

Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones

Ernesto Alfaro Moreno,* Claudia García Cuéllar,* Alfonso Dueñas González*,**

RESUMEN

Durante el proceso del desarrollo embrionario de un organismo o durante los procesos encaminados a mantener la homeostasis de éste, es necesario eliminar células no deseadas. Este proceso se denomina muerte celular programada o apoptosis. La apoptosis es un proceso en el que aparecen múltiples eventos en diferentes momentos. Esto puede ser activado por diferentes estímulos, tales como el daño al DNA, citocinas, pérdida de la matriz extracelular, etc. La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia en el área del cáncer, ya que puede ser útil para conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad, efectividad de tratamientos, etc. Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, la aparición de los eventos relacionados y su detección van a depender de múltiples factores. Dentro de los procesos comúnmente utilizados para detectar apoptosis está la detección de degradación de DNA, cambios en la simetría de la membrana celular y activación de proteínas específicas.

El propósito de este artículo es describir las principales técnicas utilizadas para la detección de apoptosis, así como sus limitaciones. Los criterios descritos en el presente trabajo pretenden ayudar a elegir el método más conveniente para determinar la apoptosis.

Palabras clave: Apoptosis, métodos.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la necrosis y la apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios. Por otra parte, la muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo re-

ABSTRACT

Some cells have to be eliminated in an organism to keep the homeostasis, tissue remodelling or embryonic development. This process is known as programmed cell death or apoptosis. Apoptosis is a dynamic process in which a cascade of events appear at different times. Apoptosis can be induced by various stimuli, such as DNA damage, cytokines, loss of extracellular matrix, etc. Apoptosis detection has become very important in cancer, since it is helpful to understand carcinogenesis, mechanisms of chemotherapy drugs, evaluation of treatment response, etc. Importantly, apoptosis detection depends on the moment the cells or tissues are studied. The most common events used to detect apoptosis include the identification of DNA degradation by gel electrophoresis, changes on the cytoplasmic membrane and activation of specific proteins.

The aim of this article is to describe the main techniques used for detection of apoptosis, and their limitations. The criteria described in this paper pretend to help to choose the most convenient method for apoptosis detection.

Key words: Apoptosis, techniques.

quiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y la célula muere en beneficio del organismo. En este caso, la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso.¹ Esto no se observa *in vivo* ya que las células apoptóticas son eliminadas por fagocitosis antes de perder la integridad de la membrana.² Debido a que la apoptosis requiere de la activación de genes para que se lleve a cabo este tipo de muerte celular, también ha recibido el nombre de muerte celular programada.³

La apoptosis fue descrita por primera vez durante los años 70 y se basó en las características morfológicas que presentan las células tales como la organización de la membrana citoplasmática y condensación de la cromatina, entre otras. Es durante los años 80

* Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.

** Departamento de Genética y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Cuadro 1. Número de publicaciones relacionadas con la apoptosis, según el Medline hasta enero del 2000.

Década	# publicaciones
1970s	34
1980s	220
1990s	29,188

que se describe la participación de la apoptosis en procesos patológicos y fisiológicos. Durante los años 90 se vuelve uno de los principales tópicos de estudio dentro de la biología (*Cuadro I*).

En la actualidad se ha demostrado que las alteraciones en la apoptosis son un mecanismo fundamental para el desarrollo del cáncer, participando desde las etapas iniciales de la carcinogénesis –transición de lesiones preneoplásicas a invasoras–, en el fenómeno metastásico y por supuesto, en la respuesta a los tratamientos antineoplásicos, llámese radioterapia o quimioterapia.

El papel de la apoptosis en las etapas iniciales de la carcinogénesis no está perfectamente claro. En algunas lesiones preinvasoras como las hiperplasias atípicas y carcinoma *in situ* de la glándula mamaria, lesiones premalignas de estómago y cavidad oral⁴⁻⁶ se ha observado un incremento de la apoptosis lo cual parece contradecir el pensamiento simplista de que la transición a una lesión invasora necesariamente debe acompañarse de menor apoptosis. Se conoce que el fenómeno de transformación o malignización es un proceso ineficiente en el sentido de que para que ocurra se necesita alteraciones en genes que al mismo tiempo que aumenten la proliferación inhiban la apoptosis, de otra manera, como se ha observado experimentalmente, el solo aumento de la proliferación puede acompañarse de mayor apoptosis.⁷ El incremento de apoptosis en las lesiones preinvasoras por lo tanto, puede interpretarse como un mecanismo de defensa del organismo para eliminar las células con daño genético de un grado menor al requerido para tornarse malignas. Otra explicación sería que el grado de apoptosis de las lesiones preneoplásicas fuera específica de tejido. Por ejemplo, en lesiones premalignas de colon⁸ se observa mayor expresión del gen antiapoptótico bcl-2 y menos apoptosis. Esta variabilidad en la detección de apoptosis indica que nuestro conocimiento del papel de la apoptosis en la carcinogénesis es aún incompleto, y que en parte, la variabilidad puede ser debida a las técnicas utilizadas para su detección en los diferentes estudios.

