

Actividad de la β -galactosidasa como marcador de senescencia en cultivos primarios del epitelio superficial del ovario.

Lilian Chuaire-Noack¹, Sandra Rondón-Lagos¹, Magda Sánchez-Corredor¹, Milcíades Ibáñez-Pinilla² y Sandra Ramírez-Clavijo¹.

¹Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas,

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

Palabras clave: β -galactosidasa, senescencia replicativa, biomarcador, células epiteliales ováricas.

Resumen. La actividad de la β -galactosidasa refleja la tasa de envejecimiento celular *in vitro*. Mediante quimioluminiscencia se cuantificó dicha actividad a pH 6 en células epiteliales ováricas provenientes de 28 donantes sin antecedentes de cáncer. Las células fueron cultivadas en forma seriada hasta alcanzar el estado de detención permanente de crecimiento. Durante la fase de crecimiento exponencial, todos los cultivos mostraron un patrón semejante de crecimiento y una baja actividad β -galactosidasa. Sin embargo, el inicio de la disminución de la capacidad replicativa que caracteriza el final de dicha fase, así como el inicio de la fase estacionaria o senescente presentaron un aumento significativo en la actividad enzimática. Nuestros resultados mostraron que la actividad β -galactosidasa puede ser considerada como marcador de senescencia replicativa del epitelio superficial del ovario a pH 6.

β -Galactosidase activity as a marker of senescence in primary cultures of the ovarian surface epithelium.

Invest Clin 2010; 51(3): 351 - 367

Key words: β -galactosidase, replicative senescence, biomarker, ovarian epithelial cells

Abstract. β -galactosidase activity reflects the rate of cellular aging *in vitro*. Such activity was quantified at pH 6 in ovarian epithelial cells from 28 donors without a history of cancer, by the chemoluminescent method. The cells were serially cultured until they achieved the state of permanent growth ar-

rest. During the exponential growth phase, all cultures showed a similar pattern of growth and low β -galactosidase activity. However, both in the onset of decrease replicative activity, as well as in the onset of the stationary phase, there was a significant rise in the enzyme activity. Our results showed that β -galactosidase activity can be considered as a replicative senescence marker of the ovarian surface epithelium at pH 6.

Recibido: 24-11-2009. Aceptado: 25-03-2010.

INTRODUCCIÓN

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 parte debido a las dificultades para cultivar las células ováricas humanas y a la poca disponibilidad de modelos animales apropiados (1-3). Los sistemas *in vitro* constituyen una herramienta útil para su estudio, si bien presentan limitaciones, como el discreto potencial de crecimiento y la dificultad para separar las células epiteliales de los otros tipos de células presentes en el estroma ovárico. Estos hechos, sumados a la rápida senescencia de las células epiteliales 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.

En este orden de ideas, cuando se considera que la senescencia celular puede funcionar como un mecanismo promotor de la tumorigénesis en las edades avanzadas (4), cobra especial importancia el estudio de dicho estado en cultivos primarios de un tejido que, como el epitelio superficial del ovario, presenta una elevada susceptibilidad a la transformación maligna (5, 6). En forma asociada con el estado senescente, emerge la actividad de la enzima β -galactosidasa –más comúnmente conocida como SA- β -gal (*senescence-associated β -galactosidase*)– que corresponde a la actividad β -galactosidasa

detectable a pH 6 en cultivos de células que han sufrido senescencia replicativa o bien, acelerada (7). Por este motivo, la SA- β -gal ha sido postulada como biomarcador de senescencia *in vitro* e *in vivo* (8) y, por tanto, de envejecimiento celular.

Mientras que la SA- β -gal se activa a pH 6, la β -galactosidasa lisosómica de mamíferos lo hace a pH 4 (9, 10). Aunque la diferencia en el pH de activación entre las formas lisosómica y la asociada con la senescencia se atribuyó inicialmente a la existencia de dos enzimas diferentes, en la actualidad se acepta que la SA- β -gal es la misma β -galactosidasa de origen lisosómico y que su actividad aumentada en células senescentes se debe al incremento característico de la masa de lisosomas en dicho estado (11, 12), relacionada posiblemente con la vía de autofagia (13, 14).

No obstante su amplia utilización y confiabilidad como biomarcador de senescencia, el origen de la actividad SA- β -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, en asociación con un alto grado de confluencia (11,15) e, incluso, se ha propuesto que dicha actividad se debe a un incremento en la actividad o en la cantidad de alguna otra enzima con capacidad para hidrolizar los residuos terminales β -D-galactosa presentes en glicoproteínas, esfingolípidos y queratánulfato (16). Sin embargo, Lee y col. en 2006 (11), quienes demostraron que la SA- β -gal está codificada por el gen GLB1

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

Por otra parte, es factible establecer *in vitro*, si existe relación entre factores como la edad de las donantes de las células cultivadas, el tiempo necesario para alcanzar el estado senescente y la actividad β -galactosidasa a pH 6, relación que aún no ha sido evaluada en las células epiteliales ováricas en cultivo. Existen reportes en otros 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 presenescencia (17-20).

En el presente estudio se investigó si la actividad β -galactosidasa, cuantificada en forma relativa mediante quimioluminiscencia a pH 6, puede ser considerada como biomarcador de senescencia replicativa y, si además puede predecir el inicio de la fase estacionaria o senescente de las células epiteliales ováricas *in vitro*. En adición, se examinó la posible asociación entre la edad de las donantes con el tiempo de inicio del estado senescente y la actividad SA- β -gal. Con estos objetivos, se establecieron 28 cultivos primarios de células del epitelio superficial del ovario, que fueron subcultivados en forma seriada hasta el final de su vida replicativa. En el estado subconfluyente de cada subcultivo se determinó la actividad β -galactosidasa a pH 6 y se normalizó con base en la cantidad de proteínas de las células examinadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Donantes

Previo aprobación del comité de ética de la Universidad del Rosario, Bogotá DC,

Colombia y del correspondiente consentimiento informado, un total de 28 mujeres con edades entre 13 y 57 años, donó una pequeña sección del epitelio superficial ovárico. El grupo de donantes conformó una cohorte étnicamente homogénea de mujeres colombianas mestizas que se sometieron a procedimientos quirúrgicos en los servicios de gineco-obstetricia de cinco instituciones hospitalarias, tanto públicas como privadas, de Bogotá DC, durante el año 2009. Las secciones de tejido, de aproximadamente 1-2 cm³ cada una, fueron obtenidas en el curso de las ooforectomías totales o parciales practicadas a las donantes por condiciones benignas.

