

# Apoptosis: ser o no ser, ésa es la cuestión

Manuel Vaquero

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona.

**Apoptosis; Mitocondria; Capsasas; Proteínas proapoptosis; Quimiorresistencia**

El conocimiento de la importancia de la apoptosis en la fisiología y patología de los mamíferos ha progresado rápidamente en los últimos años. Lo que fueron hallazgos de laboratorio tienen, cada vez más, una relevancia clínica. Esta revisión pretende el acercamiento, al médico general y al especialista, de los conceptos básicos y de los hallazgos más recientes sobre apoptosis. Para facilitar su lectura se ha considerado la apoptosis por órganos y tipos de patologías, aun asumiendo que esta compartimentalización puede ser artificiosa en ocasiones. La bibliografía es suficientemente amplia para poder profundizar tanto en el estudio de los mecanismos básicos como en la asociación a las diversas enfermedades.

La necrosis convencional siempre se ha considerado perjudicial para el organismo. La introducción de otro tipo de necrosis<sup>1</sup> que pudiese estar totalmente integrada en la fisiología de los mamíferos comienza a finales del siglo XIX, cuando pioneros como Walther Fleming la reconocieron al estudiar al microscopio fenómenos involutivos normales, como los existentes en los folículos ováricos o en la mama poslactación<sup>2-4</sup>. Los embriólogos pronto empezaron a explicar muchos de los cambios acontecidos durante el desarrollo del embrión gracias a esta muerte celular programada (MCP)<sup>4-7</sup>. Los hallazgos morfológicos fueron recobrados por Kerr et al en 1972<sup>8</sup> y propusieron la denominación de apoptosis para ellos (del gr. *apoptoe-sis*, indicativo de la caída de las hojas de un árbol o de los pétalos de una flor)<sup>9,10</sup>.

A los hallazgos morfológicos siguieron los moleculares, iniciados por Sydney Brenner al estudiar el nematodo *Caenorhabditis elegans* y, posteriormente, con el descubrimiento de un patrón característico, «en escalera», al plasmar el ADN de las células apoptóticas en un gel de electroforesis<sup>3,11-16</sup>. Actualmente, se conocen un gran número de sus mecanismos moleculares. Además, la MCP se ha conservado durante la evolución filogenética e incluso existe en organismos unicelulares y en las plantas<sup>5,17-19</sup>.

Los cambios morfológicos de la apoptosis se observan mejor con microscopía electrónica<sup>2,8,20</sup>. La cromatina se condensa y forma una masa semilunar, desaparecen las uniones intercelulares y las diferenciaciones de la superficie celular mientras la célula se retrae y se hace más densa. Por último, se disgrega en pequeñas porciones, conocidas como cuerpos apoptóticos, que son fagocitados sin producir fenómenos inflamatorios<sup>3</sup> (tabla 1).

Actualmente es posible detectar la apoptosis e incluso cuantificarla o analizar los mecanismos implicados por técnicas enzimáticas, inmunohistoquímicas, citométricas o moleculares<sup>21-24</sup>.

## Mecanismos moleculares de la apoptosis

En la apoptosis, desde el punto de vista molecular, podemos considerar tres fases. a) iniciación; b) ejecución, y c) degradación celular. Las dos primeras pueden ser reversibles gracias a mecanismos bloqueadores o reguladores<sup>21,25</sup>.

### Iniciación

Hay múltiples factores inductores de la apoptosis, como pérdida de factores tróficos o de crecimiento, aumento de iones de calcio, radicales libres, virus, radiaciones  $\gamma$  y UV, quimioterapia o radioterapia<sup>21</sup>. Cada factor puede utilizar una determinada vía inductora de apoptosis e, incluso, varias. Así, los linfocitos citotóxicos inducen la apoptosis a células que no son linfoides mediante la acción de la perforina-granzima B, pero se eliminan entre ellas utilizando la vía FasL-Fas.

Los caminos clásicos de la señal apoptótica en los mamíferos son: a) activación de receptores especializados de la membrana celular; b) alteración mitocondrial; c) alteración del ADN, y d) pérdida del contacto intercelular o del anclaje con la matriz extracelular. Además, la pérdida de factores tróficos, la perforina-granzima B y la producción de esfingomielinasa son capaces de inducir apoptosis<sup>21</sup>.