El papel de la apoptosis en el fenómeno metastásico parece ser un poco más evidente. Como se mencio-

nó previamente, la pérdida del contacto con la matriz extracelular y la deprivación de factores de crecimiento son dos estímulos apoptóticos potentes. Estos estímulos protegen al organismo del crecimiento celular más allá de los límites impuestos. Actualmente se conoce que si bien el encontrar células malignas circulantes es un fenómeno muy común, no todas estas células tienen la capacidad de establecerse y crecer en otros órganos o tejidos distantes.⁹ Para lograrlo necesitan adquirir alteraciones genéticas adicionales que supriman la apoptosis. Esto está demostrado en varios sistemas en donde la transfección de genes antiapoptóticos como bcl-2¹⁰ o disminución de la expresión de genes preapoptóticos como bak,¹¹ permiten a las células malignas poder sobrevivir en suspensión y adquirir la capacidad de formar metástasis.

Tradicionalmente se había considerado que la quimioterapia citotóxica y la radioterapia actuaban por producir daño al DNA con la subsecuente falla mitótica y muerte celular. Sin embargo, ahora se sabe que las drogas citotóxicas y la radiación utilizan los mecanismos endógenos de apoptosis para inducir su efecto antitumoral.¹² De hecho, la mayoría de los experimentos realizados para identificar los eventos bioquímicos implicados en la apoptosis se han hecho utilizando drogas quimioterápicas. Las evidencias sugieren que en las etapas más tempranas del cáncer, a pesar de que ya existen alteraciones en la apoptosis, las células son más sensibles a los estímulos apoptóticos que en las lesiones más avanzadas.¹³ Esto correlaciona con lo observado en la clínica en cuanto a que los pacientes con menor carga tumoral muestran mejor respuesta a la quimio o radioterapia.

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, se presentarán diferentes características dependiendo del momento en el que se encuentre la célula. Esto permite disponer de diferentes “marcadores” de la apoptosis. Cabe considerar que no todos los marcadores están presentes en todas las células, ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso. Por esto es importante considerar algunos aspectos de la apoptosis que ocurren tanto *in vivo*, como *in vitro*, tales como el momento en el que aparece un evento determinado, la duración de los procesos relacionados, así como el proceso de eliminación de la célula apoptótica por fagocitosis. Otro factor importante es que a pesar de que se induzca apoptosis en células que se encuentran en la misma fase del ciclo celular, el proceso de muerte no es sincrónico, por lo que la búsqueda de un marcador tanto *in vivo* como *in vitro* es representativo de un momento específico.

Una de las características que tiene la muerte por apoptosis en un organismo, es que las células son fagocitadas para evitar la presencia de necrosis secundaria,² por lo que muchas veces se vuelve difícil detectar su presencia de apoptosis *in vivo*, a menos que se busquen eventos que ocurren al inicio del proceso de muerte celular, los cuales podrían ser considerados como marcadores tempranos.

MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Debido a que la definición de apoptosis fue creada con base en parámetros morfológicos consideramos que es el primer parámetro a ser revisado.

1) Cambios morfológicos presentes en la muerte celular por apoptosis.

Una de las primeras manifestaciones morfológicas de la presencia de muerte celular por apoptosis es la pérdida de la unión celular, así como cambios en la presencia de estructuras especializadas, como lo son las microvellosidades. Al mismo tiempo se observan cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la aparición de condensación de la cromatina. Conforme el proceso avanza se puede observar la aparición de fragmentación nuclear. También se presentan cambios en el retículo endoplásmico, en donde se observan fusiones con la membrana citoplasmática.³

Para determinar estos cambios en la célula apoptótica se pueden utilizar tanto la microscopia de luz (campo claro, fluorescencia), como la microscopia electrónica. Por medio de la microscopia de luz se pueden apreciar cambios en la organización celular, tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos, que son fragmentos celulares que se desprenden durante el proceso de muerte. Para apreciar alteraciones celulares como cambios en microvellosidades, así como alteraciones mitocondriales o del retículo endoplásmico es necesario recurrir a la microscopia electrónica.