Una vez obtenidas las muestras, fueron depositadas en tubos falcon de 15 cm³, sumergidas en medio M199 (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil) con 0,05% de penicilina-estreptomicina de 10000 U (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil), selladas y transportadas en frío al Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad del Rosario, donde fueron procesadas –bajo condiciones de asepsia– en cabina de flujo laminar.

Según la edad cronológica de las donantes, se establecieron dos grupos etarios: G1 \leq 36 años y G2 \geq 37 años. Así, los análisis propuestos se llevaron a cabo, tanto en la muestra no estratificada, como en la estratificada por edades.

Aislamiento de las células

La separación del epitelio y el estroma ovárico se llevó a cabo 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 CO₂. Pasadas 12 horas, el epitelio y el estroma subyacente fueron separados en forma muy suave y el epitelio fue seccionado en pequeños fragmentos, de acuerdo con el procedimiento descrito por Dunfield y col. (21).

Cultivos primarios

De acuerdo con el tamaño de la biopsia, el número total de células sembradas fluctuó entre 1000 y 2000. Una vez depositadas en frascos de cultivo de 25 cm² con la mezcla de medios MCDB105 (Sigma, St. Louis, MO, USA)/ M199 (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil) suplementada con suero fetal bovino (SFB, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA) al 10% y 0,05% de penicilina-estreptomina de 10000 U (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil), las células fueron incubadas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% y 100% de humedad. Cuando las células cultivadas alcanzaron un 80-85% de confluencia, se eliminó la mezcla de medios y a continuación se vertió en los frascos un volumen de 2 mL de tripsina-EDTA (GibCo, Invitrogen Corporation, Brazil) al 0,25%, con el fin de disgregar las células. Después de 60 segundos, la tripsina fue inactivada con medio fresco y el contenido de los frascos fue depositado en tubos falcon de 15 cm³, los que posteriormente fueron sometidos a centrifugación a 1500 rpm durante 6 minutos. El botón o pellet resultante fue resuspendido en 2 mL de la mezcla de medios suplementada con SFB y antibióticos. Un pequeño volumen de esta resuspensión se destinó para efectuar, tanto los conteos celulares, como la correspondiente caracterización de las células, mientras que la gran mayoría fue depositada en placas de cultivo multipozos, con el objetivo de hacer los ensayos de actividad de SA- β -gal y de cuantificación de proteínas.

Cada vez que se llevó a cabo el proceso antes descrito y con el fin de asegurar la continuidad de los cultivos, se añadió a los frascos medio suplementado con SFB y antibióticos, lo que permitió la proliferación de las células remanentes adheridas a la superficie, siempre bajo condiciones de incubación de 37°C y 5% de CO₂.

Conteo celular

En tubos eppendorf de 1 mL se mezclaron 10 μ L de la resuspensión celular mas 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 en el microscopio de contraste de fases y, por defecto, el de las células vivas que no lo incorporan. El número total de células vivas (que no tomaron el colorante) se calculó mediante la fórmula: $2 \times 10^4 \times \text{volumen del medio utilizado en la resuspensión del botón (mL)} \times \text{número promedio de células vivas contabilizadas en los cuatro cuadrantes del hemocitómetro}$.

Caracterización de las células epiteliales ováricas

Con la finalidad de caracterizar a las células epiteliales cultivadas, se tuvo en cuenta 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 se puede detectar desde el primer pase, los cultivos deben descartarse de inmediato, pues en tal caso, los fibroblastos rápidamente sobrepasan a las células epiteliales e impiden su proliferación. En adición, y mediante técnicas inmunocitoquímicas, se determinó la expresión de la citoqueratina 18, proteína fibrilar del citoesqueleto presente en el núcleo, nucléolo y citoplasma de células adultas de los epitelios simples. Células epiteliales de los tres primeros pases de cada cultivo fueron extendidas en láminas y fijadas con Carnoy fueron teñidas con el anticuerpo monoclonal anticitoqueratina 18 conjugado con isotiocianato fluorescente (FITC) (Sigma St. Louis, MO, USA) e incubadas en cámara húmeda por 12 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de tres lavados posthibridación con PBS, las señales de co-

lor verde fueron visualizadas por espectroscopia de fluorescencia. Con base en la visualización de la morfología especial de las células epiteliales y la demostración de reactividad anticitoqueratina-18 durante los tres primeros pases del cultivo, se comprobó que las células cultivadas fueron 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.

Capacidad replicativa

Como un estimativo de la capacidad replicativa y una vez obtenidos los conteos celulares, se calculó la población celular durante cada pase, como la razón entre el número de células recolectadas 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 pase se efectuó con el objeto de minimizar 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.

Determinación de las fases de crecimiento de los cultivos primarios

Las diferentes fases de crecimiento fueron definidas teniendo en cuenta los criterios establecidos por Hayflick y Morread (22) para describir la cinética general de los cultivos celulares. Con relación a la cinética particular de los cultivos del epitelio superficial del ovario, fueron considerados los reportes de Siemens y Auersperg en 1988 (23), Auersperg y Maines-Bandiera en 2000 (24), Auersperg y col. en 2001 (1), Dunfield y col. en 2002 (21) y Shepherd y col. 2006 (25), que indican que los cultivos de este tipo de células alcanzan el estado senescente en los pases tres a cinco, des-

pués de haber experimentado no más de 12-15 doblajes poblacionales. Así, la fase I fue definida como la etapa de adaptación o primer pase del cultivo, la IIa correspondió al periodo de crecimiento exponencial y la IIb a la de disminución del crecimiento (pases dos - tres). La fase III correspondió al periodo estacionario o senescente (a partir de los pases tres a cinco), mientras que la IV fue definida como la etapa de muerte celular (de ocurrencia e inicio variable, según las condiciones de cultivo).

