in gastric cancer and its significance. **World J Gastroenterol** 9:427-431.
- Sharma GG, Hwang KK, Pandita RK, Gupta A, Dhar S, Parenteau J, Agarwal M, Worman HJ, Wellinger RJ, Pandita TK. 2003. Human heterochromatin protein 1 isoforms HP1 (Hsalph) and HP1 (Hsbeta) interfere with hTERT-telomere interactions and correlate with changes in cell growth and response to ionizing radiation. **Mol Cell Biol** 23:8363-8376.
- Sharpless NE. *Ink4a/Arf* links senescence and aging. 2004. **Exp Gerontol** [39](#):1751-1759.
- Shay JW, Wright WE. 2005. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. **Carcinogenesis** 26:867-874.
- Shepherd TG, Thériault BL, Campbell EJ, Nachtigal MW. 2006. Primary culture of ovarian surface epithelial cells and ascites-derived ovarian cancer cells from patients. **Nat Protoc** 1:2643-2649.
- Sherwood SW, Rush D, Ellsworth JL, Schimke RT. 1988. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. **Proc Natl Acad Sci USA** 85:9086e90.
- Siemens CH, Auersperg N. 1988. Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. **J Cell Physiol** 134:347-356.
- Sigma. Triton X100. Product Information. En: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). Fecha último acceso: octubre 11 de 2009.
- Singh R, Green M. 1993. Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Science** 259:365-368.

- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem** 150:76-85.
- Souza F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. 1996. Quantitative RT-PCR: Limits and accuracy. **Biotechniques** 21:280-285.
- Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts, **Mol Cell Bio** 19:2109-2117
- Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE. 2003. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. **Genes Dev** 17:2384-2395.
- Stewart SL, Querec TD, Gruver BN, O'Hare B, Babb JS, Patriotis C. 2004. Gonadotropin and steroids hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium. **J Cell Physiol** 198:119-124.
- Surveillance, epidemiology and end results: Ovary cancer. National Cancer Institute. En: <http://seer.cancer.gov/> (Fecha último acceso: octubre 21 de 2009).
- Tanja F, Morrison L, Saboorian H, Hyan L, Tucker T, Uhr J. 2002. Patterns of aneusomy for three chromosomes in individual cells from breast cancer tumors. **Breast Cancer Res** 75:227-239.
- Teixeira M, Pandis N, Heim S. 2002. Cytogenetic clues to breast carcinogenesis. **Genes Chromosomes Cancer** 33:1-16.
- Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G. 2008. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. **Cancer Res** 68:937-945.
- Tristano A, Chollet ME, Willson ML, Adjounian H, Correa MF, Borges A. 2003. Actividad de la telomerasa en leucocitos de sangre periférica de pacientes con hipertensión arterial esencial. **Med Clin (Barc)** 120:365 -369.
- Untergasser G, Gander R, Rumpold H, Heinrich E, Plas E, Berger P. 2003. TGF- $\beta$  cytokines increase senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence. **Exp Gerontol** 38:1179-1188.

- Van Wezel T, Lombaerts M van Roon EH, Philippo K, Baelde HJ, Szuhai K, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. 2005. Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q. **Breast Cancer Res** 7: R998-1004.
- Vanderhyden BC, Shaw TJ, Ethier JF. 2003. Animal models for ovarian cancer. **Reprod Biol Endocrinol**. En: <http://www.RBEj.com/content/1/1/6>. Fecha último acceso: octubre 21 de 2009.
- Verdun RE, Karlseder J. 2007. Replication and protection of telomeres. **Nature** 447:924-931.
- Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Durr P. 2001. Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. **Exp Gerontol** 36:1327-1347.
- Wahl GM, Carr AM. 2001. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: Insights from yeast and p53. **Nat Cell Biol** 3:E277-E286.
- Wai LK. 2004. Telomeres, telomerase and tumorigenesis. A review. **MedGenMed** 6:19.
- Walen KH. 2005. Budded karyoplasts from multinucleated fibroblast cells contain centrosomes and change their morphology to mitotic cells. **Cell Biol Int** 29: 1057e65.
- Walen KH. 2006. Human diploid fibroblast cells in senescence; cycling through polyploidy to mitotic cells. **In vitro Cell Dev Biol Anim** 42:216e24.
- Watter A, Going J, Cooke T, Bartlett J. 2003. Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma. **Breast Cancer Res Treat** 77:109–114.
- Webley K, Bond JA, Jones CJ, Blaydes JP, Craig A, Hupp T, Wynford-Thomas D. 2000. Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. **Mol Cell Biol** 20:2803-2808.
- Wong AS, Auersperg N. 2003. Ovarian surface epithelium: Family history and early events in ovarian cancer. **Reprod Biol Endocrinol**. En: <http://www.RBEj.com/content/1/1/70> (Fecha último acceso: octubre 21 de 2009).

- Wong AS, Leung PC, Maines-Bandiera SL, Auersperg N. 1998. Metaplastic changes in cultured human ovarian surface epithelium. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 34:668-670.
- Wong AS, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PC, Roskelley CD, Auersperg N. 1999. Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Cancer* 81:180-188.
- Wright JW, Toth-Fejel S, Stouffer RL, Rodland KD. 2002. Proliferation of rhesus ovarian surface epithelial cells in culture: lack of mitogenic response to steroid or gonadotropic hormones. *Endocrinology* 143:2198-2207.
- Wright WE, Shay JW. 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* 11: 98-103.
- Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao W, Grossman BH, Shay JW, Luo S, Hong WK, Spitz MR. 2003. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J Natl Cancer Inst* 95:1211-1212.
- Yang D, McCrann DJ, Nguyen H, St. Hilaire C, DePinho RA, Jones MR, Ravid K. 2007. Increased polyploidy in aortic vascular smooth muscle cells during aging is marked by cellular senescence. *Aging Cell* 6:257–260.
- Yang L, Suwa T, Wright WE, Shay JW, Hornsby PJ. 2001. Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells. *Mech Ageing Dev* 122:1685-1694.
- Yang WL, Godwin AK, Xu XX. 2004. Tumor necrosis factor-alpha-induced matrix proteolytic enzyme production and basement membrane remodeling by human ovarian surface epithelial cells: molecular basis linking ovulation and cancer risk. *Cancer Res* 64:1534-1540.
- Young A, Narita M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. 2009. *Curr Opin Cell Biol* 22:1-7
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7:85.
- Zhang P, Furukawa K, Opresko PL, Xu X, Bohr VA, Mattson MP. 2006. TRF2 dysfunction elicits DNA damage responses associated with senescence in

- proliferating neural cells and differentiation of neurons. *J Neurochem* 97:567-581.
- Zhang S, Zhang HS, Cordon-Cardo C, Ragupathi G, Livingston PO. 1998. Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: protein antigens. *Clin Cancer Res* 4:2669-2676.
  - Zheng L, Roeder RG, Luo, Y. 2003. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114, 255–266.
  - Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 12:2997–3007.
  - Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ. 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15:203-211.
  - Zindy F, van Deursen J, Grosveld G, Sherr CJ, Roussel MF. 2000. INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol Cell Biol* 20:372–378.
  - Zybina TG, Zybina EV. 2005. Cell reproduction and genome multiplication in the proliferative and invasive trophoblast cell populations of mammalian placenta. *Cell Biol Int* 29:1071-1083.