

# Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biotecnología de la salud

## Techniques for detecting *in vitro* apoptosis and cell senescence and their importance in health biotechnology

Mauricio Martínez Salazar<sup>1</sup>

---

### Resumen

Se presenta una revisión bibliográfica sobre las principales técnicas de detección de los niveles de apoptosis y senescencia celular para aplicación en cultivo de células animales y humanas, dada la importancia de establecer la metodología más adecuada para su implementación en investigación biológica y biomédica que usa este tipo de células como medios de diagnóstico, experimentación y obtención de alternativas terapéuticas. Existe la necesidad de aplicar técnicas estandarizadas para evaluación y monitoreo del cultivo de células ya que esto garantiza la calidad del mismo cuando este tiene aplicación en el campo clínico. La apoptosis y la senescencia celular se perfilan como parámetros biológicos idóneos para esta valoración. La apoptosis se considera una forma de muerte celular que, a diferencia de la necrosis, es ordenada, programada y dependiente de energía, que implica la activación de un grupo de enzimas proteolíticas denominadas caspasas y una cascada molecular intracelular hasta la desaparición completa de la célula. La senescencia celular se define como la pérdida irreversible de la capacidad proliferativa de la célula que al mismo tiempo se encuentra en un estado metabólicamente activo. Se muestra una comparación entre las técnicas de detección de estos fenómenos y, finalmente, se enfatiza en la opción de implementar multiensayos para una determinación más sensible y rigurosa de apoptosis y senescencia celular *in vitro*.

**Palabras clave:** apoptosis, senescencia celular, detección de apoptosis *in vitro*, Detección de senescencia celular *in vitro*.

### Abstract

This article reviews the main techniques for detecting apoptosis and cell senescence levels for application in animal and human cell cultures, given the importance of establishing the most appropriate methodology for implementing them in biological and biomedical research which uses these kinds of cell for diagnosis, research and in therapeutic alternatives. There is a need for implementing standardised techniques for assessing and monitoring cell cultures as this guarantees culture quality if they can be applied in the clinical field. Apoptosis and cell senescence appear to be good biological parameters for such evaluation. Apoptosis is considered to be a form of organised and programmed cell death, unlike necrosis; this process is energy-

---

<sup>1</sup> Biólogo, Investigador Laboratorio de Biomiméticos, Área de Biotecnología de la Salud, Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), Bogotá, Colombia. maumartinezs@unal.edu.co

dependent, implying the activation of proteolytic enzymes called caspases and an intracellular molecular cascade until a cell completely disappears. Cell senescence is defined as being the irreversible loss of a cell's proliferative capacity whilst still metabolically active. This analysis contrasts techniques for detecting such phenomenon and emphasises the possibility of implementing multi-assays for a more sensitive and rigorous determination of *in vitro* apoptosis and cell senescence.

**Key words:** apoptosis, cell senescence, *in vitro* apoptosis detection, *in vitro* cell senescence detection.

Recibido: agosto 11 de 2009

Aprobado: noviembre 12 de 2009

## Introducción

El cultivo de células animales y humanas *in vitro* es una de las técnicas más empleadas actualmente en investigación biológica y biomédica, ya que constituye un modelo experimental eficaz si se realiza bajo estándares de calidad y aplicando la rigurosidad del método científico.

Esta técnica permite llevar a cabo una amplia gama de investigaciones a nivel tisular, celular, bioquímico y molecular, extendiendo el conocimiento de una gran variedad de procesos fisiológicos a fin de aplicarlos al diagnóstico y tratamiento de un sinnúmero de enfermedades.

Se ha establecido que el objetivo principal del cultivo de células animales y humanas es estandarizar e implementar procedimientos que permitan mantener y expandir una población de células de interés (Freshney, 2005), aplicando una rigurosa evaluación y monitoreo de dicho cultivo de manera constante y/o rutinaria. Esta valoración solo puede llevarse a cabo si se conoce el comportamiento normal de un cultivo de células animales y humanas. En este sentido, Phelan (1998) ha establecido que la evolución de un cultivo celular primario se puede clasificar en cuatro estados: primero, se evidencia una adaptación por parte de las células en el ambiente *in vitro*. Segundo, las células y el cultivo entran en una fase exponencial de crecimiento hasta aproximadamente el pasaje 30 dependiendo del tipo de célula. En el tercer estado hay una disminución clara en la tasa de crecimiento del cultivo y, finalmente, en el cuar-

to y último estado se observan fenómenos de senescencia y muerte por parte de las células y del cultivo completo. Esta dinámica de fases es dependiente del tipo de célula y las condiciones propias del cultivo. Freshney (2005), además, ha planteado que los procesos de senescencia y muerte celular pueden presentarse en todas las fases de un cultivo primario de células, ya sea por condiciones externas del manejo del cultivo o por las mismas células. Por esto, en cada uno de los estados se deben implementar ensayos estandarizados de viabilidad, apoptosis y senescencia celular con el fin de garantizar la calidad a lo largo del tiempo de vida de las células y del cultivo, por lo cual aplicar técnicas adecuadas y eficientes para la medición de estos parámetros biológicos certifica un óptimo seguimiento del cultivo, además de los procedimientos para su elaboración, y así establecer condiciones estándares de investigación y aplicación en un gran rango de áreas biomédicas (Phelan, 1998).

Los cultivos de células humanas representan el punto de partida para muchos tipos de aplicaciones técnico-científicas en el área de la salud, un ejemplo de ellas es la obtención de equivalentes de tejidos. Éstos constituyen la base para el tratamiento de múltiples enfermedades asociadas a la pérdida, daño físico y/o funcional de tejidos humanos que en muchas ocasiones no pueden ser reemplazados por trasplante principalmente por rechazo del paciente, entre otras circunstancias. Bajo esta condición, y poniendo en consideración posibles aplicaciones terapéuticas, se hace más fuerte la necesidad de implementar técnicas

que permitan una evaluación y monitoreo de parámetros biológicos del cultivo que faciliten la estandarización de procedimientos para su eficaz obtención, mantenimiento y aplicación.

