

# Apoptosis: el fenómeno y su determinación

## Apoptosis: the phenomenon and its determination

Luvia Enid Sánchez-Torres<sup>a</sup>, Fernando Diosdado Vargas<sup>b</sup>

### RESUMEN

La apoptosis es una forma de muerte celular, caracterizada por cambios morfológicos y bioquímicos. En los organismos multicelulares, la homeostasis es mantenida a través de un balance entre la proliferación y la muerte celular; el fenómeno de apoptosis es el principal proceso que mantiene este balance. Alteraciones en la regulación de este tipo de muerte celular pueden contribuir a la patogénesis de ciertas enfermedades como cáncer, infecciones virales, enfermedades autoinmunes y desórdenes neurodegenerativos. Terapias específicas diseñadas para incrementar o disminuir la susceptibilidad de ciertos tipos celulares a morir por apoptosis puede ser la base para el tratamiento de estas enfermedades. Esta es una revisión del fenómeno apoptótico y de algunas técnicas que permiten evidenciarla y cuantificarla.

**PALABRAS CLAVE:** Apoptosis, Mecanismos.

### ABSTRACT

The phenomenon of apoptosis, and a number of techniques for its identification and quantification, are reviewed. Apoptosis is a form of cell death defined by morphological and biochemical characteristics. In multicellular organisms, homeostasis is maintained through a balance between cell proliferation and cell death. The phenomenon of apoptosis is the main process maintaining this balance. Alterations in the apoptosis regulation can contribute to the pathogenesis of a number of diseases including cancer, viral infections, autoimmune diseases and neurodegenerative disorders. Specific therapies designed to enhance or decrease the susceptibility of individual cell types to undergo apoptosis could form the basis for treatment of these diseases.

**KEY WORDS:** Apoptosis, Mechanisms.

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad se conocen de manera general dos formas de muerte celular: la necrosis y la apoptosis. La necrosis fue descrita en 1858 por Virchow, y puede ser definida como un fenómeno degenerativo producido por daño repentino y severo. Dentro de los factores desencadenantes pueden citarse la isquemia, la hipertemia o hipotermia severas, el trauma físico o químico, así como altas concentraciones de agentes tóxicos. Las células que mueren por necrosis presentan características morfológicas y bioquímicas distintivas: los cambios tempranos incluyen aumento del volumen celular, ruptura de la membrana

### INTRODUCTION

Currently, only two forms of cellular death are known: necrosis and apoptosis. Necrosis was described in 1858 by Virchow, and is defined as a degenerative phenomenon produced by sudden or severe damage. Factors that can trigger necrosis include ischemia, severe hyperthermia or hypothermia, physical or chemical trauma, and exposure to high concentration of toxic agents. Cells that die from necrosis exhibit distinctive morphological and biochemical characteristics. Early changes include an increase in cellular volume, rupture of the plasmatic membrane and release of cell content

---

Recibido el 28 de junio de 2002 y aceptado para su publicación el 5 de agosto de 2002.

a Departamento de Inmunología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

b Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (INIFAP-SAGARPA). Carretera México-Toluca km 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa 05110. México, D.F. Tel 52572235; diosdado@micro.inifap.conacyt.mx . Correspondencia y solicitud de separatas al segundo autor.

plasmática y liberación del contenido celular al microambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células en la vecindad. La liberación de hidrolasas ácidas de los lisosomas acelera la desintegración celular en la fase tardía de la necrosis. La cromatina se condensa de manera irregular en el núcleo y se degrada en sitios al azar<sup>(1)</sup>. La apoptosis en cambio, se define como una forma de deceso celular caracterizada por la ejecución de un programa de muerte que tienen todas las células, y que está codificado genéticamente. Las primeras descripciones sobre este fenómeno las realizó William Councilman en 1890, quien señala la presencia de cuerpos acidófilos vacuolados en hígado de pacientes con fiebre amarilla<sup>(2)</sup>. Más tarde, Robert Schröder en 1914 describe la presencia de partículas con cromatina picnótica en las glándulas endometriales dos o tres días antes del inicio de la menstruación<sup>(3)</sup>. Es hasta 1965 que se hace la descripción detallada de esta nueva forma de muerte celular y se sientan las bases para el estudio formal de este fenómeno<sup>(4)</sup>. En el trabajo original estos investigadores describen los cambios histológicos que presentan las células de hígado de roedores después de ligar la vena porta. El área cercana a este vaso mostró células necróticas, mientras que en la periferia las células presentaban otra morfología: las células estaban encogidas, la cromatina estaba fuertemente condensada y sus membranas y organelos permanecían intactos<sup>(5)</sup>. Son estos mismos investigadores los que en 1972 acuñan el término de *apoptosis* que sustituyó al de “necrosis por encogimiento”, hasta entonces utilizado. La palabra apoptosis deriva del griego *apo* que significa separación o derivación y *ptosis*, caída. Es un término que se utilizaba en la antigua Grecia para describir la caída de los pétalos de las flores y la caída otoñal de las hojas de los árboles<sup>(5)</sup>. Este término resalta el carácter fisiológico de la apoptosis, ya que implica que para que un organismo funcione adecuadamente, no sólo debe tener la capacidad de producir nuevas células, sino también la habilidad de eliminar las que ya no son capaces de cumplir con la función que tienen asignada.

## DESARROLLO

La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se

into the intercellular space, causing an inflammatory process that damages neighboring cells. The release of acid hydrolases from lysosomes accelerates cell disintegration in late phase necrosis. Chromatin also condenses irregularly in the cell nucleus and it is degraded randomly<sup>(1)</sup>.

Apoptosis is very distinctive and it is defined as the cell death caused by a genetically programmed death sequence contained in all cells. William Councilman first described this phenomenon in 1890 by observing the presence of vacuolated acidophilic bodies in the liver of yellow fever patients<sup>(2)</sup>. In 1914, Robert Schröder described the presence of particles with pycnotic chromatin in the endometrial glands two to three days after menstruation begins<sup>(3)</sup>. It was not until 1965, however, that Kerr made a detailed description of this form of cell death and laid the foundations for its formal study<sup>(4)</sup>. Kerr describes the histological changes that occurred in rodent liver cells after the portal vein was tied off. Necrotic cells were present in the area near this vessel, but the peripheral cells exhibited a different morphology. They were shrunken, the chromatin was strongly condensed and their membranes and organelles appeared intact<sup>(5)</sup>. Kerr, Wyllie and Currie created the term “apoptosis” for this phenomenon, which had been described until then as “shrinking necrosis”. “Apoptosis” is derived from the Greek roots *apo*, meaning separation or derivation, and *ptosis*, meaning fall, and was used in ancient Greece to describe the fall of flowers, and of tree leaves in Autumn<sup>(5)</sup>. The term emphasizes the physiological character of apoptosis since it implies that for an organism to function properly it not only needs the ability to produce new cells but also to eliminate those cells that no longer fulfill their functions.