Actividad de la enzima SA- β -gal

La actividad endógena de la enzima SA- β -gal a pH 6 fue examinada con el kit Beta-Glo Assay System (Promega Co, Madison WI, USA), durante el estado subconfluente de cada pase o subcultivo.

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. Al cabo de 24 horas se eliminó el medio, se lavó por un minuto con 200 μ L de PBS y se adicionaron 100 μ L de buffer lisis (Triton X100 1%, Hepes 20 mM, EDTA 4 mM pH 7,4) por pozo. Pasados 20 minutos, se tomó un volumen de suspensión de 100 μ L por pozo y se trasladó a placas de luminiscencia de 96 pozos. Después de añadir a cada pozo un volumen de 100 μ L de reactivo Beta-Glo y dejar actuar por 30 minutos, se efectuó la lectura de luminiscencia en el luminómetro, en unidades relativas de luminiscencia (RLU). Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Con el objeto de eliminar variaciones en las lecturas de luminiscencia debidas a posible error en el número de células sembradas en cada pozo, se normalizaron las medidas de actividad enzimática, tomando como unidad de referencia la cantidad total de proteína de cada uno de los pozos. Esto permitió comparar en forma confiable la actividad SA- β -gal entre las muestras y entre los diferentes ensayos.

Cuantificación de proteínas

Se efectuó cuantificación de proteínas para cada muestra, mediante el método BCA (basado en la reacción de Biuret) con el kit Pierce BCA proteína Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

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 μL a un volumen de 20 μL del lisado celular depositado en cada pozo. Dentro de la misma placa se destinaron seis pozos para elaborar la curva estándar de calibración que permitió 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 control negativo del estándar de calibración se vertieron 20 μL de H_2O en dos pozos y como blanco del ensayo, se usó buffer lisis. 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 cantidad de proteína en cada una de ellas.

Análisis estadístico

Previa evaluación de normalidad y homogeneidad de varianzas con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk y de transformaciones con logaritmo natural en caso de distribución no normal, se examinaron parámetros como actividad SA- β -gal y población celular normalizada en los diferentes pases o subcultivos.

Tanto las medias de la actividad SA- β -gal como las de la población celular

normalizada fueron comparadas mediante el análisis de varianza paramétrico de medidas repetidas o el no paramétrico de Friedman. Las diferencias obtenidas con el primero fueron a su vez examinadas con la prueba de comparaciones múltiples ajustada por Bonferroni.

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

RESULTADOS

Caracterización y crecimiento de las células epiteliales ováricas cultivadas

La técnica de cultivo utilizada permitió obtener una monocapa de células epiteliales, en la 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.

En nuestro 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 de color verde generadas gracias a la activación del fluoróforo isotiocianato fluorescente FITC, que resulta del acoplamiento

del anticuerpo anticitoqueratina con el sustrato correspondiente, en este caso la citoqueratina 18.

Algunos cultivos alcanzaron senescencia en los pases tres o cuatro, mientras otros lo hicieron en pases más avanzados, hecho evidenciado por la aparición de las formas celulares planas e irregulares propias del fenotipo mesenquimático y por la dificultad para alcanzar confluencia, características asociadas con el estado senescente (Fig. 1).

Como último pase de cada cultivo se consideró aquel en el que la densidad celular alcanzó un nivel estable o bien, disminuyó durante un período de 7 a 15 días contados desde el pase inmediatamente anterior. Por este motivo, el número total de subcultivos analizados varió entre cuatro y diez.

En la Tabla I se incluyen medidas como medias, desviación estándar e intervalos de confianza de 95%, correspondientes a las poblaciones celulares normalizadas de cada pase de los cultivos. Como complemento, la Fig. 2 muestra la cinética del crecimiento celular de los 28 cultivos primarios analizados. La población celular normalizada alcanzó los niveles más altos durante el pase dos y parte del tres, indicativos de una elevada capacidad replicativa, motivo por el cual el pase dos y el inicio del tres podrían ser equiparados con la fase IIa de

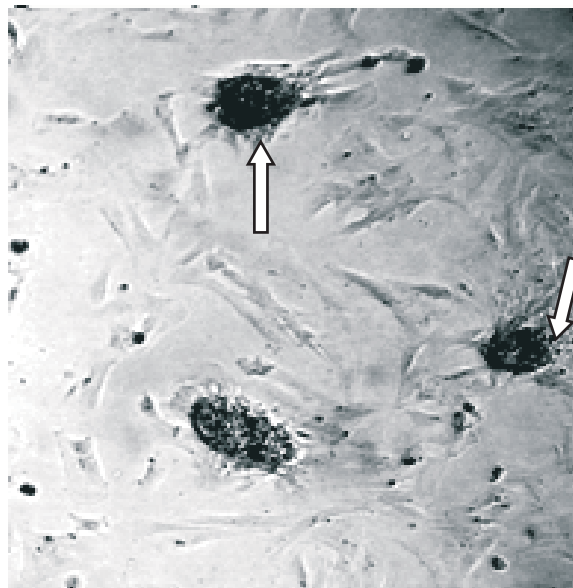


Fig. 1. Cultivo de células epiteliales ováricas senescentes. En este cultivo, proveniente de una donante de 28 años de edad, las células se tornaron senescentes en el pase cuatro, como lo indica su morfología aplanada reminiscente de las células mesenquimáticas, su gran tamaño y la presencia de numerosos fagolisosomas (ver flechas).

crecimiento exponencial. La población celular normalizada se mantuvo estable durante el resto del pase tres y parte del cuatro, lo que indicaría el curso de la fase IIb, en la que los cultivos experimentan una disminución en la tasa de proliferación con

TABLA I
ESTIMACIÓN DEL PROMEDIO, DESVIACIÓN ESTÁNDAR E INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95% DE LA POBLACIÓN CELULAR NORMALIZADA DURANTE CADA PASE DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS EPITELIALES OVÁRICAS

Pase o subcultivo	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
1	9,813	0,202	9,391	10,235
2	10,951	0,191	10,550	11,351
3	10,996	0,259	10,455	11,538
4	10,930	0,196	10,521	11,340
5	10,301	0,211	9,860	10,742
6	10,035	0,185	9,647	10,422