La apoptosis y senescencia celular son excelentes parámetros biológicos que determinan el estado y posible utilización del cultivo, porque revelan condiciones específicas de la célula a nivel fisiológico, morfológico, bioquímico y genético que no pueden ser reconocidas de manera tan completa y clara por otros parámetros celulares, además de estar relacionados con la generación de múltiples fenotipos patológicos que no son convenientes a la hora de implementar mecanismos terapéuticos. Se ha evidenciado que las células en un ambiente *in vitro* se ven enfrentadas a múltiples agentes perjudiciales extrínsecos e intrínsecos, cuya acumulación resulta en daños a nivel estructural, funcional y fisiológico en los componentes celulares (Vicencio *et al.*, 2008). En respuesta a estos daños, la célula activa una serie de complejas vías bioquímicas y genéticas que resultan en fenotipos particulares asociados a muerte y senescencia celular, lo que eventualmente puede significar un estado de deterioro del cultivo, el cual no tendría aplicabilidad médica pues representaría un riesgo alto.

Los factores reportados que se identifican en el medio de cultivo de células animales y humanas que activan procesos de apoptosis y senescencia son: estrés oxidativo, falta de nutrientes, grandes variaciones de temperatura, confluencia celular, exceso de utilización de enzimas proteolíticas (tripsina, dispasas, colagenasas, etc.), presencia de agentes nocivos, contaminación del medio, tipo de células, entre otros (Dimri *et al.*, 1995; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007). Lo que no es claro aún es qué determina si una célula experimentará apoptosis o senescencia, aunque se han reportado teorías respaldadas con datos experimentales que muestran su relación a nivel molecular y genético (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Vicencio *et al.*, 2008).

Este artículo presenta el análisis obtenido de la revisión de artículos científicos inter-

nacionales de revistas adscritas a las bases de datos del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Nacional de Colombia (Sinab), con temas relacionados a estos fenómenos y su detección *in vitro*, además de libros con protocolos de técnicas aplicadas a biología celular y molecular, y manuales de técnicas, reactivos y kits comerciales.

El objetivo de este artículo es exponer una revisión de las principales técnicas que permiten una eficaz detección y eventual cuantificación de los procesos de apoptosis y senescencia celular en un cultivo primario de células (animales y humanas) desarrolladas desde que los conceptos fueron propuestos (1972 para apoptosis; 1961 para senescencia celular) hasta los últimos tres años; sin embargo, se encuentra que las técnicas no son mostradas de manera profunda, pues cada una de ellas daría para una mayor discusión.

Se presenta inicialmente una introducción de los fenómenos y las características principales para su detección, posteriormente las técnicas de detección y una comparación entre ellas y, finalmente, se pretende evidenciar la necesidad de implementar este tipo de ensayos de manera rutinaria en los procedimientos normales de cultivo primario de células que tienen por objetivo aplicaciones clínicas como lo es el desarrollo de equivalentes de tejidos entre otras investigaciones en el campo de la biotecnología de la salud.

## Apoptosis

Según Elmore (2007) la apoptosis se puede definir como: “un proceso coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas denominadas ‘caspasas’ (en inglés: cysteinyl aspartate-specific proteases) y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula”.

Dentro de este proceso hay una gran cantidad de interacciones proteicas como entrecruzamientos, rompimientos, síntesis y de-

gradación, además de un reordenamiento de estructuras celulares, elevando significativamente el consumo de energía por parte de la célula, logrando su efectiva degradación para finalmente ser “reciclada” por parte de otras células. Se ha reportado que el tiempo que le toma a una célula en llevar a cabo este proceso depende del tipo de célula y las características de activación, pero en promedio es de 2 a 3 horas (Elmore, 2007). En un cultivo de células la activación de este proceso depende de múltiples factores que estimulan las vías de iniciación, como ejemplo de ello se ha observado que si se presentan alteraciones en los procedimientos de subcultivo en el momento de confluencia celular, se ve afectado el índice mitótico promedio de las células, y posteriormente una activación del proceso apoptótico (Phelan, 1998).

Uno de los aspectos más importantes frente a esta dinámica es que la muerte celular no solo puede darse por apoptosis. Como lo observaron inicialmente Kerr et al. (1972), la muerte celular puede ocurrir por medio de dos vías principales claramente distinguidas en su naturaleza: apoptosis y necrosis (Kerr et al., 1972; Zhivotovsky y Orrenius, 2001). Se ha postulado y comprobado que la necrosis celular es un proceso desordenado e independiente de energía, presenta cambios irreversibles en

el núcleo celular (cariólisis) y pérdida de la estructura citoplasmática, además hay una clara disfunción en la mitocondria y aumento en el volumen celular, desencadenando citólisis (Zhivotovsky y Orrenius, 2001), y posteriormente liberando todo el material citoplasmático hacia el exterior de la célula, produciendo generalmente fenotipos inflamatorios y necróticos en los tejidos afectados; mientras que el proceso apoptótico establece mecanismos que aseguran que el contenido celular no será liberado, sino encapsulado y luego removido en su totalidad por células limpiadoras (Campisi, 2003).

En la tabla 1 se presenta una síntesis comparativa de las principales características morfológicas de los procesos de apoptosis y necrosis.

En la obtención y el mantenimiento de un cultivo de células es de suma importancia conocer el tipo de muerte celular (Baskić et al., 2006) pues esto ayudará a evaluar de manera más específica los procedimientos, reactivos y células que se emplearon. Estas características citomorfológicas son de gran utilidad a la hora de detectar células apoptóticas y diferenciarlas de las necróticas.

Las anteriores transformaciones morfológicas y estructurales son producto de una serie de eventos moleculares cuya caracterización y

**Tabla 1.** Comparación de características citomorfológicas de los procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis. Adaptada de Elmore (2007).

Característica	Apoptosis	Necrosis
Número de células	Células individuales o pequeños grupos de células	Generalmente grandes cantidades
Volumen celular	Encogimiento celular	Hinchamiento celular, citólisis
Efecto en integridad de membrana plasmática	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
Efecto en citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
Efecto en núcleo	Condensación de cromatina (Picnosis)	Fragmentación del núcleo y cromatina
Procesos de inflamación tisular	No hay presencia de inflamación	Inflamación usualmente presente

entendimiento facilitan la implementación de técnicas cada vez más confiables a la hora de determinar los niveles de apoptosis. Huerta *et al.* (2007) describe dos tipos principales de vía de iniciación apoptótica: extrínseca e intrínseca, Elmore (2007) reporta adicionalmente la vía mediada por el sistema Perforina / Granzima.