## DEVELOPMENT

Apoptosis is an innate and evolutionarily conserved process in which cells deactivate, disassemble and degrade their own components and structure in a coordinated and characteristic way<sup>(6)</sup>. The apoptotic process is divided into three phases. The first is an initiation phase in which the cell receives the stimulus that begins the death sequence. The second

desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica<sup>(6)</sup>. El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución, se dan la mayor parte de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, en la tercera etapa o de eliminación, los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes<sup>(7)</sup>.

### *1.- Fase de iniciación*

La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas de las señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca)<sup>(7,8)</sup>. La naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones), pudiendo un mismo estímulo generar efectos diferentes y hasta opuestos en distintos tipos celulares, e incluso en células del mismo tipo pero que se encuentren en diferente etapa de desarrollo<sup>(9)</sup>.

### *2.- Fase de ejecución*

La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos citoplásmicos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno<sup>(10)</sup>. En etapas posteriores, la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta. Finalmente la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, que contiene parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos<sup>(11)</sup>.

is an execution phase during which most of the characteristic morphological and biochemical changes in apoptosis occur. During the third elimination stage, the cell remains are degraded by macrophages and neighboring cells<sup>(7)</sup>.

### *1.- Initiation phase*

Different intra- and intercellular signals can trigger apoptotic death. The former, known as the intrinsic pathway, often results from biological stress, which causes the release of mitochondrial cytochrome C. In the latter, known as the extrinsic pathway, some extracellular signals induce the apoptotic process by binding to a ligand on the target cell plasmatic membrane<sup>(7,8)</sup>. Apoptosis inducers can be physiological (e.g. hormones, cytokines), biological (e.g. bacteria, viruses, parasites), chemical (e.g. medications), or physical (e.g. radiation). In addition, one stimulus can generate different and even opposing effects in different cell types in or different development stages of the same cell type<sup>(9)</sup>.

### *2.- Execution phase*

Once the cell has received the signal to induce apoptosis it loses contact with neighboring cells and begins to decrease in size as its cytoplasm contracts. Though the cytoplasmic organelles remain intact, changes do occur in the mitochondria, such as reduction in transmembranal potential, uncoupling of the ATP synthesis electron transport chain, and an increase in the generation of oxygen reactive species<sup>(10)</sup>. The chromatin, which still surrounds the nuclear envelope, later contracts and fragments. Finally, the apoptotic cell generates a variable number of different-sized vesicles, known as apoptotic bodies, surrounded by intact plasmatic membrane, which contain a portion of the chromatin and the cellular organelles<sup>(11)</sup>.

When an apoptosis inductor arrives at a target cell it moves through it with the help of intermediaries that direct the signal towards the enzymatic machinery responsible for the changes the cell will experience during apoptosis. This basic machinery principally consists of caspases mainly <sup>(10,12,13,14)</sup>. Fourteen caspases are currently described in mammals, of which 12 have been described in humans<sup>(15)</sup>. These enzymes are activated in both

A nivel bioquímico, cuando un inductor de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los cambios que presenta la célula durante la apoptosis. Esta maquinaria básica la constituyen principalmente las caspasas<sup>(10,12,13,14)</sup>. Existen descritas 14 caspasas diferentes en mamíferos, de las cuales 12 se han descrito ya en humanos<sup>(15)</sup>. Tanto la apoptosis inducida por unión del receptor con su ligando (vía extrínseca), como la desencadenada por la liberación del citocromo C al citoplasma (vía intrínseca), provoca la activación de estas enzimas. La, o las caspasas que se activan durante la muerte apoptótica, dependen del estímulo, pudiendo converger en las caspasas que intervienen al final de la cascada de señalización<sup>(7)</sup>. Las caspasas constituyen una familia de proteasas de cisteína que muestran entre sí similitud en la secuencia de aminoácidos, en estructura y en especificidad; sus sustratos deben contener una molécula de ácido aspártico y requieren del reconocimiento de al menos otros cuatro aminoácidos en el sitio de ruptura. Además de específica, la ruptura es muy eficiente, lo cual concuerda con lo observado durante la apoptosis en el sentido de que no hay una digestión indiscriminada de proteínas, sino una ruptura coordinada y dirigida. De hecho algunas caspasas pueden ser sustratos de otras, así como de sí mismas vía auto procesamiento. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos, por lo que requieren de un procesamiento proteolítico para volverse activas<sup>(12,13)</sup>. Los precursores de las caspasas están constitutivamente expresadas en las células vivas y su actividad está regulada por una combinación de proteasas regulatorias, cofactores, umbrales y mecanismos de retroalimentación<sup>(13)</sup>.

En su forma nativa las caspasas constan de tres dominios: un prodominio N-terminal, un dominio que genera una subunidad grande (p20) y un dominio que da lugar a una subunidad enzimática pequeña (p10). La enzima madura es un heterodímero que contiene dos heterodímeros p20/p10, por lo que la forma activa cuenta con dos sitios activos independientes. Dentro de las funciones de las caspasas destacan la inactivación

extrínseca (i.e. inducida por la unión del receptor a su ligando) y intrínseca (desencadenada por la liberación del citocromo C al citoplasma) pathway apoptosis. The stimulus determines which caspase or caspases are activated during apoptotic death, and these can converge with the caspases involved in the final signal cascade<sup>(7)</sup>. Caspases are a family of cysteine proteases, and have similar amino acid sequences, structure and specificity. Their substrates must contain one aspartic acid residue and they require recognition of at least four other amino acids in the breaking site. Breaking is both specific and efficient, which is in keeping with observations of apoptosis showing that proteins are not indiscriminately digested. Some caspases can serve as substrates for others or for themselves via autoprocessing. They are synthesized as zymogens and thus require proteolytic processing to become active<sup>(12,13)</sup>. Caspase precursors are expressed in live cells and their activity is regulated by a combination of regulatory proteases, cofactors, thresholds and feedback mechanisms<sup>(13)</sup>.