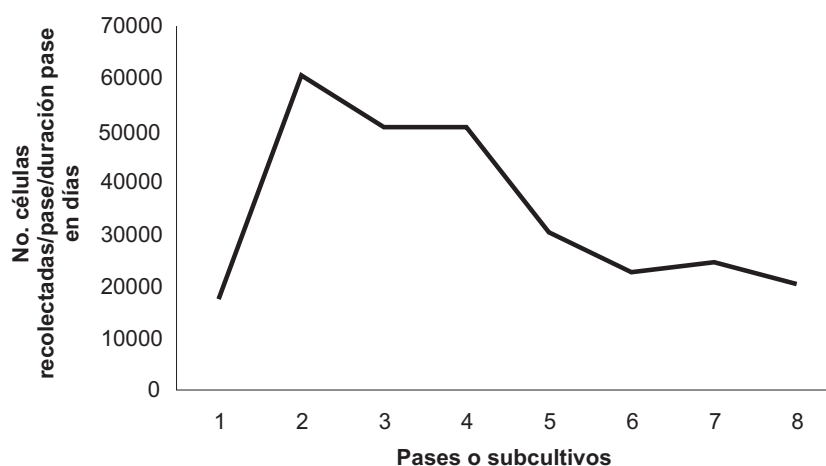


Fig. 2. Tendencia de la distribución de las medianas de la población celular normalizada en cultivos primarios de células epiteliales ováricas.

relación a la fase IIa. A partir de la finalización del pase cuatro y durante los pases siguientes, la población celular disminuyó en forma sensible, de manera que se podría considerar que la fase III –estacionaria o senescente– comenzó hacia el final de este pase y que, en adición, el citado descenso en los pases subsiguientes estaría relacionado con una notoria declinación de la capacidad replicativa de los cultivos, debida posiblemente a que un cada vez mayor número de células hizo su entrada al estado senescente.

El análisis no paramétrico de varianza de Friedman arrojó diferencias significativas entre las medianas de la población celular normalizada, cuando se consideraron los seis y los siete primeros pases ($p < 0,001$ en ambos casos). Con el análisis paramétrico de varianza de medidas repetidas –posterior a la transformación con logaritmo natural– se encontraron diferencias significativas en las medias de la población celular normalizada, cuando se examinaron los siete primeros pases ($p < 0,001$). Al efectuar comparaciones múltiples con la prueba de Bonferroni, se estableció que la población celular normalizada de los pases dos, tres y cuatro fue significativamente mayor que la del pase uno ($p < 0,001$, $p = 0,006$ y $p = 0,013$), así como la del pase cuatro con relación al seis ($p = 0,015$).

Comparación de la capacidad replicativa por grupos etarios

Las tendencias de la distribución de medianas de la población celular normalizada durante cada pase entre los dos grupos etarios tuvieron un comportamiento muy similar, como puede apreciarse en la Fig. 3. Previa transformación con logaritmo natural –en razón de que los resultados no se ajustaron a una distribución normal– y aplicación de la prueba paramétrica t-student, no se hallaron diferencias significativas en los logaritmos naturales de las medias de las poblaciones celulares normalizadas correspondientes a los dos grupos etarios.

Actividad SA- β -gal

La Tabla II muestra medidas como medias, desviación estándar e intervalos de confianza del 95% de la actividad enzimática durante cada pase, mientras que la Fig. 4 muestra la relación entre la actividad SA- β -gal, expresada en unidades relativas de luminiscencia o RLU (del inglés *Relative Light Units*) y la historia replicativa de los cultivos. Aunque con un incremento inicial al final del pase uno y parte del dos, la actividad enzimática se mantuvo relativamente estable a partir de este momento y hasta el pase cuatro. Sin embargo, durante el pase cinco y, en forma especialmente notoria du-

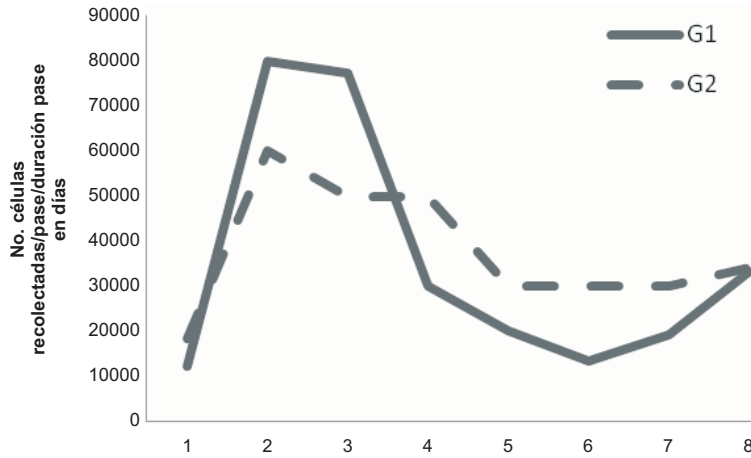


Fig. 3. Tendencias de la distribución de medianas de las poblaciones celulares normalizadas en los cultivos de células epiteliales ováricas en los dos grupos etarios G1 \leq 36 Y G2 \geq 37.

TABLA II
ESTIMACIÓN DE LOS PROMEDIOS, DESVIACIÓN ESTÁNDAR E INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95% DEL LOGARITMO NATURAL DE LA ACTIVIDAD SA- β -GAL EN CADA PASE DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS EPITELIALES OVÁRICAS

Pase o subcultivo	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
1	10,771	0,247	10,254	11,288
2	11,253	0,283	10,661	11,845
3	11,397	0,208	10,961	11,833
4	11,350	0,185	10,963	11,737
5	11,577	0,227	11,102	12,051
6	12,022	0,276	11,446	12,599