– *Activación de receptores especializados*<sup>26</sup>. Las citocinas son una familia de proteínas que regulan la proliferación celular al unirse a receptores y células específicos. Una subfamilia es la del TNF, a la que pertenecen los de la apoptosis, como el FasL y el TRAIL (*TNF-related apoptosis induced ligand*). El FasL se une a su receptor Fas (Apo 1, CD95), que es una proteína transmembrana cuya porción intracelular puede trimerizarse y transducir la señal apoptótica<sup>27</sup>. Lo

TABLA 1

### Diferencias entre apoptosis y necrosis convencional

Apoptosis	Necrosis
En condiciones fisiológicas y en enfermedades determinadas	Patológica por toxinas e hipoxia graves o con gasto de ATP
Retirada de factores de crecimiento	
Radicales libres	
Activación de receptores específicos	
Alteración de la p53	
Alteración metabólica o del ciclo celular	
Proceso activo y en células aisladas	No requiere energía y en grupos celulares
Rotura ordenada del ADN	Rotura al azar del ADN
Fragmentación conservando la membrana	Lisis de la membrana celular
Fagocitosis inespecífica sin inflamación	Fagocitos especializados e inflamación

Correspondencia: Dr. M. Vaquero.  
Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol.  
Ctra. Canyet, s/n. 08916 Badalona.

Recibido el 27-7-1999; aceptado para su publicación el 30-11-1999

Med Clin (Barc) 2000; 114: 144-156

mismo sucede con el TRAIL y sus receptores: TNFR1 y 2<sup>28</sup>. Como veremos posteriormente, estos últimos también están implicados en mecanismos «provida» de la célula<sup>26,29</sup> que pueden inhibir la apoptosis. Los dominios citoplásmicos de los receptores se unen a moléculas específicas que actúan a modo de segundos mensajeros de la señal apoptótica<sup>21,30</sup>. El Fas se une al FADD/MORT1 (Fas-associating protein with death domain), que actúa como factor que se une al FLASH, el cual atrae a varias moléculas de procaspasa 8<sup>31,32</sup> que, al activarse, inicia la cascada ejecutora de la apoptosis mediante las caspasas. El TNFR1 se une al TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) que puede utilizar la vía del FADD u otra vía propia, poco conocida, a través del RAIDD<sup>33</sup> que promueve la agregación de la procaspasa 2 para ejecutar la apoptosis. Otro receptor, recientemente descubierto<sup>13</sup>, es el DR3, que tiene como cofactor al RIP (*receptor interaction protein*), el cual agruparía a moléculas de procaspasa 1<sup>34</sup>.

– **Vía mitocondrial.** El origen «bacteriano» de las mitocondrias justifica su importancia en la evolución, inducción y regulación de la apoptosis<sup>35</sup>. La inducción de la apoptosis desde las mitocondrias se hace al menos por tres mecanismos generales<sup>35</sup>: a) alteración del transporte de electrones (p. ej., por la cerámide), de la fosforilación oxidativa y de la producción de ATP; b) liberación de proteínas (como el citocromo c)<sup>36</sup> que inducen la activación de las caspasas<sup>5,37</sup>, y c) alteración del potencial redox que conduce a un incremento de la producción de superóxidos. Durante la apoptosis el potencial transmembrana de la membrana interna de las mitocondrias se colapsa debido a la apertura de canales no selectivos (poros PTP) que permiten el equilibrio de iones en la matriz mitocondrial y en el espacio entre sus membranas interna y externa. Esto altera la cadena respiratoria y crea una hiperosmolaridad de la matriz que hace que se expanda. La membrana mitocondrial interna se adapta a la expansión disminuyendo sus repliegues, pero la externa acaba rompiéndose y liberando hacia el citosol proteínas activadoras de las caspasas como el citocromo c, localizado en el espacio intermembrana<sup>25,35,38</sup>. La liberación de citocromo c utiliza un cofactor específico conocido como Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*), capaz de agrupar procaspasa 9 e iniciar así la fase ejecutora de las caspasas<sup>39</sup>. En las células en que no se altera la morfología mitocondrial durante la apoptosis, el citocromo c saldría gracias a la apertura de los poros VDAC (*voltage-dependent anion channel*), normalmente implicados en el intercambio ATP/ADP (v. «Mecanismos reguladores»)<sup>38</sup>.

– **Pérdida del anclaje extracelular.** Las células se unen a la matriz extracelular gracias a las integrinas. Muchas de ellas reconocen a los grupos RGD (arginina-glicina-aspartato). Estos grupos RGD pueden iniciar la apoptosis por una vía propia poco conocida<sup>40</sup>. Si hay grupos RGD solubles en la matriz, pueden bloquear las integrinas y esto hace que la célula se suelte e inicie la apoptosis. También se ha sugerido que los grupos RGD solubles actuarían directamente sobre la procaspasa 3, activándola.

– **Vía del ADN.** Cualquier daño del ADN puede ser detectado por las proteínas p53 y ATM (gen mutación ataxia-telangiectasia) que, como veremos más adelante, pueden actuar favoreciendo tanto la supervivencia celular como la apoptosis<sup>13,41</sup>.

– **Vía perforina-granzima B.** Es la utilizada por los linfocitos citotóxicos. La perforina produce canales en la membrana celular por los que la granzima B se introduce en el interior de la célula diana para activar directamente la procaspasa 3<sup>19,21,33</sup>.