Caspases in their native form consist of three domains, an N-terminal domain, a domain that generates a large subunit (p20) and a C-terminal domain that generates a small enzymatic subunit (p10). The mature enzyme is a heterodimer containing two p20/p10 heterodimers. In consequence, the active form of caspases has two independent active sites. Caspases have a number of functions; they inhibit the proteins that normally protect the cell from apoptotic death, those involved in DNA repair, and those involved in cytoskeleton organization<sup>(16)</sup>. They also participate in the destruction of the nuclear lamina<sup>(17,18)</sup>, in CAD (caspase activated Dnase)<sup>(19)</sup> activation, and induce the cell to express signals that mark it to become a phagocyte<sup>(20)</sup>. A characteristic molecular event in apoptosis is DNA fragmentation by a 40 kilodalton (kDa) nuclease, known as CAD. In this fragmentation the genetic material is initially broken into sections of 50 to 300 kilobases (Kb), and then into small fragments of 180 to 200 base pairs (bp) and their multiples. These generate what is known as the "Ladder pattern" in electrophoresis<sup>(19,21,22,23)</sup>.

As mentioned above, caspases participate in apoptotic death and their activation sequence depends on the inductor. Two general apoptosis

de proteínas que normalmente protegen a la célula de la muerte apoptótica, de aquéllas involucradas en la reparación de DNA y de las encargadas de la organización del citoesqueleto<sup>(16)</sup>; participan en la destrucción de la lámina nuclear<sup>(17,18)</sup>, en la activación de CAD (caspase activated Dnase)<sup>(19)</sup> e inducen a la célula a expresar señales que las marcan para ser fagocitadas<sup>(20)</sup>. Uno de los eventos moleculares que ha sido tomado como sello característico del fenómeno apoptótico es la fragmentación del DNA por una nucleasa de 40 kilodaltones (kDa) conocida como CAD. El material genético es roto inicialmente en pedazos de 50 a 300 Kilobases (Kb) y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb) y múltiplos de ellos, que son los que por corrimiento electroforético generan lo que se conoce como "Patrón en escalera"<sup>(19,21,22,23)</sup>.

Como se mencionó, las caspasas que participan durante la muerte apoptótica y su secuencia de activación dependen del inductor. Se han descrito de manera general dos cascadas o vías de inducción de apoptosis, las cuales pueden unirse en un componente común, la caspasa 3<sup>(7)</sup>.

La vía extrínseca puede ejemplificarse con la señal pro-apoptótica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando. FasL (CD95L) es un trímero que al unirse con Fas (CD95 o APO-1) induce la trimerización de éste. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC (death inducing signaling complex) al dominio citoplásmico de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la pro-caspasa 8 favoreciendo su autoactivación; la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7<sup>(7,8)</sup>. Además de lo antes citado, la caspasa 8 puede activar a Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) y ésta inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca<sup>(8,24)</sup>.

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés, y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax. Lo anterior provoca la liberación del citocromo C al citosol, lo cual se

inducción cascadas, or pathways, have been described, and these can converge in a common component, caspase 3<sup>(7)</sup>.

The extrinsic pathway is exemplified by a proapoptotic signal triggered by the binding of Fas to its ligand. FasL (CD95L) is a trimer that binds Fas (CD95 or APO-1), inducing it to trimerize. This interaction causes the recruitment of DISC (death-inducing signaling complex) into the Fas cytoplasmic domain. DISC contains adaptor proteins that allow the binding of procaspase 8, thus favoring its self-activation. Caspase 8 can then activate effector caspases 3, 6 and 7<sup>(7,8)</sup>. It can also activate Bid (pro-apoptotic member of the Bcl-2 family) and thus induce the release of cytochrome C and Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) from the mitochondria to form the apoptosome and then activate the intrinsic pathway<sup>(8,24)</sup>.

The intrinsic, or mitochondrial pathway is activated by stress and other signals that cause translocation of proapoptotic members of the Bcl-2 family into mitochondria, such as Bax. This causes the release of cytochrome C into the cytosol, which is accompanied by a drop in mitochondrial membrane potential and destabilization of the external mitochondrial membrane. The cytochrome C in the cytosol binds Apaf-1, and, once in the presence of dATP or ATP, forms the apoptosome complex. This in turn recruits and activates procaspase 9, which can activate caspases 3, 6 and 7<sup>(25)</sup>. These three caspases are responsible for the morphological and biochemical changes that occur in apoptotic cells. This is because their substrates contain cytoskeletal proteins, nuclear membrane proteins and DNA repair proteins, among others<sup>(16,17,18,19)</sup>.

### 3.-Elimination phase

Though cellular death is constantly taken place in an organism, cells dieing via apoptosis are rarely seen *in situ* because they are quickly and efficiently removed by phagocytic cells<sup>(1,11,20,26,27)</sup>. This differentiates apoptosis from necrosis because the latter involves the release of cytoplasmic content, which leads to an inflammatory process<sup>(5)</sup>. Professional phagocytes are responsible for removing most apoptotic cells, though there is evidence that non-

acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 y una vez unido y en presencia de dATP o ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa a la pro-caspasa 9, la cual puede a su vez activar a las caspasas 3, 6 y 7<sup>(25)</sup>.

Las caspasas 3, 6 y 7 son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del DNA entre otras<sup>(16,17,18,19)</sup>.

### 3.- Fase de eliminación

Aunque la muerte celular ocurre de manera constante en un organismo, las células que están muriendo por apoptosis son rara vez vistas *in situ* debido a que son rápida y eficientemente removidas por células fagocíticas<sup>(1,11,20,26,27)</sup>. Este hecho diferencia a la apoptosis de la necrosis, ya que en esta última, hay liberación de contenido citoplásmico, lo que desencadena un proceso inflamatorio<sup>(5)</sup>.

Los responsables de retirar la mayoría de las células apoptóticas son los fagocitos profesionales, pero existen evidencias de que fagocitos no profesionales, como las células dendríticas, epiteliales y fibroblastos también participan en la remoción de células apoptóticas<sup>(28)</sup>.

Son varios los mecanismos de reconocimiento de las células apoptóticas, lo cual parece ser un evento conjunto que involucra varios receptores, que pueden funcionar aislada, simultánea o secuencialmente. La existencia de más de un mecanismo de reconocimiento asegura la remoción eficiente de células apoptóticas, disminuyendo la posibilidad de que estas células liberen su contenido citoplásmico y causen daño. Es posible que sea el estímulo que provocó la muerte de la célula, el linaje de la célula apoptótica y la naturaleza del fagocito involucrado, lo que pueda regular el o los mecanismos utilizados para remover a las células apoptóticas<sup>(28,29)</sup>. Un requerimiento esencial para que las células apoptóticas sean reconocidas y

professional phagocytes such as dendritic cells, epithelial cells and fibroblasts also participate in this process<sup>(28)</sup>.