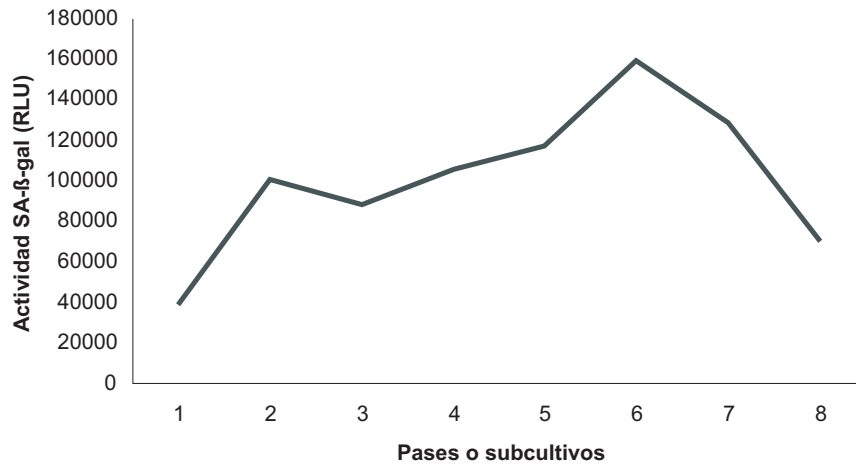


Fig. 4. Tendencia de la distribución de las medianas de la actividad SA- β -GAL en unidades relativas de luminiscencia (RLU) en cultivos primarios de células epiteliales ováricas.

rante el pase seis, se produjo un aumento significativo, para después iniciar su descenso en los pases subsiguientes, en concordancia con lo que antes se sugirió como curso de la fase III estacionaria o senescente de los cultivos.

En razón de que las medianas no se ajustaron a una distribución normal, se aplicó el análisis no paramétrico de varianza de Friedman. Así, se hallaron diferencias significativas en la actividad enzimática, cuando se consideraron los seis primeros pases ($p=0,020$) y los siete primeros pases ($p=0,037$) de los cultivos. Previa transformación con logaritmo natural, se comprobó homogeneidad de varianzas con coeficientes de variación menores a 12%. Se encontraron diferencias significativas entre las medias de la actividad enzimática de cada pase, cuando se utilizó el análisis paramétrico de varianza de medidas repetidas ($p=0,025$). Con la prueba de comparaciones múltiples con ajuste de Bonferroni se estableció que la actividad enzimática en el pase seis fue significativamente mayor que en el pase uno ($p=0,023$).

Al analizar la posible relación entre la actividad SA- β -gal y la capacidad replicativa a lo largo de los cultivos, se puede apreciar en la Fig. 5 que el aumento en la actividad

enzimática desde el pase cuatro hasta el seis, ocurrió en forma paralela con el comportamiento relativamente estable de los valores de la población celular normalizada y por tanto de la capacidad replicativa, comportamiento que comenzó hacia el final del pase tres y se extendió durante parte del cuatro. A partir del pase cuatro y hasta el seis, el incremento en la actividad enzimática transcurrió en forma simultánea con la disminución de los valores de la población celular normalizada y por tanto de la capacidad replicativa. A partir del pase siete declinaron, tanto los valores de la actividad enzimática, como los de la población celular normalizada.

Comparación de la actividad enzimática por grupos etarios

Después de efectuar transformaciones con logaritmo natural y de aplicar la prueba paramétrica t-student, se hallaron diferencias significativas entre las medias de la actividad SA- β -gal entre los dos grupos etarios, sólo en el pase cinco, en el que la actividad enzimática fue mayor en G2 ($p=0,03$). En el pase cuatro, la actividad enzimática en G2 fue mayor que en G1, con una diferencia cercana al nivel de significancia ($p=0,055$) (Fig. 6).

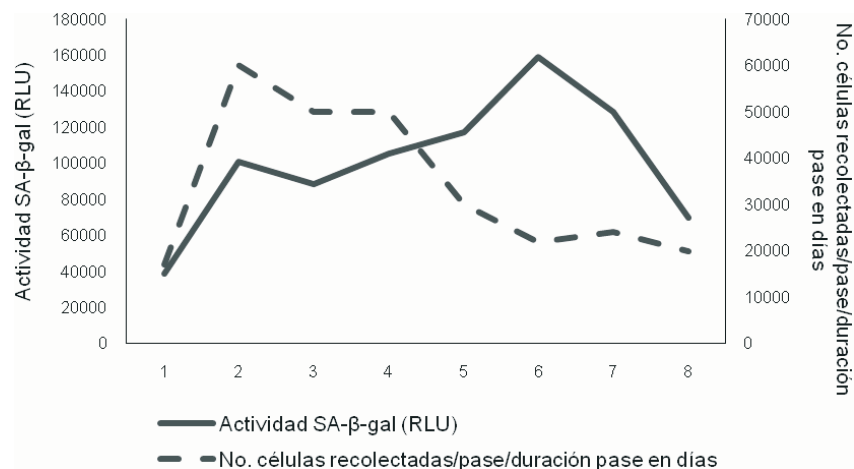


Fig. 5. Tendencias de la distribución de medianas de la actividad SA- β -GAL y de la capacidad replicativa en cultivos primarios de células epiteliales ováricas.

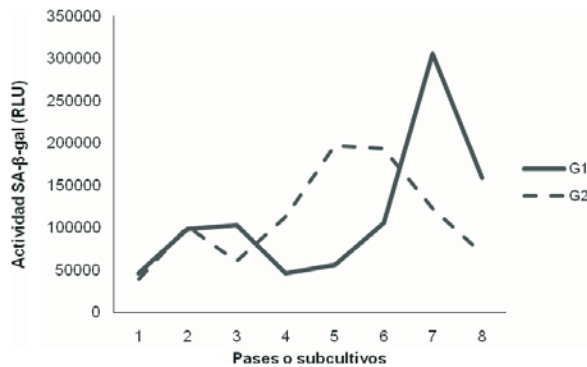


Fig. 6. Tendencias de distribución de las medianas de actividad SA-β-GAL en los dos grupos etarios.

Inicio de la senescencia y edad de las donantes

Cuando se analizan las curvas de actividad SA-β-gal y de población celular normalizada en G1 (≤ 36), se puede apreciar que, durante el pase seis, las curvas de población celular normalizada y de actividad SA-β-gal comienzan a presentar divergencia, de modo que, mientras se inicia el aumento de la actividad enzimática, después de una elevación previa menor, los valores de las medianas de la población celular normalizada comienzan a declinar. Con relación a G2 (≥ 37), dicha divergencia aparece en el pase cinco, como lo indica la elevación de la actividad enzimática y el descenso simultáneo de la población celular normalizada durante dicho pase (Fig. 7).