La vía de señalización extrínseca que inicia apoptosis se denominó así ya que involucra interacciones mediadas por receptores transmembranales (Elmore, 2007), se ha descrito que esta vía es iniciada por unión de: 1) el TNF (Factor de Necrosis Tumoral) ligando al TNF receptor; (2) el TRAIL (en inglés: TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) a los receptores DR4 (en inglés: Death Receptor-4) y DR5; o 3) el FasL (en inglés: Fatty acid synthetase Ligand) al receptor FasR (Huerta *et al.*, 2007). Se conoce que estas asociaciones reclutan moléculas adaptadoras como FADD (en inglés: Fas-Associated Death Domain) o TRADD (en inglés: TNF Receptor-Associated Death Domain), las cuales activan caspasas iniciadoras -8 y -10 y finalmente se da la activación de caspasas ejecutoras -3, -6 y -7, lo que culmina en un fenotipo celular apoptótico con características fisiológicas y morfológicas descritas en la tabla1 (Huerta *et al.*, 2007).

En la cascada de señalización intrínseca se ha reportado una serie de estímulos intracelulares, específicamente en la mitocondria, que causan cambios estructurales en la membrana mitocondrial, principalmente por la apertura de poros de transición y alteración en el potencial transmembranal, lo que conlleva una liberación hacia el citosol de sustancias pro-apoptóticas que en estado normal permanecen dentro del espacio intermembranal (Saelens *et al.*, 2004; Elmore, 2007). Estos componentes liberados han sido clasificados en dos grupos principales constituidos por: 1) Citocromo *c*, Smac/Diablo (en inglés: Second mitochondrial activator of caspases / Direct IAP Binding protein with low PI) y la serín-proteasa HtrA2/Omi (en inglés: High-temperature requirement) (Du *et al.*, 2000; Garrido *et al.*, 2005; Elmore, 2007), estos impulsan la cascada apoptótica vía activación

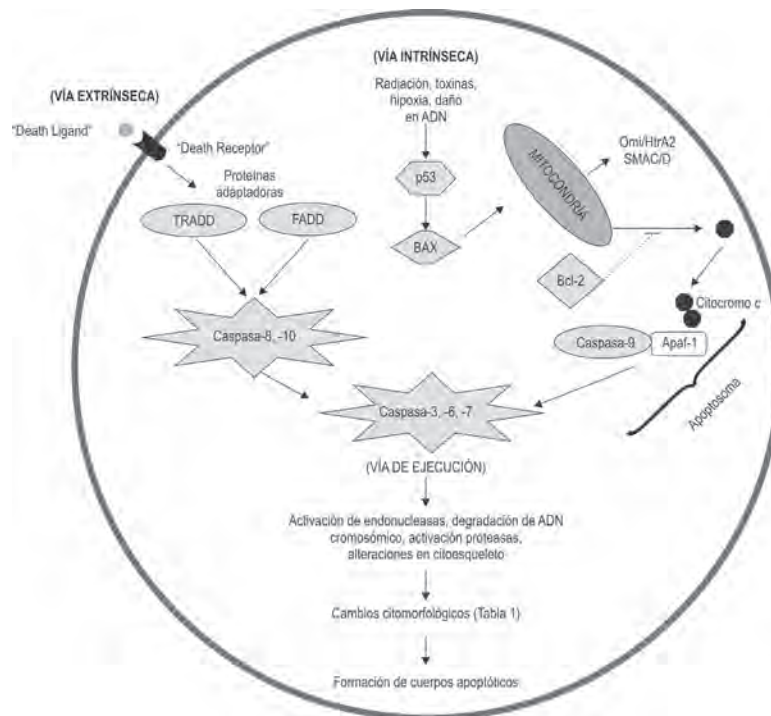
de caspasas. Se ha descubierto que la liberación de citocromo *c* activa la proteína Apaf-1 (en inglés: Apoptotic protease activating factor-1) y la procaspasa-9, además de ATP, estableciendo un complejo proteico denominado “apoptosoma”, el cual activa la caspasa-3, iniciando la vía efectora de apoptosis (Chinnaiyan, 1999; Hill *et al.*, 2004; Huerta *et al.*, 2007), mientras que las proteínas Smac/Diablo y HtrA2/Omi promueven apoptosis por inhibición de IAP (inhibidores de proteínas apoptóticas) como cIAP1, cIAP2 y XIAP (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007); 2) factores inductores de apoptosis (AIF), endonucleasa G y la DNasa activada por caspasas (CAD). Estos últimos se liberan hacia el citosol, entran en el núcleo y fragmentan el ADN (Elmore, 2007). La importancia de la degradación de ADN por endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  radica en que generan fragmentos de 180 a 200 pares de bases (Bortner *et al.*, 1995; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007), este patrón de fragmentos es altamente específico, y es un factor muy claro que diferencia este tipo de muerte celular programada con la necrosis, la cual no presenta patrón de degradación ni especificidad en los tamaños de los fragmentos.

Actualmente se conoce que las proteínas reguladoras de los cambios estructurales en la membrana mitocondrial son de la familia Bcl-2, cuya función puede ser apoptótica o anti-apoptótica, quienes a su vez son controladas por la proteína supresora de tumores p53. Elmore (2007) reporta que las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, y algunas de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk. Estas proteínas pueden eventualmente ser detectadas como un referente de gran confianza de activación del proceso apoptótico.

En la figura 1 se presenta un resumen de las vías de señalización que activan el proceso apoptótico.

Una de las características distintivas del proceso apoptótico, como se observó en las





**Figura 1.** Representación esquemática de las vías de señalización celular de activación de apoptosis en una célula. Las principales vías son la extrínseca y la intrínseca, las cuales activan la vía de ejecución.

vías de señalización, es la activación de enzimas proteolíticas caspasas; éstas han sido clasificadas en: iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10); efectoras (caspasa-3, -6 y -7), las cuales degradan varios sustratos como citoqueratinas, Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP), proteínas de citoesqueleto y membrana plasmática; y caspasas inflamatorias (caspasa-1, -4 y -5) (Cohen, 1997; Elmore, 2007). La caspasa-11 se reportó como reguladora; la caspasa-12 como mediadora de apoptosis endoplásmico-específica; la caspasa-13 fue descrita para bovinos; y la caspasa-14 que es expresada en tejidos embrionarios pero no en adultos (Hu *et al.*, 1998; Elmore, 2007). Cada una de ellas en su forma activa es un sustrato efectivo a la hora de detectar una célula apoptótica por medio de múltiples técnicas.