Apoptotic cell recognition is an event involving a number of receptors acting either in isolation, simultaneously or sequentially. There are various apoptotic cell recognition mechanisms, which ensure efficient removal of apoptotic cells, lowering the possibility of damage from the release of cytoplasmic content. Regulation of the mechanisms of apoptotic cell removal may occur via the stimulus that causes cell death, the lineage of the apoptotic cell and the nature of the phagocyte<sup>(28,29)</sup>. An essential requirement for recognition and phagocyte removal of an apoptotic cell is the expression of a proper ligand on the cell surface and its counterpart in the phagocyte. Molecules on the surface of phagocyte cells that mediate the recognition and internalization of apoptotic cells include lectins, integrins, scavenger receptors, ABC transporters, CD14 and complement receptors. In some cases, the presence or absence of these molecules depends on the origin of the phagocyte, its anatomical distribution and activation state<sup>(27,28)</sup>. One of the most widely studied recognition mechanisms is the loss of asymmetry in the cell membrane, which appears to always be present in apoptotic lymphocytes. Loss of asymmetry leads to exposure of phosphatidyl serine (PS) molecules, which are normally restricted to the cell interior, in the external membrane. The exposure of PS has been proposed to be a strong enough signal so as to induce phagocytosis<sup>(30,31)</sup>.

As mentioned, one of the characteristics that differentiates apoptosis from necrosis is that it does not induce an inflammatory response. The absence of inflammation appears to originate not just in the rapid removal of the cell without the release of cytoplasmic content, but also because the apoptotic cell induces the synthesis and secretion of anti-inflammatory molecules in the phagocyte. This has lead to the idea that phagocytosis of apoptotic cells acts as an immunoregulatory mechanism<sup>(32)</sup>.

## REGULATION OF APOPTOSIS

Cells constantly receive life and death signals, and their response depends on cell context. The

fagocitadas es la expresión de un ligando adecuado en su superficie celular y de su contraparte en el fagocito. Se ha observado que varias moléculas de superficie en las células fagocíticas median el reconocimiento y la internalización de las células apoptóticas. Entre ellas se pueden citar algunas lectinas, integrinas, receptores “scavenger”, ABC transportadores, CD14 y receptores del complemento. En algunos casos la presencia o ausencia de estas moléculas depende del origen del fagocito, de su distribución anatómica y de su estado de activación<sup>(27,28)</sup>. Uno de los mecanismos de reconocimiento más ampliamente estudiado y que al parecer es una señal que siempre está presente en los linfocitos apoptóticos, es la pérdida de la asimetría de la membrana celular, la cual tiene como consecuencia la exposición en la membrana externa de moléculas de fosfatidilserina (FS), que de manera normal están restringidas a la parte interna. Se ha propuesto que la exposición de la FS es una señal suficiente para inducir la fagocitosis de las células que la expresan<sup>(30,31)</sup>.

Como se mencionó, una de las características de la apoptosis que la diferencian de la necrosis, es que la primera no induce una respuesta inflamatoria, lo cual al parecer no es sólo como consecuencia de que la célula sea removida rápidamente sin liberar su contenido citoplásmico, sino que también es debido a que la misma célula apoptótica induce en el fagocito la síntesis y secreción de moléculas antiinflamatorias. Lo anterior es de gran importancia ya que se ha visto que la fagocitosis de células apoptóticas puede actuar como un inmunomodulador<sup>(32)</sup>.

## REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

Las células reciben constantemente señales de vida y de muerte y es el contexto celular el que determina el resultado final. De manera normal, las células tienen en su interior la maquinaria enzimática necesaria para ejecutar el programa apoptótico. Se ha considerado la posibilidad de que la señal apoptótica induce la muerte celular a través de la degradación de proteínas anti-apoptóticas que están regulando la vida de las células. Se han descrito varias moléculas que participan en esta regulación,

enzymatic machinery needed to execute the apoptosis program is normally contained within the cell. It is possible that the apoptotic signal induces cell death through degradation of the anti-apoptotic proteins that regulate cell life. A number of molecules participate in this regulation, and are grouped in families according to their structure. The most important include inhibitors of apoptosis proteins (IAP), proteins of the Bcl-2 family, and the FLICE (caspase 8)-inhibitory proteins (FLIP).

a) IAP Family. The first level of caspase regulation consists of pro-caspase activation control, while the second level involves the direct inhibition of active caspases. Proteins of this family, including XIAP, c-IAP and c-IAP2, carry out the latter. Their function is to inhibit caspases 3, 7 and 9 by directly linking to them and blocking their activity. The IAP's are also regulated. The second mitochondrial activator of caspases (Smac) protein in humans, and direct IAP binding protein with low pI (DIABLO) in rats, are released from mitochondria along with cytochrome C in response to an apoptotic stimulus. Once in the cytosol, these proteins bind to IAPs, setting caspases free from IAPs. Thus, Smac/DIABLO is classified as a pro-apoptotic molecule<sup>(33-39)</sup>.

b) Bcl-2 Family. This family of molecules participates in apoptosis regulation by controlling mitochondrial permeability and release of cytochrome C<sup>(7,10)</sup>. Both pro- and anti-apoptotic molecules are included in this family. The anti-apoptotic (Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub>) are found in the cell membrane, and inhibit the release of cytochrome C<sup>(40)</sup>. The pro-apoptotics (Bad, BID, Bax, and Bim) are located in the cytosol and, after receiving the death signal, translocate to the mitochondria to promote the release of cytochrome C<sup>(41)</sup>.

c) FLIP Family. Two members of this family, v-FLIP and c-FLIP, inhibit apoptosis induced by Fas and TNFR1 receptors. Because of the homology between FLIP and caspase 8, FLIP interferes with caspase 8 activation at the DISC level by binding to the Fas-FADD complex, thus inhibiting the binding to pro-caspase 8 and preventing its processing. Based on this, FLIP's participate in control of activation-induced cell death<sup>(42)</sup>.

y de acuerdo a su estructura se pueden agrupar en familias. Entre las más importantes se pueden citar a las IAPs (inhibitors of apoptosis proteins), a las proteínas miembro de la familia de Bcl-2 y a las FLIP (FLICE (caspasa 8)-inhibitory proteins).

a) Familia IAP. El primer nivel de regulación de las caspasas comprende el control de la activación de las pro-caspasas, mientras que el segundo nivel involucra la inhibición directa de las caspasas activas. Este último objetivo es realizado por las proteínas de esta familia; entre sus miembros destacan XIAP, c-IAP Y c-IAP2, las cuales tienen como función inhibir a varias caspasas (caspasa 3, 7 y 9) al unirse a ellas directamente y bloqueando su actividad. A su vez las IAPs están reguladas. La proteína Smac (second mitochondrial activator of caspases) en humanos y DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) en ratones, son liberadas de la mitocondria junto con el citocromo C en respuesta a un estímulo apoptótico. Al salir al citosol se une a las IAPs liberando a las caspasas de la unión con estas moléculas, por lo que Smac/DIABLO es una molécula pro-apoptótica al ser un regulador negativo de las IAPs<sup>(33-39)</sup>.