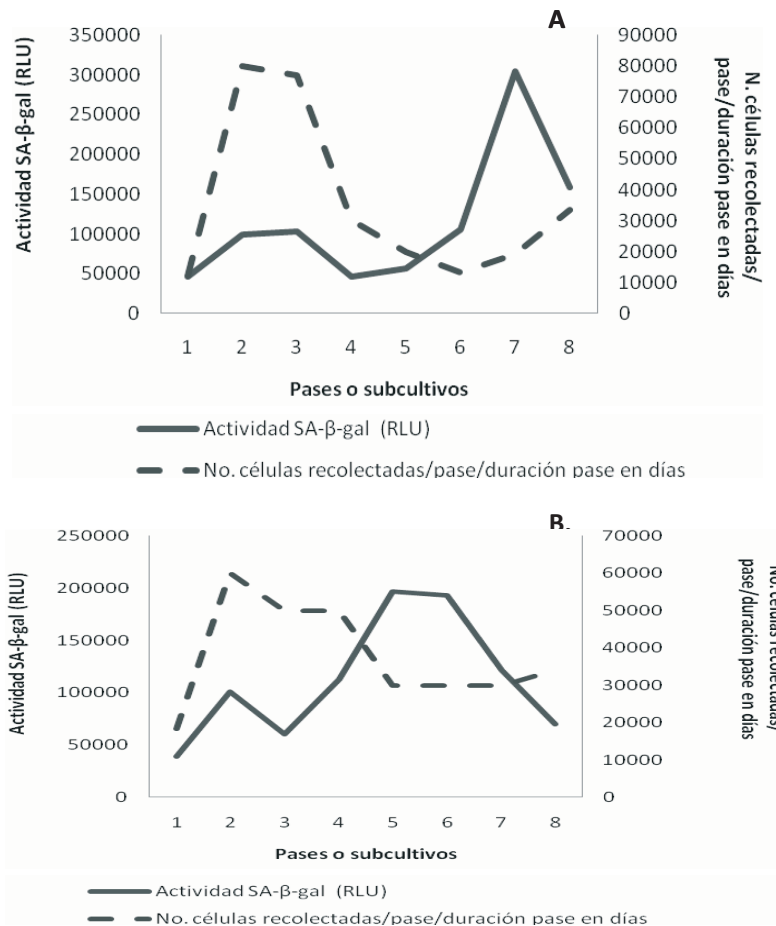


Fig. 7. Tendencias de distribución de las medianas de la actividad SA-β-GAL y de las poblaciones celulares normalizadas en los grupos etarios G1 (7A) Y G2 (7B).

DISCUSIÓN

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 fue 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.

En los cultivos celulares, la senescencia fue descrita hace más de 40 años como un estado de detención irreversible del ciclo celular de células diploides normales, que agotaron su capacidad de proliferación (22). En este estado, llamado "*senescencia replicativa*", en razón de la dificultad para alcanzar el punto de confluencia *in vitro*, las células adquieren la morfología grande y aplanada de las células mesenquimáticas, se tornan multinucleadas y con una elevada granularidad, debida a aumento en el número de lisosomas (26). Aunque la investigación sobre la senescencia se inició con Hayflick y Moorhead, cobró nuevo impulso cuando Dimri y col. (7) descubrieron que la actividad β -galactosidasa aumentaba en las células senescentes.

La actividad SA- β -gal ha sido medida en forma tradicional con un sustrato cro-

mogénico artificial como X-gal, método que requiere contar células que se tiñen con intensidades variables, en un proceso dispendioso y subjetivo. El método quimioluminiscente utilizado en el presente estudio no sólo consume menos tiempo, sino permite identificar con una elevada sensibilidad y cuantificar la actividad enzimática endógena a pH 6, gracias a que la acopla con una reacción de tipo luciferasa. Así, cuando el sustrato 6-O-B-galactopiranosilo-luciferina es clivado por la SA- β -gal se produce luciferina y galactosa. Debido a la acción enzimática de la luciferasa sobre la luciferina, se emite una señal luminiscente cuantificable en unidades de luminiscencia relativa (RLU) (27). La actividad enzimática a pH 6 fue examinada en 28 cultivos primarios de células epiteliales ováricas, que fueron subcultivadas en forma seriada hasta agotar su capacidad replicativa.

Aunque en la Fig. 5 se puede apreciar que, en apariencia, no existe paralelo entre las tendencias de los valores de las medianas de la actividad enzimática y las de las poblaciones celulares normalizadas, vale la pena hacer notar que cuando los cultivos estuvieron en pase cuatro, que correspondería al inicio de la fase III, estacionaria o senescente, la actividad SA- β -gal comenzó a mostrar un aumento significativo, que se hizo más notorio hacia el pase seis. El incremento en la actividad SA- β -gal fue un evento caracterizado por su heterogeneidad, lo que indica que la activación de la SA- β -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. Según Maier y col. (28) el aumento en la actividad β -galactosidasa precede a la fase III postmitótica, lo que haría de ella un buen predictor de la esperanza de vida del cultivo. Al respecto, nosotros en-

contramos que dicho aumento está asociado, tanto con la que establecimos como fase IIb, como con la fase III. En este orden de ideas, la actividad SA- β -gal podría ser considerada como biomarcador del estado senescente, así como del inicio del descenso de la capacidad replicativa que caracteriza a la fase IIb (con relación a la fase IIa) en este tipo de células. Por otra parte, tanto las fluctuaciones observadas en la actividad SA- β -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 de células epiteliales ováricas con diferente potencial de diferenciación. Si se tiene en cuenta que Auersperg y col (29), Wong y col (30) y Piek y col (31), reportaron la existencia de por lo menos dos tipos celulares en el epitelio superficial del ovario, es posible que la heterogeneidad celular 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- β -gal.

En nuestro estudio, las medianas de la población celular normalizada alcanzaron su valor más elevado hacia el pase dos (fase IIa), y se mantuvieron relativamente estables hasta el pase cuatro cuando comenzaron a disminuir, tendencia que se mantuvo hasta el final de todos los cultivos. Estos resultados indican que la fase III estacionaria o senescente en las células del epitelio superficial del ovario comienza hacia 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, coexistan varias poblaciones celulares en los cultivos: aquellas que se encuentran en estado de replicación, otras senescentes o en estado de quiescencia y una más de células en proceso de muerte. En ese momento, dichas poblaciones se encontrarían en equilibrio, lo que explicaría la relativa estabilidad de las poblaciones celular-

res normalizadas desde el pase dos hasta el cuatro. Sin embargo, dicho equilibrio se rompería durante la fase III o estacionaria de los cultivos, debido a la entrada de una cada vez mayor número de células al estado senescente, lo que se traduce en una capacidad replicativa con tendencia hacia la baja durante esta fase.