La expresión de marcadores en la superficie externa de la membrana plasmática también es un hecho característico en células apoptóticas. Se ha observado una translocación

de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana hacia la externa gracias a la acción de proteínas de membrana translocasas, ofreciendo un mecanismo de reconocimiento para las células fagocíticas (Vermes *et al.*, 1995; Bratton *et al.*, 1997; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007). Se ha descrito que este fenómeno es un biomarcador efectivo para la detección de una célula apoptótica (Vermes *et al.*, 1995; Bratton *et al.*, 1997; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Arur *et al.*, 2003; Pozarowski *et al.*, 2003; Elmore, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Gasser *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista genético hay clara evidencia de que, a diferencia del proceso necrótico, el fenómeno de apoptosis involucra una dinámica entre genes específicos los cuales hacen parte de una vía genética evolutivamente conservada en muchos organismos, desde el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (el cual es empleado como modelo biológico para estudios

en embriología y muerte celular programada) hasta el ser humano (Horvitz, 1999).

Los principales genes que se han reportado por regular de manera positiva o negativa apoptosis en células humanas incluyen: 1) genes inhibidores: *bcl-2* y *bcl-x<sub>L</sub>*; y 2) genes promotores: *bax*, *bcl-x<sub>s</sub>*, *ICE* (en inglés: Interleukin 1- $\beta$  Converting Enzyme), *c-myc* y *p53* (Mastrangelo y Betenbaugh, 1995).

Las mutaciones en estos genes claves del proceso apoptótico contribuyen a fenotipos patológicos de enfermedades humanas tan significativas como el cáncer, entre otras (Müllauer *et al.*, 2001).

En síntesis, hay clara evidencia que muestra que el mecanismo por el cual es regulada la apoptosis ofrece múltiples puntos claves para su detección efectiva *in vitro*. Continuar la investigación de estos mecanismos facilitará la implementación de tecnologías cada vez más sensibles que permitan mayor confianza a la hora de detectar células apoptóticas en un cultivo primario de células animales y humanas para evaluación y monitoreo del cultivo cuando éste eventualmente pueda tener aplicaciones en áreas biomédicas incluyendo el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

### **Detección de células apoptóticas *in vitro***

Pozarowski *et al.* (2003) han señalado que determinar el método adecuado para medir niveles de apoptosis en cultivo depende principalmente del tipo de células, las características posibles de inducción, las restricciones técnicas, el presupuesto, entre otras condiciones. Sin embargo, Elmore (2007) ha clasificado los métodos de detección de apoptosis en: 1) alteraciones citomorfológicas; 2) fragmentación de ADN; 3) detección de caspasas, fragmentación de sustratos, reguladores e inhibidores; 4) alteraciones de membrana; y 5) ensayos mitocondriales. Todos y cada uno de ellos tienen ventajas y desventajas tanto técnico-científicas

como costo-efectivas, dependiendo del objetivo de la medición.

Una observación de pequeñas secciones de tejidos aplicándoles una sencilla tinción histológica con una mezcla de hematoxilina/eosina (HE) en un microscopio de luz puede revelar la presencia de células apoptóticas según criterios morfológicos generales y diferenciarlas de las células necróticas según algunos de los parámetros presentados en la tabla 1. Este método es rápido, económico en reactivos y equipos, y no requiere de un técnico especializado. Sin embargo, solo puede detectar estados tardíos de apoptosis, además de ser un método altamente cualitativo y subjetivo a las capacidades del investigador en cuanto a observación y detección. A pesar de esto, la observación de características morfológicas se mantiene como un parámetro clave, pues su reconocimiento en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) es considerado el método “gold standard” para confirmar el estado apoptótico en una célula (Elmore, 2007). Las características que deben estar presentes en la observación deben ser, según Elmore (2007): 1) núcleo electrodens; 2) fragmentación nuclear; 3) membrana celular intacta; 4) desorganización de organelos citoplasmáticos; 5) vacuolas claramente alargadas; y 6) protuberancias irregulares (en inglés: blebs) en la superficie celular. Igualmente, se ha reportado que por medio de la técnica TEM es posible visualizar la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (Elmore, 2007). Básicamente, las células son fijadas, teñidas, deshidratadas, embebidas y cortadas en pequeñas secciones con ayuda de un ultramicrotomo, las cuales son observadas en microscopio electrónico (Huerta *et al.*, 2007). Sin embargo, se considera que esta metodología es costosa, consume mucho tiempo si se analizan grandes cantidades de muestras, es cualitativa y subjetiva, además que no detecta estadios tempranos en el proceso apoptótico (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007).

El patrón de fragmentación de ADN en una célula apoptótica se puede detectar mediante extracción de ADN y separación mediante electroforesis en gel de agarosa. Se ha

establecido que se deben observar bandas de tamaño aproximado de 180 a 200 pares de bases (Elmore, 2007); esta es una metodología fácil, rápida y relativamente económica, pero detecta fragmentación de ADN en estados avanzados de apoptosis, es cualitativa y se ha reportado que necesita grandes cantidades de células (al menos 1 millón de células) (Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007), diferente a las técnicas que emplean marcadores de ADN que se pueden aplicar en una baja concentración de células (INVITROGEN™, 2009). El manual de pruebas moleculares de INVITROGEN™ (2009), reporta los siguientes marcadores de ADN para evaluación de apoptosis por técnicas principalmente fluorométricas: YO-PRO-1; SYTO 13 y SYTO 16; Hoechst 33342 combinado con Calceína AM y 7-aminoactinomicina D (7-ADD); naranja de acridina; diamidino fenil indol (DAPI); etidio mono-ácido; y bromuro de etidio, además de 5 kits de ensayos para detección de apoptosis a partir de combinaciones de los anteriores marcadores de ADN. Estos ensayos demandan costo, tiempo y manejo de técnicas especializadas.