Se debe de tener cuidado con la búsqueda de los cambios morfológicos, ya que *in vivo* muchas veces no es posible detectar algunas de estas alteraciones, ya que las células son eliminadas por fagocitosis, por lo que no siempre va a ser posible detectarlas.

2) Detección de degradación del DNA.

Uno de los procesos que se asocian generalmente con la apoptosis es la degradación de DNA de forma específica entre nucleosomas. Es sabido que durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la síntesis de endonucleasas que cortan el DNA a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas los cuales se sabe que contienen alrededor de 200 pares de bases. Al realizar un corrimiento electroforético de extractos de DNA de células apoptóticas es posible observar la aparición de un patrón característico de DNA en escalera, mejor conocido como ladder de DNA, el cual contiene fragmentos discretos, múltiplos del tamaño de un nucleosoma que recuerdan la imagen de los peldaños de una escalera.¹

Existen diversos métodos para detectar la degradación del DNA asociada a la apoptosis. El método más comúnmente utilizado es la extracción de DNA con fenol/cloroformo y su precipitación con etanol.¹⁴ Este método presenta el inconveniente de que los fragmentos pequeños pueden perderse durante las extracciones, por esto se han desarrollado métodos en los que se eliminan los pasos de extracción y en los que lisados celulares son digeridos con RNAsas y proteinasa K para después realizar el corrimiento electroforético.¹⁵ Este método se realiza en mucho menor tiempo, y elimina el problema de las extracciones orgánicas. Otro método propuesto para no perder los fragmentos pequeños, e incluso enriquecer su contenido es el descrito por Daniel y colaboradores,¹⁶ en el que utilizan acarreadores minerales a los que se adsorben los fragmentos de DNA. Estos acarreadores permiten separar el DNA de la muestra y posteriormente se recupera al DNA del acarreador en volúmenes pequeños, por lo que las concentraciones de DNA obtenidas son adecuadas para realizar análisis electroforéticos.

Durante algún tiempo se consideró la aparición de esta degradación de DNA como el marcador principal de la apoptosis, pero con el tiempo se ha demostrado que no todas las células que mueren por apoptosis van a presentar este tipo de degradación del DNA. Hoy en día se sigue utilizando este tipo de análisis para determinar la apoptosis, aunque algunas consideraciones deben ser tomadas en cuenta para su análisis:

- a) La aparición del patrón en escalera de DNA es un proceso tardío por lo que no siempre se puede detectar *in vivo*.

- b) Algunas estirpes celulares no presentan este tipo de degradación de DNA y en particular es difícil de encontrar en células epiteliales y murinas.
- c) Debido a que se trabaja con extractos de DNA es posible perder los fragmentos pequeños, por lo que hay que extremar precauciones en el manejo de las muestras.

Otro método que se ha utilizado para medir la degradación internucleosomal es la detección de las proteínas presentes en los nucleosomas (histonas), en placas de 96 pozos mediante un anticuerpo acoplado con un enzima que genera una reacción colorida, conocido como ensayo de ELISA.¹⁷ Desafortunadamente en este método se cuantifica la presencia de nucleosomas en el sobrenadante de cultivos celulares, por lo que puede existir la incertidumbre del origen de dichos nucleosomas, ya que una célula necrótica también puede liberar DNA y nucleosomas al medio al presentarse la lisis celular.

Por otra parte, el proceso de degradación de DNA no necesariamente va a presentar el patrón de degradación a nivel internucleosomal, pero es posible detectar degradaciones más tempranas por medio del método de electroforesis de pulso-campo. Por medio de este método es posible detectar fragmentos grandes de DNA que pueden llegar hasta 10 megapares de bases.¹⁸ Se sabe que la fragmentación de DNA en la apoptosis a nivel internucleosomal, va precedida por la aparición de fragmentos grandes de DNA que pueden ir de los 50 a los 300 kilopares de bases, por lo que el método de electroforesis de pulso-campo permite determinar la presencia de esta fragmentación.¹⁹

- 3) Detección de degradación de DNA en células individuales por medio de marcaje del DNA.