De acuerdo con nuestros resultados, el aumento en la actividad β -galactosidasa a pH 6 (SA- β -gal) muestra asociación con la disminución de la capacidad replicativa de los cultivos primarios de células del epitelio superficial del ovario y puede ser utilizada con el objetivo de predecir el estado de detención irreversible de la proliferación de dichas células *in vitro*.

Aunque se desconoce el significado del aumento en la actividad SA- β -gal en la fase estacionaria o senescente, se ha postulado que se relaciona con la acumulación de material no degradable en el compartimento lisosómico, como son las moléculas producto de daño oxidativo o la lipofuscina (32, 33). En consecuencia, las alteraciones resultantes en la función de los lisosomas pueden ser el preludio de patogénesis del tejido al que pertenecen las células cultivadas, debido a que afectan tanto la vía autofágica como la formación de autofagolisosomas, mecanismos responsables de la renovación de los organelos intracelulares y de la digestión de agregados proteicos (34).

Por otra parte, la declinación de las medianas, tanto de la actividad enzimática, como de la población celular normalizada a partir del pase 7 (Fig. 5), merece ser investigada en estudios ulteriores que evalúen las razones para esta disminución.

En cuanto a las diferencias halladas en la actividad SA- β -gal de las células epiteliales entre los dos grupos etarios –significativamente mayores en los cultivos de las donantes de 37 años o más, en el pase cinco y cerca del nivel de significancia en el pase cuatro– sugieren que el envejecimiento y la

mayor actividad SA- β -gal exhibida por dichas células están en estrecha relación, en concordancia con reportes previos que han establecido asociación entre el grado de envejecimiento y la senescencia celular (17-20, 35, 36). En adición, el descenso en las medianas de la población celular normalizada a partir del pase cuatro soporta la idea de que la capacidad replicativa de las células se agota durante el proceso natural de envejecimiento (37, 38), lo que es explicable si se tiene en cuenta que dicha capacidad en las células cultivadas refleja en forma indirecta su sensibilidad o su resistencia al estrés, características a su vez correlacionadas con la longevidad (39). Se podría proponer, de acuerdo con lo observado en la Fig. 7, que el inicio de la senescencia tiene lugar cuando se produce la divergencia entre las curvas de distribución de medianas de actividad SA- β -gal y de población celular normalizada. En este orden de ideas, nuestros hallazgos indicarían un inicio más temprano del estado senescente en las células epiteliales cultivadas provenientes del grupo de donantes de mayor edad.

Estudios anteriores han reportado el hallazgo de acúmulos de células senescentes asociados con lesiones preneoplásicas, displásicas o hiperplásicas benignas, morfológicamente normales y carentes de capacidad invasiva (40-42), así como con tejidos normales o tumorales sometidos previamente a quimioterapia (43-45). En contraste, las células senescentes han estado ausentes cuando las lesiones premalignas han progresado hacia la malignidad.

Estos hechos han llevado a proponer a la senescencia como un atractivo marcador de premalignidad, teniendo en cuenta que, en conjunto con la apoptosis y en su calidad de guardián contra el desarrollo neoplásico, actúa como proceso inhibitor del crecimiento, en forma acoplada con las señales proliferativas propias de la oncogénesis (42,

46). A diferencia de las apoptóticas, las células senescentes son viables, incluso por largo tiempo, a pesar de hallarse en un estado de detención del ciclo celular, que 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 (47). En los organismos jóvenes sanos, existe evidencia del papel protector de la senescencia como limitante de la transformación maligna (42, 46, 48, 49), en oposición al papel protumorigénico que ejerce en las edades avanzadas (50-52) en un claro pleiotropismo antagónico.

Aunque incapaces de dividirse, las células senescentes permanecen metabólicamente activas y, de hecho, adquieren un fenotipo secretor especial. Así, comienzan a 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 solo detienen su crecimiento, sino también experimentan cambios en la expresión de ciertos genes. Además, se tornan resistentes a la apoptosis (47, 50), y si se considera que su aumento da lugar a la formación de acúmulos perdurables en el tiempo, logran alterar la homeostasis del tejido e influir en su envejecimiento y posible transformación maligna, en los individuos de mayor edad (52). 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 ciertas enfermedades, como la coronaria, Alzheimer, disfunción endotelial, osteoartritis, degeneración muscular, formación de úlceras, diabetes y cáncer por ejemplo (53-56).

REFERENCIAS

1. **Auersperg N, Wong AS, Choi K, Kang SK, Leung PCK.** Ovarian surface epithelium: Biology, Endocrinology and Pathology. *Endocr Rev* 2001; 22:255-288.
2. **Wright JW, Toth-Fejel S, Stouffer RL, Rodland KD.** Proliferation of rhesus ovarian surface epithelial cells in culture: lack of mitogenic response to steroid or gonadotropic hormones. *Endocrinology* 2002; 143:2198-2207.
3. **Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, Dey SK.** Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res* 2005; 65:3735-3744.
4. **Campisi J.** Aging, tumor suppression and cancer: High-wire act! *Mech Ageing Dev* 2005; 126: 51-58.
5. **Herbst AL.** The epidemiology of ovarian carcinoma and the current status of tumor markers to detect disease. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1099-1105.
6. **Wong AS, Auersperg N.** Ovarian surface epithelium: Family history and early events in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003:1-70. En: <http://www.RBEj.com/content/1/1/70> (Fecha último acceso: febrero 26 de 2010).
7. **Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:9363-9367.
8. **Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O.** Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 2009; 4:1798-1806.
9. **Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GS, Kricka LJ.** Chemoluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal Biochem* 1994; 219:169-181.
10. **López NE, Martínez CM, Konigsberg M.** La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Rev Educ Bioquim* 2005; 24:47-53.
11. **Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES.** Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 2006; 5:187-195.
12. **Coates SS, Lehnert BE, Sharma S, Kindell SM, Gary RK.** Beryllium induces premature senescence in human fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 70-79.
13. **Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD.** Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000; 113: 3613-3622.
14. **Gerland LM, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, French M.** Association of increased autophagic inclusions labeled for β -galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol* 2003; 38:887-895.
15. **Untergasser G, Gander R, Rumpold H, Heinrich E, Plas E, Berger P.** TGF β cytokines increase senescence-associated β -galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence. *Exp Gerontol* 2003; 38:1179-1188.
16. **Gossrau R, Lojda Z, Steward PJ.** Glycosidase. 1991. 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. β -galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1100:323-332.
17. **Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J.** The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* 2005; 205:147-157.
18. **Streit WJ.** Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* 2006; 29:506-510.
19. **Erusalimsky JD.** Vascular endothelial senescence: from mechanisms to patho-