Uno de los ensayos históricamente significativos es el denominado Tunel (en inglés: Terminal dUTP Nick End-Labeling), el cual es implementado para determinar los fragmentos de ADN cortados por la acción de endonucleasas, marcándolos colorimétrica o fluorescentemente mediante un proceso enzimático, y visualizándolos en microscopio de luz, de fluorescencia o citómetro de flujo (Pozarowski *et al.*, 2003; Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007). Este método es rápido, pero costoso y poco sensible, pues se ha reportado que puede registrar falsos positivos de células necróticas y células en proceso de reparación de ADN y transcripción de genes (Elmore, 2007). Esta técnica puede ser empleada para establecer apoptosis *in vitro* e *in situ*, pero se recomienda que los resultados sean soportados por otras técnicas (Huerta *et al.*, 2007).

La apoptosis también puede ser revelada a partir de una cuantificación de la actividad enzimática de caspasas, reportada como un

marcador eficiente, por ejemplo, si se aplica el sustrato de reconocimiento Z-DEVD-AFC a la caspasa-3 (efectora) (INVITROGEN™, 2009). Esta actividad puede ser determinada por varias técnicas como Western blot, Inmunoprecipitación e Inmunohistoquímica (Elmore, 2007).

Igualmente, se puede medir el fraccionamiento de muchos sustratos implicados en la cascada de señalización celular, un ejemplo de ellos es la enzima Poli ADP-Ribosa (PARP), fraccionada en estadios apoptóticos tardíos por parte de la caspasa-3 (ejecutora) (Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007). Se reporta que este sustrato es cortado en dos fragmentos de 89 y 24 kDa cada uno, que se pueden determinar por Western o inmunohistoquímicamente con el anticuerpo PARP-p89 (Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Huerta *et al.*, 2007), diferenciando apoptosis de necrosis.

En la categoría de alteraciones membranales se reporta uno de los ensayos más importantes, el de anexina V conjugada con una gran variedad de fluorocromos: Alexa Fluor (350, 488, 568, 594 y 647), Fluoresceína (FITC), Verde de Oregon 488, R-Ficoeritrina, Alofocianina y Pacific Blue (INVITROGEN™, 2009) para la detección de células apoptóticas. La anexina V es una proteína recombinante que se une específicamente a residuos de fosfatidilserina, los cuales se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática, y es un biomarcador efectivo en células apoptóticas (Bratton *et al.*, 1997; Arur *et al.*, 2003; Pozarowski *et al.*, 2003; Vermes *et al.*, 1995; Elmore, 2007). La anexina V puede ser combinada con un marcador de ADN que no sea permeable a la membrana a menos que esta se vea comprometida, con el fin de distinguir células apoptóticas de necróticas.

Se ha evidenciado que la combinación de anexina V-FITC y el marcador catiónico yoduro de propidio (IP) puede garantizar esta diferenciación, registrando células no apoptóticas (anexina V-FICT negativo / IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V-FICT positivo / IP negativo) y células necróticas



(anexina V-FICT positivo / IP positivo) (Pozarowski *et al.*, 2003; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2007; Gasser *et al.*, 2009). Las muestras son analizadas en citómetro brindando una cuantificación objetiva y rápida. Sin embargo, Ribble *et al.*, (2005) establecen que este método parte de un desprendimiento celular (en el caso de células anclaje dependientes), lavado y transferencia de células, lo que eventualmente puede dañar la membrana y alterar significativamente los resultados.

Como se estableció en la primera parte, uno de los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la apoptosis es mediante una vía de señalización intrínseca, que involucra una serie de eventos, proteínas y genes asociados a mitocondria en estados tempranos del proceso. Se ha registrado que, en lo que concierne a esta vía, se puede determinar la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), el estado de oxidorreducción, la actividad metabólica mitocondrial, la liberación de citocromo *c*, proteínas reguladoras pro o anti-apoptóticas, entre otros factores (Elmore, 2007). Se sabe que la pérdida de potencial transmembranal mitocondrial puede ser evaluada en citometría de flujo utilizando fluorocromos lipofílicos catiónicos permeables; los principales marcadores son Rodamina 123 o DiOC6(3) y JC-1 (INVITROGEN™, 2009). Para detectar las proteínas liberadas hacia el citosol se emplean generalmente anticuerpos que garanticen su reconocimiento y observación. Existe una serie de kits que permiten esta determinación (INVITROGEN™, 2009), son relativamente fáciles de implementar, pero son costosos y requieren conocimientos técnicos significativos.

El análisis genético del fenómeno apoptótico es ahora posible con el desarrollo de novedosas técnicas que detectan expresión de gran cantidad de genes simultáneamente (Huerta *et al.*, 2007). Se ha empleado análisis por microarreglos, RT-PCR y Western blot, los cuales brindan información específica del estado celular a nivel genético (Huerta *et al.*, 2007). Estas técnicas son costosas, además de ser con-

sideradas por Elmore (2007) como “metodológicamente complejas”.

En la tabla 2 se presenta un resumen de las técnicas que detectan apoptosis *in vitro*.

A pesar de que se han diseñado una gran variedad de técnicas dependientes de variables apoptóticas evidentes, no se ha establecido una única metodología que sea lo suficientemente específica a la hora de la determinación de los niveles de apoptosis *in vitro*. Se ha enfatizado en la necesidad de aplicar multiensayos que confirmen y cuantifiquen de manera más precisa, rápida y costo-efectiva estos niveles (Elmore, 2007), que en última instancia son de gran utilidad en investigación de patologías humanas y animales, y estimación de la viabilidad del cultivo y su aplicación biomédica entre muchas otras aplicaciones.