Debido a que la degradación del DNA es una de las características más importantes de la apoptosis, se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula, en busca de esta degradación. Uno de los métodos más utilizados es el de marcaje de DNA de hebra sencilla por medio de una transferasa terminal²⁰ que adiciona nucleótidos marcados al DNA en extremos 3' libres. Dichos nucleótidos pueden estar marcados con fluorescencia, o bien se pueden detectar por métodos de inmunohistoquímica. Este método se conoce como método de TUNEL (*transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) y se puede utilizar tanto para la detección por medio de citometría de flujo, como por microscopia. Esta técnica permite

determinar la presencia de fragmentación de DNA en células individuales, por lo que es posible conocer la proporción de células que están muriendo por apoptosis en un determinado momento. Por otra parte, durante la necrosis también se presenta degradación de DNA aunque ésta no presenta el patrón de degradación internucleosomal presente en la apoptosis, pero esto no es posible de distinguir por este método,²¹ por lo que se sugiere que se complemente con otra técnica, como puede ser la evaluación morfológica.

Otra técnica ampliamente utilizada es la determinación del ciclo celular por citometría de flujo. Este ensayo se basa en la detección del contenido de DNA en la célula. Al haber degradación del DNA se van a encontrar células que presentan un menor contenido de DNA, lo cual aparece en el histograma de la citometría por abajo de la región en la que se encuentran las células antes de la replicación del DNA (G0-G1), por lo que podrían estar en apoptosis.²²

Otro método que ha sido desarrollado para la detección individual de células apoptóticas es el de la detección de cadenas sencillas de DNA por métodos de inmunohistoquímica, el cual parece tener una sensibilidad similar al ensayo de TUNEL.²³

- 4) Detección de la activación de caspasas.

La determinación de la activación de las moléculas que disparan el proceso de apoptosis ha adquirido gran importancia en la detección de apoptosis. Tal es el caso de las caspasas, que son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células.²⁴ La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis.²⁵ Este tipo de marcadores es de gran importancia, ya que la detección de apoptosis *in vivo* por métodos que detectan la degradación de DNA, no siempre es exitosa, ya que estas células pueden ser removidas antes de que dicha degradación se presente. La determinación de la activación de la caspasa-3 presenta la gran ventaja de que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de apoptosis, por lo que no existe la incertidumbre presente en otros marcadores en los que su presencia o ausencia no son determinantes en el proceso de muerte celular programada.

Cuadro 2. Métodos para la detección de apoptosis.

Método	Detección	Nivel	Momento
Morfología celular (1)	Cambios en la morfología celular	Célula individual	Temprano y tardío.
Electroforesis de DNA (2)	Degradación internucleosomal	Población celular	Tardío
Electroforesis de DNA de pulso-campo (2)	Fragmentos de 50 y/o 300 Kpb	Población celular	Temprano
ELISA para nucleosomas (3)	Degradación internucleosomas	Población celular	Tardío
TUNEL (1 y 4)	Marcaje terminal de DNA	Célula individual	Temprano y tardío
Detección de ploidía (4)	Contenido celular de DNA	Célula individual	Tardío
Detección de DNA de cadena sencilla (4)	Detección de degradación de DNA	Célula individual	Temprano y tardío
Detección de la exposición de fosfatidil serina (1 y 4)	Cambios en la simetría de la membrana	Célula individual	Temprano

1) Microscopia óptica o electrónica

2) Electroforesis

3) Ensayo inmunoenzimático o ELISA

4) Citometría de flujo

5) Evaluación de la simetría de la membrana celular.

Otro evento temprano presente en la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática. Es bien sabido que la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene, lo cual significa que la característica de ser semipermeable está presente, sin embargo se presentan cambios en su simetría. Tal es el caso de la distribución de la fosfatidil serina, la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula,²⁶ y cuando una célula entra en el proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición de fosfatidil serina hacia el exterior de la membrana celular. Debido a este cambio en la simetría se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de fosfatidil serina en el exterior de la membrana celular, al agregar anexina V la cual es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana, y que tiene una alta afinidad por la fosfatidil serina, por lo que aquellas células que se encuentran marcadas con anexina V, serán aquellas que se encuentran en apoptosis. La detección de anexina V se puede acompañar de una tinción con yoduro de propidio, lo cual nos permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido. Esto permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular, o si se encuentra

en una etapa tardía en la cual ya se encuentra presente la necrosis secundaria. Esta técnica requiere de la utilización de células íntegras, por lo que su uso se recomienda para estudios *in vitro*, aunque también puede ser utilizada en análisis de apoptosis en muestras obtenidas para análisis citológicos, o bien para detectar apoptosis en sangre.²⁷