b) Familia Bcl-2. Los miembros de esta familia de moléculas participan regulando la apoptosis al controlar la permeabilidad mitocondrial y la liberación del citocromo C<sup>(7,10)</sup>. Dentro de los miembros de esta familia se encuentran moléculas pro y anti-apoptóticas. Las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>) se encuentran en la membrana externa inhibiendo la liberación del citocromo C<sup>(40)</sup>, mientras que los miembros pro-apoptóticos (Bad, BID, Bax, y Bim) residen en el citosol y se translocan a la mitocondria después de recibida la señal de muerte donde promueven la liberación del citocromo C<sup>(41)</sup>.

c) Familia FLIP. v-FLIP y c-FLIP inhiben la apoptosis inducida por los receptores Fas y TNFR1 entre otros. Debido a la homología que presenta FLIP con la caspasa 8, interfiere con la activación de ésta a nivel del DISC al unirse al complejo Fas-FADD, inhibiendo así la unión de la pro-caspasa 8 y con ello su procesamiento. Por lo anterior, participan en el control de la muerte celular inducida por activación<sup>(42)</sup>.

## **APOPTOSIS AND THE IMMUNE SYSTEM**

Apoptosis is of vital importance to the immune system as it is the basis for T and B lymphocyte repertoire selection, regulation of the cell populations size, and the function of these during an ongoing immune response<sup>(43-48)</sup>.

Immature T lymphocyte precursor cells migrate from the bone marrow to the thymus, where they mature. As a result of the positive and negative selection in the thymus, only a small portion of the large quantity of double positive T lymphocytes generated in the thymus cortex become CD4+CD8- or CD4-CD8+ and are selected to leave this organ<sup>(47)</sup>. Once in circulation, the mature T cells remain inactive until they encounter a specific antigen recognized by its receptor (TCR). The T cells are then activated, proliferate and begin the production of cytokines<sup>(49)</sup>. The inactive T cells normally produce low levels of Fas molecule, but when they interact with the antigen and are activated they begin to produce larger quantities of this molecule, making them susceptible to apoptosis<sup>(48-52)</sup>.

Cells with foreign peptides associated with class I MHC molecules are recognized by the T cytotoxic cells and are killed via apoptosis<sup>(53)</sup>. Apoptosis induction may occur in either of two forms, activation of the Fas receptor on the target cell's surface, or by perforin forming pores. The latter allows penetration of granzymes capable of beginning the apoptotic program from inside the cytoplasm by directly activating caspases<sup>(54)</sup>.

Like T cells, B cells are exposed to a process of continuous selection during their development in the bone marrow. In this way the autoreactive cells die by apoptosis while the remaining cells are exported to the periphery<sup>(26)</sup>. After B cells are activated, they experience somatic hypermutation in the germinal centers and B cell progeny with higher affinity are selected. Cells that recognize autoantigens, or that do not improve their affinity for the antigen, die by apoptosis<sup>(55,56)</sup>.

Apoptosis in lymphoid cells has been described in infections caused by bacteria<sup>(57,58,59,60)</sup>, viruses<sup>(61-67)</sup>, rickettsia<sup>(68)</sup>, protozoa<sup>(69,70,71)</sup>, and



## APOPTOSIS Y EL SISTEMA INMUNE

La participación de la apoptosis en el sistema inmune es de vital importancia, ya que interviene en la selección del repertorio de linfocitos T y B, así como en la regulación de las poblaciones celulares involucradas y de las funciones de las mismas durante una respuesta inmune<sup>(43-48)</sup>.

Las células precursoras inmaduras de los linfocitos T migran de la médula ósea al timo, el cual es su sitio de maduración. Debido a la selección positiva y negativa que ocurre en este órgano, sólo una pequeña proporción del gran número de linfocitos T dobles positivos generados en la corteza del timo llegan a ser CD4+CD8- o CD4-CD8+ seleccionados para salir del timo<sup>(47)</sup>. En la circulación, las células T maduras permanecen en reposo hasta que encuentran al antígeno específico reconocido por su receptor (TCR), lo cual las activa y causa su proliferación, así como la producción y liberación de citocinas<sup>(49)</sup>. Las células T en reposo producen bajos niveles de la molécula Fas, pero cuando interactúan con el antígeno y se activan, empiezan a producir una mayor cantidad de esta molécula, haciéndolas susceptibles de morir por apoptosis<sup>(48-52)</sup>.

Las células T citotóxicas reconocen y matan por apoptosis a las células que presentan péptidos extraños asociados a moléculas de MHC clase I<sup>(53)</sup>. La inducción de apoptosis puede ser de dos formas diferentes: por activación del receptor Fas en la superficie de la célula blanco, o bien liberando perforinas que forman poros, y permitiendo que penetren las granzimas que son capaces de desencadenar el programa apoptótico desde el interior del citoplasma al activar a las caspasas directamente<sup>(54)</sup>.

Al igual que ocurre con las células T en el timo, durante su desarrollo en la médula ósea, las células B están expuestas a un proceso de selección continua, por medio del cual las células autoreactivas mueren por apoptosis mientras que el resto son exportadas a la periferia<sup>(26)</sup>. Después de que las células B son activadas, experimentan hipermutación somática en los centros germinales, y la progenie de células B con nueva especificidad

helminths<sup>(72)</sup>. In some cases the apoptosis is associated with the host immune response and tends to eliminate the infectious agent, and in other cases it is associated with the ability of microorganism to evade the immune response. Some pathogenic agents can regulate apoptotic cell death, either by inducing or inhibiting it according to their needs, in order to favor their establishment and permanence in the host. This helps to partially explain how microorganisms establish themselves and how infections become chronic.

## TECHNIQUES FOR DETERMINING APOPTOSIS

There are a number of techniques for determining and quantifying apoptosis. The technique, or techniques, chosen for a given study of apoptosis will depend on the study model, types of sample and infrastructure available. An important consideration is that more than one technique is always required for appropriate data interpretation, and techniques that evaluate different events during apoptotic cell death should be used. Some of the more widely used techniques are briefly described below.