### Senescencia celular

El concepto de senescencia celular fue propuesto hace aproximadamente cuatro décadas por Leonard Hayflick (1961) como: “la pérdida irreversible de la capacidad proliferativa de células que se mantienen en un estado metabólicamente activo necesario para su supervivencia” (Hayflick y Moorhead, 1961; Cristofalo y Pignolo, 1996; Bandyopadhyay *et al.*, 2005; Campisi y d’Adda di Fagagna, 2007; Jeyapalan y Sedivy, 2008). A partir de ahí se ha propuesto que las células poseen un potencial replicativo finito, denominado el límite de Hayflick (Petersen y Niklason, 2007), en el cual se ha establecido que la célula presenta un fenotipo particular, generalmente de morfología aplanada y alargada, además de presentar focos de heterocromatina y la acumulación de gránulos de lipofushina (Funayama *et al.*, 2006; Jeyapalan y Sedivy, 2008; Vicencio *et al.*, 2008), causados por varios estímulos como el acortamiento de telómeros, daño al ADN, expresión de oncogenes, entre otros (Campisi, 2003; Dasso, 2004; Bandyopadhyay *et al.*, 2005; Hampel *et al.*, 2005; Jeyapalan y Sedivy, 2008; Vicencio *et al.*, 2008). Se conoce que estos estímulos desencadenan

**Tabla 2.** Resumen de las principales técnicas y sus características más relevantes. HE: hematoxilina/eosina; TEM: microscopía de transferencia de electrones; IP: yoduro de propidio

Metodología	Discrimina necrosis		Cualitativo	Cuantitativo	Estadio que detecta	
	Sí	No			Temprano	Tardío
HE	X		X			X
TEM	X		X			X
Fragmentación de ADN-Marcadores	X		X			X
Tunel		X	X	X		X
Activación de caspasas	X		X	X	X	X
Fragmentación de sustratos (ejemplo: PARP)	X		X			X
Microarreglos/ RT-PCR	X		X		X	X
Anexina V-FITC + IP	X		X	X	X	X
Ensayos Mitocondriales	X		X	X	X	X

el fenómeno de senescencia celular por medio de dos vías de señalización: vía p53 y vía pRB (Campisi, 2005; Vicencio *et al.*, 2008).

Vicencio *et al.* (2008) reportan que en condiciones normales la proteína p53 es degradada por el complejo MDM2 (en inglés: Mouse Double Minute 2), pero cuando existe estrés mitogénico o daño del ADN se activa la primera vía de señalización, pues la actividad de MDM2 se suprime, originando que la proteína p53 active la proteína p21 (también denominada CDKN1a, p21Cip1, Waf1 o SDI1) que es inhibidora de kinasas dependientes de ciclinas (CDKI), la cual frena el ciclo celular.

En la segunda vía se ha descrito que la proteína pRB (siglas de Retinoblastoma) es activada por la proteína p16 (también denominada CDKN2a o p16INK4a) después de estrés celular o daño al ADN, y luego se une a miembros de la familia de factores transcripcionales E2F, los cuales regulan el ciclo celular (Vicencio *et al.*, 2008).

La figura 2 muestra las dos vías de señalización que activan el arresto del ciclo celular y su relación.

Se ha señalado que las células senescentes revelan sorprendentes cambios en expresión de genes relacionados directamente con las vías de señalización ya sea de manera positiva, como se observó con las proteínas p53 y p16, o de manera negativa inhibiendo genes que codifican para proteínas que estimulan o facilitan el proceso del ciclo celular, como por ejemplo histonas implicadas en el proceso de replicación, c-FOS, ciclina A, ciclina B y PCNA (siglas en inglés: Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007).

Con relación a los telómeros, los cuales son constituidos por ADN repetitivo (de secuencia 5'-TTAGGG-3' en vertebrados) en los segmentos terminales de los cromosomas (aproximadamente de 10-15kb de tamaño en humanos) más proteínas asociadas, se ha observado que la disminución en el tamaño de los extremos cromosómicos se da a una tasa



**Figura 2.** Diagrama de las dos vías de señalización intracelular en el fenómeno de senescencia celular. Posterior al arresto del ciclo celular se genera un fenotipo senescente.

de 20 a 300 pares de bases por cada división celular cuya explicación se basa en la naturaleza semiconservativa de la replicación del ADN y el denominado “problema terminal de la replicación” (Sitte *et al.*, 1998; Campisi y d’Adda di Fagagna, 2007; Jeyapalan y Sedivy, 2008), además de una disminución sustancial en la expresión de la enzima telomerasa, la cual posee un componente proteico catalítico TERT (en inglés: Telomerase Reverse Transcriptase) y una plantilla de ARN para adicionar ADN telomérico directamente a los terminales cromosómicos (Campisi y d’Adda di Fagagna, 2007).

Aparte del acortamiento significativo de extremos teloméricos, Dimri *et al.* (1995) determinaron que en fibroblastos humanos senescentes hay un aumento significativo en los niveles de la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), y estudios posteriores aceptaron esta condición como un biomarcador confiable para células senescentes (Dimri *et al.*, 1995; Kurz *et al.*, 2000; Yang y Hua, 2004). Este suceso no es claramente entendido (Kurz *et al.*, 2000), pero se tiene la hipótesis de que hace parte de la expresión de una serie de desórdenes a nivel estructural y fisiológico intracelular en el estado senescente.

### DetECCIÓN DE SENESCENCIA CELULAR *in vitro*

Se ha reportado que actualmente no existe un único marcador que determine y sea común en células senescentes o característico de células no senescentes (Dimri *et al.*, 1995; Bandyopadhyay *et al.*, 2005; Campisi y d’Adda di Fagagna, 2007; Jeyapalan y Sedivy, 2008), sin

embargo, se postula a la pérdida de replicación del ADN, a la determinación del acortamiento de telómeros, al incremento de la concentración de la enzima  $\beta$ -gal y el perfil de expresión de genes específicos como referentes eficientes para la detección de este fenómeno.

Campisi y d’Adda di Fagagna (2007) establecen que la pérdida de replicación del ADN puede ser determinada por técnicas como la incorporación de 5-bromodeoxiuridina o Timidina- $^3\text{H}$ , o inmunohistoquímica para proteínas como PCNA y Ki-67. Sin embargo, estos ensayos no distinguen entre células senescentes, quiescentes o células pos-mitóticas diferenciadas.