- physiology. *J Appl Physiol* 2009; 106:326-332.
20. **Burton DG.** Cellular senescence, ageing and disease, *Age* 2009; 31:1-9.
 21. **Dunfield LD, Shepherd TG, Nachtigal MW.** Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cells. *Biol Proceed Online* 2002; 4:55-65.
 22. **Hayflick L, Moorhead PS.** The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25:585-621.
 23. **Siemens CH, Auersperg N.** Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. *J Cell Physiol* 1988; 134:347-356.
 24. **Auersperg N, Maines-Bandiera SL** Culture and characterization of human ovarian surface epithelium. En: Bartlett JMS (ed) *Ovarian Cancer Methods Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000 pp 169-173.
 25. **Shepherd TG, Thériault BL, Campbell EJ, Nachtigal MW.** Primary culture of ovarian surface epithelial cells and ascites-derived ovarian cancer cells from patients. *Nat Protoc* 2006; 1:2643-2649.
 26. **Campisi J, D'Adda di Fagagna F.** Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Mol Cell Biol* 2007; 8:729-740.
 27. **Hannah R, Stroke I, Betz N.** Beta-glo® assay system: a luminescent B-galactosidase assay for multiple cell types and media. *Cell Notes* 2003; 6:16-18. En: www.pomega.com. Fecha último acceso: octubre 11 de 2009.
 28. **Maier AB, Westendorp RG, Van Heemst D.** Beta-galactosidase activity as a biomarker of replicative senescence during the course of human fibroblast cultures. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1100:323-332.
 29. **Auersperg N, Siemens CH, Myrdal SE.** Human ovarian surface epithelium in primary culture. *In Vitro* 1984; 20:743-755.
 30. **Wong AS, Leung PC, Maines-Bandiera SL, Auersperg N.** Metaplastic changes in cultured human ovarian surface epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998; 34:668-670.
 31. **Piek JM, Dorsman JC, Shvarts A, Ansink AC, Massuger LF, Scholten P, van Diest PJ, Dijkstra JC, Weegenaar J, Kenemans P, Verheijen RH.** Cultures of ovarian surface epithelium from women with and without a hereditary predisposition to develop female adnexal carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 92:819-826.
 32. **Liton PB, Lin Y, Luna C, Li G, Gonzalez P, Epstein DL.** Cultured porcine trabecular meshwork cells display altered lysosomal function when subjected to chronic oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:3961-3969.
 33. **Liton PB, Lin Y, Gonzalez P, Epstein DL.** Potential role of lysosomal dysfunction in the pathogenesis of primary open angle glaucoma. *Autophagy* 2009; 5:122-124.
 34. **Ballabio A.** Impairment of autophagy in lysosomal storage diseases. *Mol Genet Metab* 2009; 96:S14.
 35. **Sharpless NE.** Ink4a/Arf links senescence and aging. *Exp Gerontol* 2004; 39:1751-1759.
 36. **Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE.** p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006; 443:453-457.
 37. **Yang L, Suwa T, Wright WE, Shay JW, Hornsby PJ.** Telomere shortening and decline in replicative potential as a function of donor age in human adrenocortical cells. *Mech Ageing Dev* 2001; 122:1685-1694.
 38. **Patil CK, Mian S, Campisi J.** The thorny path linking cellular senescence to organismal aging. *Mech Ageing Dev* 2005; 126:1040-1045.
 39. **Lithgow GJ, Walker GA.** Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mech Ageing Dev* 2002; 123:765-771.
 40. **Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP.** Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of PTEN deficient tumorigenesis. *Nature* 2005; 436:725-730.
 41. **Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters A, Schlegelberger B, Stein H, Doerken B, Jenuwein T, Schmitt CA.** Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 2005; 436:660-665.

42. **Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schumacher AJ, Barradas M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M.** Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* 2005; 436:642.
43. **Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW.** A senescence program controlled by p53 and p16ink4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002; 109:335-346.
44. **Te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP.** DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 1876-1883.
45. **Roninson IB.** Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 2003; 63:2705-2715.
46. **Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peepers DS.** BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436:720-724.
47. **Ben-Porath I, Weinberg RA.** The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biology* 2005; 37:961-976.
48. **Wright WE, Shay JW.** Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 98-103.
49. **Ramsey MR, Sharpless NE.** ROS a tumour suppressor? *Nat Cell Biol* 2006; 8:1213-1215.
50. **Krtolica A, Campisi J.** Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34:1401-1414.
51. **Campisi J.** Cancer and ageing: rival demons? *Nature Rev Cancer* 2003; 3:339-349.
52. **Shay JW, Wright WE.** Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 2005; 26:867-874.
53. **Dohi, Kojima M, Sato K, Luscher TF.** Age-related changes in vascular smooth muscle and endothelium. *Drugs Aging* 1995; 7:278-291.
54. **Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN, Smith SK, Lawton JJ, Ostler EL, Rhys-Williams W, Kipling D, Faragher RG.** Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: A link to atherosclerosis and vascular calcification. *Exp Gerontol* 2009; 44: 659-665.
55. **Carnes BA, Staats DO, Sonntag WE.** Does senescence give rise to disease? *Mech Ageing Dev* 2008; 129:693-699.
56. **Carnero A.** Cellular senescence as a target in cancer control. *Curr Canc Ther Rev* 2007; 3:3-15.