### 1.- DNA Electrophoresis

This is mainly a qualitative method, it is based on the extraction and purification of DNA from cells samples for electrophoretic separation in agarose gels. It shows chromatin fragmentation and allows a visualization of the typical ladder pattern of the apoptotic phenomenon, DNA fragments of 180-200 pb and multiples can be observed. It is also possible to differentiate between apoptosis and necrosis since the latter exhibits random fragmentation and produces a sweep in the gels<sup>(73)</sup>.

### 2.- Microscopy

Apoptosis can be determined using tissue sections dyed with hemotoxilin-eosine (H/E) as long as the magnitude of the phenomenon allows it. This is not an specific technique for the study of apoptosis and should only be used in conjunction with other tests.

Immunohistochemistry is a very useful tool because it allows detection of the proteins that participate

es seleccionada. Aquellas células que reconocen autoantígenos o que no mejoraron su afinidad por el antígeno mueren por apoptosis<sup>(55,56)</sup>.

La apoptosis en células linfoides ha sido descrita en infecciones causadas por diferentes bacterias<sup>(57,58,59,60)</sup>, virus<sup>(61-67)</sup>, rickettsias<sup>(68)</sup>, protozoarios<sup>(69,70,71)</sup> y helmintos<sup>(72)</sup>. En algunos casos esto ha sido asociado a la respuesta inmune del huésped tendiente a eliminar al agente infeccioso y en otros a mecanismos de evasión de la respuesta inmune por el microorganismo. Se ha sugerido que algunos agentes patógenos pueden interferir con la muerte celular apoptótica ya sea induciéndola o inhibiéndola dependiendo de sus necesidades, pero teniendo como fin favorecer su establecimiento y asegurar su permanencia en el huésped. Lo anterior ayuda a explicar, al menos en parte, como se establecen los microorganismos y cómo una infección se hace crónica.

## TÉCNICAS PARA DETERMINAR APOPTOSIS

Existen varias técnicas para determinar y cuantificar el fenómeno apoptótico. La, o las técnicas que se eligen para realizar un estudio de este fenómeno dependen del modelo de estudio, del tipo de muestras y de la infraestructura disponible. Es importante señalar que se ha considerado que para el estudio de la apoptosis es necesario utilizar más de una técnica, y de preferencia técnicas que evalúen eventos diferentes de la muerte celular apoptótica. Algunas de las más ampliamente utilizadas se presentan brevemente a continuación.

### 1.- *Electroforesis de DNA*

Esta metodología se basa en la extracción y purificación del DNA de las células que se están analizando, para posteriormente someter las muestras a una separación electroforética en geles de agarosa. Es un método principalmente cualitativo. Con esta técnica se pone en evidencia la fragmentación de la cromatina y permite visualizar el patrón en escalera típico del fenómeno apoptótico, dado por fragmentos de DNA de 180-200 pb y múltiplos<sup>(21)</sup>, siendo posible además la diferenciación entre apoptosis y necrosis, ya que en esta última la fragmentación es al azar y sólo se observa un barrido en los geles<sup>(73)</sup>.

in the apoptotic process by using specific antibodies. These include Fas (CD95), FasL (CD95L), members of the Bcl-2 family, caspases, p53, p21, etc.<sup>(74)</sup>.

The TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) technique is one of the most frequently used in the detection and quantification of apoptosis. This methodology is based on labeling of the free 3'OH extremes generated during the DNA fragmentation that occurs in apoptotic death. Labeling is done with nucleotides coupled to fluorescein isothiocyanate (FITC) thanks to terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme. Samples can be evaluated with fluorescent or light microscopy if an anti-FITC antibody coupled to an enzyme is used along with the corresponding substrate<sup>(75)</sup>.

### 3.- *Cytofluorometry*

There are a number of techniques that use cytofluorometry to determine apoptosis. These can be divided into three groups.

a) Detection of the molecules involved in apoptotic death. Many of these methods use antibodies coupled to a fluorochrome which are specific for one of the molecules involved in apoptotic death (i.e. Fas [CD95], FasL [CD95L], Bcl-2, p53, etc.)<sup>(76)</sup>. One of the early events in apoptosis is the loss of membrane asymmetry, during which phosphatidyl serine is left exposed to the cell exterior. Under certain calcium concentrations the Annexin V molecule has a specific affinity for this phospholipid. Annexin V coupled to a fluorochrome such as FITC is thus used, together with propidium iodide as a supravital coloring. This allows differentiation between apoptotic cells, which fix Annexin V and exclude PI, and necrotic cells, which capture both Annexin V and PI. Live cells are negative for both fluorochromes<sup>(77)</sup>.

b) Cell cycle analysis. Allows simultaneous quantification of apoptotic cells. A fluorochrome is used in this method that stoichiometrically inserts itself in the DNA, making it possible to determine the relative content of DNA in each cell thus differentiating the cell cycle phase in each one of

## 2.- Microscopía

La determinación del fenómeno apoptótico puede realizarse en cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina (H/E) siempre y cuando la magnitud del fenómeno así lo permita. Debe considerarse que esta tinción no es una técnica específica para apoptosis, por lo que deberán hacerse otras pruebas.

La inmunohistoquímica es una herramienta muy útil, ya que permite la detección de proteínas que participan en el proceso apoptótico al emplear anticuerpos dirigidos contra ellas. Por mencionar algunas: Fas (CD95), FasL (CD95L), miembros de la familia Bcl-2, caspasas, p53, p21, etc<sup>(74)</sup>.

La técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) es una de las más empleadas en la detección y cuantificación del fenómeno apoptótico. Esta metodología se basa en el marcaje de los extremos 3'OH libres generados durante la fragmentación del DNA en la muerte apoptótica. El marcaje se hace con nucleótidos acoplados a Isotiocianato de fluoresceína (FITC), gracias a la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Las muestras se pueden evaluar por microscopía de fluorescencia o por microscopía de luz, si se utiliza un anticuerpo anti-FITC acoplado a una enzima y se adiciona el sustrato correspondiente<sup>(75)</sup>.