Una de las formas de determinar el acortamiento de telómeros es medir directamente su tamaño promedio. Se ha establecido que este tamaño puede ser medido por un método que implica una variación de Southern blot, en el cual se analizan fragmentos de restricción terminal (TRF) con una sonda marcada radiativamente que reconoce repeticiones teloméricas; el tamaño promedio se calcula comparando con un marcador de peso molecular (Herbert *et al.*, 2003; Baerlocher *et al.*, 2006). El ADN inicial es extraído y sometido a múltiples enzimas de restricción que no poseen sitios de reconocimiento en secuencias teloméricas (TTAGGG), luego se desnaturaliza y se hibrida con un oligonucleótido marcado radiativamente que posea la secuencia telomérica, y finalmente se corre en gel de agarosa donde es comparado con un patrón de medida que establece el tamaño promedio de repeticiones teloméricas. Sin embargo, se postula que este método tiene difi-

cultades relacionadas con el tiempo empleado, cantidad de muestra necesaria y complejidad en la técnica (Baerlocher *et al.*, 2006).

Otro método empleado para medir el tamaño promedio de los telómeros es mediante cuantificación de hibridación *in situ* con fluorescencia (Q-FISH), en el cual un péptido de ácido nucleico sintético (PNA) marcado con un fluorocromo es hibridado al ADN de cromosomas individuales en metafase y observado en microscopio de fluorescencia en donde se mide el tamaño de los fragmentos teloméricos analizados mediante programas computacionales especializados (Baerlocher *et al.*, 2006). Este método es básicamente cualitativo ya que solo garantiza la determinación del tamaño promedio de los cromosomas aislados.

En 1998 se adaptó una técnica nueva a partir de la técnica de Q-FISH y citometría de flujo (en inglés: Flow Cytometry) denominada Flow-FISH (Baerlocher *et al.*, 2006), considerada actualmente el método más rápido y efectivo para cuantificar células senescentes (Schmid y Jamieson, 2004; Baerlocher *et al.*, 2006). Esta técnica se basa en la hibridación de una sonda marcada fluorescentemente al ADN cuya intensidad será medida y comparada con células control cuyo tamaño telomérico ya ha sido establecido como en la línea celular 1301, estas células son el patrón para la determinación del tamaño promedio telomérico para cada célula senescente gracias a técnicas de citometría de flujo (Schmid y Jamieson, 2004; Baerlocher *et al.*, 2006).

Desde que Dimri *et al.* (1995) reportaron que en fibroblastos senescentes se observaba una sobre expresión de la enzima  $\beta$ -gal, se postuló que medir la concentración de la enzima puede determinar el estado juvenil o senescente de una célula (Dimri *et al.*, 1995; Kurz *et al.*, 2000; Yang y Hua, 2004).

Para determinar los niveles de la enzima  $\beta$ -gal, se ha propuesto una serie de compuestos que son sustrato de la enzima los cuales, luego del rompimiento por parte de la enzima,

liberan una sustancia cromogénica que puede ser observada a través de técnicas de microscopía (Dimri *et al.*, 1995; Kurz *et al.*, 2000; Yang y Hua, 2004; Gong *et al.*, 2009). Estos compuestos generalmente son derivados de galactopiranosidos. Los más empleados según Gong *et al.* (2009) son: nitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), clorofenil rojo  $\beta$ -D-galactopiranosido (CPRG), bromo-cloro-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal), fluoresceín di- $\beta$ -D-galactopiranosido (FDG) y el sustrato galactón. Hay otros compuestos que se han descrito y utilizado, Kurz *et al.* (2000) emplearon el dodecanoilamino-fluoresceín  $\beta$ -D-galactopiranosido (C<sub>12</sub>FDG), demostrando que es útil para medición por citometría de flujo, además de ser permeable a la membrana y de mantenerse en el interior de la célula para su detección.

Aparte de la determinación del tamaño telomérico y el método de senescencia asociada a la enzima  $\beta$ -gal (SA- $\beta$ Gal) actualmente se emplean otro tipo de marcadores clasificados en: elementos de las vías de transducción de señales que mantienen fenotipos senescentes, como las proteínas reguladoras de CDKIs: p16 o p21; marcadores de estrés genotóxico; secreción de citoquinas inflamatorias, entre otros (Campisi, 2005; Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007; Jayapalan y Sedivy, 2008), pero éstos no son tan específicos y requieren de otros ensayos que los soporten.

Campisi y d'Adda di Fagagna (2007) reportan que recientemente tres proteínas fueron escogidas a partir de análisis genético para la determinación efectiva de células senescentes: DEC1 (en inglés: Differentiated Embryo-Chondrocyte Expressed-1), p15 (una proteína CDKIs) y DCR2 (en inglés: Decoy death receptor-2).

En la tabla 3 se presenta un resumen comparativo de las principales técnicas que detectan senescencia celular *in vitro*.

Es de gran importancia que la metodología empleada para las diferentes mediciones sea lo más cuantitativa posible, pues así se observa-

**Tabla 3.** Resumen de las principales técnicas para la determinación de senescencia celular *in vitro*.

Metodología	Discrimina células quiescentes		Cualitativa	Cuantitativa
	Sí	No		
Pérdida de replicación del ADN		X	X	
Tamaño promedio telomérico por: análisis de TRF	X		X	
Tamaño promedio telomérico por: Q-FISH	X		X	
Tamaño promedio telomérico por: Flow-FISH	X			X
SA-β-Gal	X			X
Microarreglos/RT-PCR/Western blot	X		X	

rán en el cultivo los niveles que poseen células en apoptosis y senescencia celular, y a partir de ahí, tomar decisiones sobre su utilización y de los mecanismos empleados para su obtención.

En general, la literatura recomienda utilizar multiensayos tanto para la cuantificación de células apoptóticas como para las senescentes en cultivo, con el fin de garantizar una determinación más eficiente de estos fenómenos, pues se ha observado que una única medición carece de suficiencia y sensibilidad.

### Conclusiones y perspectivas

La determinación de los niveles de apoptosis y senescencia celular en un cultivo de células animales y humanas es de gran importancia para evaluar y monitorear el cultivo, ya que son parámetros biológicos apropiados para este fin. Emplear técnicas cada vez más adecuadas para esta determinación es una necesidad clara, donde se espera obtener resultados de una manera rápida, eficiente, cuantitativa, objetiva y a bajos costos. Se perfila aplicar multiensayos simultáneos con ayuda de técnicas de citometría de flujo para estos dos fenómenos, aportando herramientas directas en la valoración y certificación de los procedimientos de obtención y

mantenimiento de un cultivo de células en especial cuando tiene por objeto una aplicación en el área de biotecnología de la salud.