Como se puede ver, la determinación de apoptosis está relacionada con diversos parámetros, y es necesario considerar diferentes aspectos para elegir el método que se va a utilizar (*Cuadro II*). Por esto es recomendable que se analice la bibliografía relacionada, ya que se corre el riesgo de utilizar un marcador inadecuado para la población que se desea evaluar. Sin embargo, los métodos que resultan más confiables para la detección de apoptosis son la determinación de alteraciones morfológicas, el ensayo de TUNEL, así como la detección de cambios en la simetría de la membrana celular y la activación de las caspasas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-22.
2. Strange R, Feng L, Saurer S, Burkhardt A, Friis R. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992; 115: 49-58.
3. Schwartzman R, Cidlowski A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1993; 14: 133-51.
4. Mustonen M, Raunio H, Paakko P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in

- pre-malignant and malignant breast lesions. *Histopathology* 1997; 31: 347-50.
5. Birchall MA, Winterford CM, Allan DM, Harmon BV. Apoptosis in normal epithelium, pre-malignant lesions of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995; 31B: 380-3.
 6. Ishida M, Gomyio Y, Tatebe S, Ohfuji S, Ito H. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. *Virchows Arch* 1996; 428: 229-35.
 7. Manning FC, Patierno SR. Apoptosis: Inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer Invest* 1996; 14: 455-65.
 8. Fohil CC, Janssen PA, Bosman FT. Expression of bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon. *J Pathol* 1996; 178: 393-7.
 9. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labelled with ^{125}I -5-iodo-2' deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970; 46: 773-83.
 10. Takaoka A, Adachi M, Okuda H, Sato S, Yawat A, Hinode Y, Takayama S, Reed VC, Imai K. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene* 1997; 14: 2971-7.
 11. Rosen K, Rak J, Jin J, Kerbel RS, Newman MJ, Filmus J. Downregulation of the pro-apoptotic protein bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Curr Biol* 1998; 8: 1331-4.
 12. McDonnell TJ, Meyn RE, Robertson LE. Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 53-60.
 13. Martin DS, Schwartz GK. Chemotherapeutically induced DNA damage, ATP depletion, and the apoptotic biochemical cascade. *Oncol Res* 1997; 9: 1-5.
 14. Martin SL, Lennon SV, Bonham AM, Cotter TG. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukaemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol* 1990; 145: 1859-67.
 15. Park DJ, Patek PQ. Detergent and enzyme treatment of apoptotic cells for the observation of DNA fragmentation. *Biotechniques* 1998; 24: 558-60.
 16. Daniel PT, Sturm I, Ritschel S, Friederich K, Dorken B, Bendzko P, Hillebrand T. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Analytical Biochem* 1999; 266: 110-15.
 17. Holian A, Hamilton RF, Morandi MT, Brown SD, Li L. Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 127-32.
 18. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
 19. Allen PD, Newland AC. Electrophoretic DNA analysis for the detection of apoptosis. *Mol Biotechnology* 1998; 9: 247-51.
 20. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 490-501.
 21. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology* 1995; 21: 1465-8.
 22. Telford WG, King LE, Fraker PJ. Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif* 1991; 24: 447-59.
 23. Watamabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T et al. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different *in situ* methods: Antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labelling (TUNEL) methods. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 188-93.
 24. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
 25. Benjamin CW, Hiebsch RR, Jones DA. Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol Pharmacol* 1998; 53: 446-50.
 26. Van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996; 24: 131-39.
 27. Wals GM, Dewson G, Wardlaw AJ, Levi-Schaffer F, Moqbel R. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Methods* 1998; 217: 153-63.

Dirección para correspondencia:

Ernesto Alfaro Moreno

Suddirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología

Av. San Fernando 22, Tlalpan

14080, México, D.F.

Tel: 56280425

Fax: 56280432

Correo electrónico: ealfaro@mail.ssa.gob.mx

Fecha de recepción: 24/03/00.

Fecha de aceptación: 25/05/00.