## 3.- Citofluorometría

Existen varias técnicas para determinar apoptosis que hacen uso de la citofluorometría, las cuales se pueden dividir en 3 grupos:

a) Detección de moléculas involucradas en la muerte apoptótica. Muchas de estas utilizan anticuerpos acoplados a algún fluorocromo, y que están dirigidos contra alguna de las moléculas involucradas en la muerte apoptótica (Fas (CD95), FasL (CD95L), Bcl-2, p53, etc.)<sup>(76)</sup>. Por otra parte, como se mencionó en la introducción, uno de los eventos tempranos en la apoptosis es la pérdida de la asimetría de su membrana. Durante la muerte apoptótica, la fosfatidilserina queda expuesta hacia el exterior. Bajo ciertas concentraciones de calcio, la molécula de Anexina V, tiene afinidad específica

those. In this way, the cells in G0 or G1 phase have a DNA content equal to 2N. This increases when the cell begins division and initiates genetic material synthesis (S phase). Cells in mitosis have exactly twice as much DNA content just before they separate into two daughter cells (G2 and M phases), making the content equal to 4N. In apoptotic cells with chromatin degradation the content is less than 2N, which allows quantification via the appearance of a peak in the SubG0 region (SubG0 Peak Technique). A limiting aspect of this method is that it only detects late stage cell death, making it difficult to capture apoptotic cells in *in vivo* systems because phagocyte cells rapidly remove them. An advantage is that it allows simultaneous observation of cell size reduction during apoptosis<sup>(78,79)</sup>.

c) Caspase activity determination. This technique is useful for establishing the apoptosis induction route. For this purpose a caspase substrate is used of the same type as that for which activity is being determined, and this is linked to a fluorogenic molecule. If the enzyme is active it acts on the substrate, releasing the fluorogenic molecule, which becomes fluorescent and can thus be detected by fluorometry<sup>(76)</sup>.

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The study of apoptotic cell death has become very fashionable in recent years due to its implications in organism life from conception to death and its central role in certain diseases. In infections it is very important to distinguish whether a pathogenic agent induces apoptosis or, on the other hand if apoptosis is a host response aimed to limit infection. Study of this phenomenon provides useful information towards understanding the relationship between pathogens and hosts. In some cases, this helps in forming a clearer profile of the disease and thus provides information for vaccine development for disease avoidance and/or the use of antimicrobials that control it. Apoptosis has also been implicated in autoimmune diseases, myeloplastic syndromes, neurodegenerative diseases

por este fosfolípido, por lo que se utiliza acoplada a un fluorocromo como el FITC, y a la par se usa el Ioduro de propidio (PI) como colorante supravital, lo que permite diferenciar entre las células apoptóticas, que fijan la Anexina V y excluyen al PI y las células necróticas que captan tanto la Anexina V como el PI. Las células vivas son negativas para ambos fluorocromos<sup>(77)</sup>.

b) Análisis del ciclo celular. Permite de manera simultánea la cuantificación del fenómeno apoptótico. Para la determinación se emplea un fluorocromo (PI, DAPI, Naranja de acridina) que se intercala de manera estequiométrica en el DNA, por lo que es posible determinar el contenido relativo en cada una de las células y por lo tanto diferenciar la fase del ciclo celular en que se encuentra cada una de ellas. Así, las células en fase G0 o G1 presentan un contenido de DNA = 2N, cuando entran en división e inician la síntesis de material genético la cantidad es mayor (fase S), mientras que las células en mitosis tienen exactamente el doble de DNA justo antes de separarse en dos células hijas (fases G2 y M), siendo entonces su contenido igual a 4N; las células apoptóticas, en las que hay degradación de la cromatina, presentan un contenido menor a 2N permitiendo ser cuantificadas por la aparición de un pico en la región SubGo (Técnica del pico Sub-Go). Su limitante es que detecta una etapa tardía de la muerte celular, por lo que en sistemas *in vivo* es difícil captar a las células apoptóticas, pues son rápidamente removidas por células fagocíticas. Con esta técnica es posible apreciar simultáneamente la reducción de tamaño que presentan las células en apoptosis<sup>(78,79)</sup>.

c) Determinación de la actividad de caspasas. Esta técnica es útil cuando se quiere establecer la ruta de inducción de apoptosis. Se emplea el sustrato de la caspasa cuya actividad se quiere evidenciar unido a una molécula fluorogénica. Si la enzima está activa, actúa sobre su sustrato liberando la molécula fluorogénica, volviéndose ésta fluorescente y detectable en el citofluorómetro<sup>(76)</sup>.

## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Sin duda alguna, la muerte celular apoptótica es un fenómeno que ha tomado gran importancia en los

and cancer, among other pathologies. Work is currently in process to develop pharmaceuticals that can induce or inhibit apoptotic cell death as convenient. A number of questions about apoptosis still remain unanswered. For apoptosis to be the target of therapeutic intervention in an effective and safe manner it is necessary to conduct research to determine the conditions in which apoptosis can be selectively regulated in an organ or determined cell type without adverse effects in other systems. Fortunately, apoptotic death is an active process and can thus be manipulated.

*End of english version*

---

últimos años, debido principalmente a las implicaciones que tiene en la vida de los organismos desde que son concebidos hasta que mueren, e importantemente al papel que tiene en ciertas enfermedades. En el caso de las infecciones es importante señalar que cuando se estudia el papel de la apoptosis hay que distinguir si se trata de un proceso inducido por el agente causal o si se trata de una respuesta del huésped tendiente a limitar la infección. Así mismo, se ha visto que el estudio de este fenómeno ha aportado información útil para entender mejor la relación entre agente causal y hospedero, lo que permite en algunos casos tener un esquema más claro de la enfermedad y poder así proporcionar información para el desarrollo de vacunas que permitan evitar la enfermedad y/o de antimicrobianos que la controlen. La apoptosis ha sido implicada no sólo en enfermedades infecciosas, sino también en enfermedades autoinmunes, síndromes mielodisplásicos, enfermedades neurodegenerativas y cancer entre otras. Actualmente se está trabajando en la obtención de fármacos que puedan inducir o inhibir la muerte apoptótica según se requiera. Las preguntas que quedan en el aire son varias; una de ellas es si la apoptosis puede ser regulada selectivamente en un órgano o tipo celular determinado sin efectos adversos en otros sistemas. Afortunadamente, el hecho de que la muerte apoptótica sea un proceso activo hace posible su manipulación.