### Agradecimientos

Al profesor Carlos Clavijo Biol., M. Sc., Ph. D. Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, por su valiosa contribución a la realización de este artículo.

A las profesoras Carmen Alicia Cardozo de Martínez OD., M. Sc., y Afife Mrad de Osorio QF, directoras del Laboratorio de Biomiméticos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), y a todo su equipo de trabajo, por todo el apoyo brindado durante la realización de este artículo.

### Referencias bibliográficas

- Arur, S., Uche, U., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A., Molher, W. y Han, D. 2003. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Developmental Cell* 4: 587-598.
- Bandyopadhyay, D., Gatzka, C., Donehower, L. y Medrano, E. 2005. Analysis of Cellular Senescence in Culture In Vivo: The Senescence-Associated β-Galactosidase Assay. En Wiley, J. & Sons (eds.). *Current Protocols*



- in Cell Biology. USA: Wiley InterScience. 18.9.1-18.9.9.
- Baskić, D., Popović, S., Ristić, P., Arsenijević, N. 2006. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biology International* 30: 924-932.
- Bortner, C., Oldenburg, N., Cidlowski, J. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5: 21-26.
- Bratton, D., Fadok, V., Richter, D., Kailey, J., Guthrie, L., Henson, P. 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272: 26159-26165.
- Campisi, J. 2003. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Experimental Gerontology* 38: 5-11.
- . 2005. Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell* 120: 513-522.
- and d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Molecular Cell Biology* 8: 729-740.
- Chinnaiyan, A. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1: 5-15.
- Cohen, G. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1): 1-16.
- Cristofalo, V. and Pignolo, R. 1996. Molecular markers of senescence in fibroblast-like cultures. *Experimental Gerontology* 31: 111-123.
- Dasso, M. 2004. Cellular Aging and Death. En Wiley, J. & Sons (eds.). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.0.1-18.0.2.
- Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. y Campisi, J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35 (4): 495-516.
- Freshney, I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. USA: Editorial John Wiley & Sons, Inc.
- Funayama, R., Saito, M., Tanobe, H. and Ishikawa, F. 2006. Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *The Journal of Cell Biology* 175 (6): 869-880.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P., Didelot, C., Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13: 1423-1433.
- Gasser, J-P., Hehl, M., Millward, T. 2009. A homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay for phosphatidylserine exposure on apoptotic cells. *Analytical Biochemistry* 384: 49-55.
- Gong, H., Zhang, B., Little, G., Kovar, J., Chen, H., Xie, W., Schutz-Geschwender, A. y Olive, D. 2009.  $\beta$ -Galactosidase activity assay using far-red-shifted fluorescent substrate DDAOG. *Analytical Biochemistry* 386: 59-64.
- Hampel, B., Wagner, M., Teis, D., Zwerschke, W., Huber, L., Jansen-Dürr, P. 2005. Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell* 4: 325-330.
- Harford, J. 2003. Cell Culture. En: Wiley, J. & Sons (eds.). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 1.0.1-1.0.2.
- Hayflick, L. y Moorhead, P. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25: 585-621.
- Herbert, B., Shay, J. and Wright, W. 2003. Analysis of Telomeres and Telomerase. En: Wiley, J. & Sons (eds.). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.6.1-18.6.20.
- Hill, M., Adrain, C., Duriez, P., Creagh, E., Martin, S. 2003. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23: 2134-2145.
- Horvitz, R. H. 1999. Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Research* 59: 1701s-1706s.
- Hu, S., Snipas, S., Vincenz, C., Salvesen, G., Dixit, V. 1998. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273: 29648-29653.
- Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yépez, S. y Livingston, E. 2007. Screening and Detection of Apoptosis. *Journal of Surgical Research* 139: 143-156.

- INVITROGEN™. 2009. Assay for Apoptosis. En: *INVITROGEN™ Molecular Probes: The Handbook*. USA. Disponible en URL: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>
- Jeyapalan, J. y Sedivy, J. 2008. Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 129: 467-474.
- Kerr, J., Wyllie, A., Currie, A. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.
- Kurz, D., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J. 2000. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science* 113: 3613-3622.
- Mastrangelo, A. and Betenbaugh, M. 1995. Implications and applications of apoptosis in cell culture. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 198-202.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B., Madesh, M. and Pacher, P. 2007. Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols* 2 (9): 2295-2301.
- Müllauer, L., Gruber, P., Sebinger, D., Buch, J., Wohlfart, S., Chott, A. 2001. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutation Research* 488: 211-231.
- Petersen, T. and Niklason, L. 2007. Cellular lifespan and regenerative medicine. *Biomaterials* 28: 3751-3756.
- Phelan, M. 1998. Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 1.1.1-1.1.10.
- Pozarowski, P., Grabarek, J. and Darzynkiewicz, Z. 2003. *Flow Cytometry of Apoptosis*. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.8.1-18.8.33.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande, W., Van Gurp, M., Van Loo, G., Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23: 2861-2874.
- Schmid, I. y Jamieson, B. 2004. *Assessment of Telomere Length, Phenotype, and DNA Content*. Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cytometry*. USA: Wiley InterScience. 7.26.1-7.26.13.
- Sitte, N., Saretzki, G. and Von Zglinicki, T. 1998. Accelerated Telomere Shortening in Fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radical Biology & Medicine* 24 (6): 885-893.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184: 39-51.
- Vicencio, J., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo A., Tasdemir, E., Morselli, E., Younes, A., Maiuri, M., Lavandro, S., Kroemer, G. 2008. Senescence, Apoptosis or Autophagy? *Gerontology* 54: 92-99.
- Yang, N-Ch. y Hua, M-L. 2004. A fluorimetric method using fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside for quantifying the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity in human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Analytical Biochemistry* 325: 337-343.
- Zhivotovsky, B. y Orrenius, S. 2001. *Current Concepts in Cell Death*. En: Wiley, J. & Sons (eds). *Current Protocols in Cell Biology*. USA: Wiley InterScience. 18.1.1-18.1.18.