## LITERATURA CITADA

1. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-307.
2. Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1999;17:781-828.
3. Fletcher S. Genesis of apoptosis. *British Med J* 1994;309:542-543.
4. Kerr JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Path Bact* 1965;90:419.
5. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
6. Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996;272:278-1279.
7. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
8. Nagata S. Fas Ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999;33:29-55.
9. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.
10. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997;18:44-51.
11. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126-130.
12. Mehmet H. Caspases find a new place to hide. *Nature* 2000;403:29-30.
13. Thornberry NA, Lazabnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
14. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2239-2244.
15. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407:810-816.
16. Kothakota S. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278:294-298.
17. Goulet DI, Courvalin JC, Buendia B, LBR, A chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. *J Cell Sci* 1998;111:1441-1451.
18. Neamati N, Fernandez A, Wright S, Kiefer J, McConkey DJ. Degradation of laminin B1 precedes oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes and isolated thymocyte nuclei. *J Immunol* 1995;154:3788-3795.
19. Enari, M. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
20. Platt N, Da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol* 1998;8:365-372.
21. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997;45:923-934.
22. Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984;132:38-42.
23. Pandey S, Walker PR, Sikorska M. Identification of a novel 97 kDa endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. *Biochemistry* 1997;36:711-720.
24. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999;331-367.
25. Kroemer G, Dallaporta B, Resche M. The mitochondrial death/live regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:619-42.
26. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992;10:267-293.
27. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:131-136.
28. Gregory CD. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2000;12:27-34.
29. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784-788.
30. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
31. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-1546.
32. Fadok V, Bratton DL, Konoval A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE2 and PAF. *J Clin Invest* 1998;101:890-898.
33. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev* 2002;3:401-410.
34. Palaga T, Osborne B. The 3D's of apoptosis: death, degradation and DIAPs. *Nature Cell Biol* 2002;4:E149-E151.
35. Yoo SJ, Huh JR, Muro I, Yu H, Wang L, Wang S, Feldman RM, Clem R, Muller HA, Hay BA. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nature Cell Biol* 2002;4:416-424.
36. Holley CL, Olson MR, Colón-Ramos DA, Kornbluth S. Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. *Nature Cell Biol* 2002;4:439-444.
37. Wilson R, Goyal L, Ditzel M, Zachariou A, Baker D, Agapite J, Steller H, Meier P. The DAIP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nature Cell Biol* 2002;4:445-450.
38. Hays R, Wickline L, Cagan R. Morgue mediates apoptosis in the *Drosophila melanogaster* retina by promotion of DIAP1. *Nature Cell Biol* 2002;4:425-431.
39. Gozani O, Boyce M, Yoo L, Karuman P, Yuan J. Life and death in paradise. *Nature Cell Biol* 2002;4:E159-E162.
40. Boise LH, Thompson CB. Bcl-x<sub>L</sub> can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3759-3764.
41. Yoshino T, Kishi H, Nagata T, Tsukada K. Differential involvement of p38 MAP kinase pathway and Bax translocation in the mitochondria-mediated cell death in TCR- and dexamethasone-stimulated thymocytes. *Eur J Immunol* 2001;31:2702-2708.

42. Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nature* 2001;1:50-54.
43. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Rev* 2002;2:309-322.
44. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 1995;16:569-574.
45. Russel JH. Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 1995;7:382-388.
46. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998;280:243-248.
47. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994;372:100-103.
48. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-795.
49. Green DR, Scott DW. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1994;6:476-487.
50. Ju S, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;373:444-448.
51. Nishimura Y, Ishii A, Kobayashi Y, Yamasaki Y, Yonehara S. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T-cells. *J Immunol* 1995;154:4395-4403.
52. Nagata S. Fas Ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet* 1999;33:29-55.
53. Stenger S, Modlin R. Cytotoxic T-cell responses to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 1998;10:471-477.
54. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995;16:202-206.
55. Pulendran B, Kannourakis G, Nouri S, Smith KGC, Nossal GJV. Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B-cells. *Nature* 1995;375:331-334.
56. Shokat KM, Goodnow CC. Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature* 1995;375:334-338.
57. Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, Wittmer S. IFN $\gamma$  eliminates responding CD4 T-cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med* 2000;192:117-122.
58. Fuse Y, Nishimura H, Maeda K, Yoshikai Y. CD95 (Fas) may control the expansion of activated T-cells after elimination of bacteria in murine listeriosis. *Infect Immun* 1997;65:1883-1891.
59. Gilbertson B, Zhong J, Cheers C. Anergy, IFN- $\gamma$  production and apoptosis in terminal infection of mice with *Mycobacterium avium*. *J Immunol* 1999;163:2073-2080.
60. Monack DM, Mecsas J, Bouley JD, Falkow S. Yersinia-induced apoptosis *in vivo* aids in the establishment of a systemic infection in mice. *J Exp Med* 1998;188:2127-2137.
61. Brusckhe CJM, Hulst MM, Moormann RJM, van Rijn PA, van Oirschot. Glycoprotein E<sup>ms</sup> of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J Virol* 1997;71:6692-6696.
62. Suárez P, Díaz-Guerra M, Prieto C, Esteban M, Castro JM, Nieto A, Ortín J. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 1996;70:2876-2882.
63. Sato M, Mikami O, Kobayashi M, Nakajima Y. Apoptosis in the lymphatic organs of piglets inoculated with classical swine fever virus. *Vet Microbiol* 2000;75:1-9.
64. Eleouet JF, Chilmoneczyk S, Bernardeau L, Laude H. Transmissible gastroenteritis coronavirus induces programmed cell death in infected cells through a caspase-dependent pathway. *J Virol* 1998;72:4918-4924.
65. Aleman N, Quiroga MI, Lopez-Peña M, Vazquez S, Guerrero F, Nieto JM. Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. *J Virol* 2001;75:469-479.
66. Summerfield A, Knoting SM, McCullough KC. Lymphocyte apoptosis during classical swine fever: implication of activation-induced cell death. *J Virol* 1997;72:1853-1961.
67. Yoshida H, Sumichika H, Hamano S, He X, Minamishima Y, Kimura G, Nomoto K. Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus. *J Virol* 1995;69:4769-4775.
68. Kasuya S, Nagano I, Ikeda T, Chitoshi G, Shimokawa K, Takahashi Y. Apoptosis of lymphocytes in mice induced by infection with *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 1996;64:3937-3941.
69. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Melo FG, DosReis GA, Lopes MF. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 2000;403:199-203.
70. Toure-Balde A, Aribot G, Tall A, Spiegel A, Rousilhon C. Apoptosis modulation in mononuclear cells recovered from individuals exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Parasite Immunol* 2000;22:307-318.
71. Sánchez-Torres L, Rodríguez-Ropon A, Favila-Castillo L. Mouse splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells undergo extensive apoptosis during a *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol* 2001;23:617-626.
72. Fallon PG, Smith P, Dunne DW. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur J Immunol* 1998;28:1408-1416.
73. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218:314-319.
74. Cell Signaling Technology. 2002 Catalog & Technical reference. [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)
75. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Azoti L, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. TUNEL: improvement and evaluation of the method for *in situ* apoptotic cell identification. *Biochimica* 1997;2:12-17.
76. Pharmingen. Apoptosis, applied reagents and technologies. 2002 Catalog. [www.pharmingen.com](http://www.pharmingen.com)
77. Vermees I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutlingsperger CPM. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 1995;184:39-51.
78. McCloskey TW, Oyaizu N, Coronese M, Pahwa S. Use a flow cytometric assay to quantitate apoptosis in human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71:14-18.
79. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 1991;139:271-279.