– **Vía esfingomielinasa.** Diferentes estímulos, como las radiaciones  $\gamma$ , activarían la esfingomielinasa, capaz de degra-

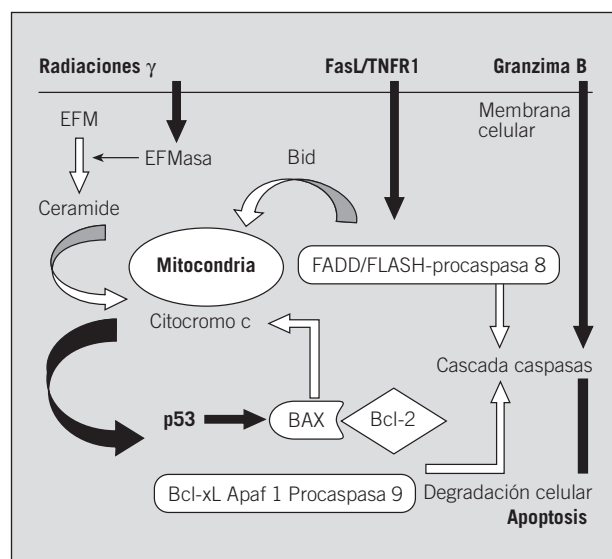


Fig. 1. Mecanismos moleculares de la apoptosis. En negrita las principales vías de la apoptosis. Formación de dímeros reguladores (Bax-Bcl-2). Circuito amplificador de la proteína Bid que comunica la vía Fas con la mitocondrial (explicación en el texto); EFM: esfingomielinasa.

dar la esfingomielina hasta cerámide, el cual es capaz de inducir la apoptosis<sup>21,29</sup>.

– **Otras vías.** Determinados factores pueden inducir la apoptosis a través de la transcripción de otros genes. Así, el aumento de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol puede actuar, a través de la calcineurina, como activador de la apoptosis, activando la caspasa y la endonucleasa<sup>42</sup>, o puede activar la transcripción de genes del FasL<sup>43,44</sup> (fig. 1). Lo mismo sucede cuando faltan los factores de crecimiento, lo que anula la vía de la Akt (v. «Activación de factores de transcripción provida»).

### Ejecución

En la fase ejecutora de la apoptosis son fundamentales las caspasas<sup>18</sup>. Las caspasas son cisteinoproteasas que rompen proteínas diana con residuos de ácido aspártico. Las caspasas pueden activarse por dos mecanismos: a) una caspasa activa a una procaspasa y así sucesivamente, y b) por agrupamiento en torno a cofactores<sup>28</sup>. El factor FADD se uniría al cofactor FLASH, el cual agruparía a varias moléculas de procaspasa 8/FLICE, mientras la procaspasa 9 se agruparía en torno al Apaf 1<sup>30</sup>. Las caspasas están presentes constitutivamente en la mayoría de las células. La agregación de las procaspasas la realizan cofactores favorecedores de la polimerización<sup>21,45,46</sup>. La procaspasa 8 es la que se activa cuando se utiliza la inducción vía FasL-Fas, mientras que la procaspasa 9 se activa cuando se utiliza la vía mitocondrial. La activación de la procaspasa 9 requiere, además, citocromo c y ATP<sup>15</sup>. El conjunto de caspasas iniciadoras y de su cofactor es lo que se conoce con el nombre de «apoptosoma»<sup>45</sup>.

### Degradación celular

La degradación celular se produce por la acción de las caspasas ya que, además de actuar sobre sí mismas, son capaces de actuar sobre diversos tipos de proteínas<sup>3,15,37,46</sup>: a) proteínas del sistema reparador y replicador del ADN; b) proteínas del citoesqueleto o estructurales, como citoque-

ratinas, actina, catenina  $\beta$  y gelsolina<sup>47</sup>; c) oncoproteínas (Rb, mdm2), y d) proteínas inhibidoras de la apoptosis, del tipo de la Bcl-2, no sólo inactivándolas sino también produciendo un fragmento promotor de la apoptosis. Las caspasas también activan la ADNasa, que rompe los cromosomas<sup>2,21,47,48</sup> y destruyen la lámina nuclear<sup>15,46</sup> situada bajo la membrana nuclear y que contribuye a la organización de la cromatina. También alteran la matriz nuclear<sup>49</sup>. Como resultado de la acción de las caspasas sobre estas proteínas se producen alteraciones que impiden la supervivencia celular y explican los cambios morfológicos característicos<sup>15,46</sup>. Los cambios superficiales de la membrana celular y de los lípidos subyacentes que quedan expuestos (fosfatidilserina) permiten que los cuerpos apoptóticos puedan ser reconocidos por el CD14 de la célula macrofágica y posteriormente fagocitados<sup>14,19,50</sup>. En la aparición rápida de los cambios morfológicos parece clave la acción de las gelsolinas, una serie de proteínas con especificidad tisular que despolimerizan los filamentos de actina, los cuales son los constituyentes fundamentales del citoesqueleto<sup>51</sup>.

### Mecanismos reguladores de la apoptosis

Es lógico que dada la importancia de la apoptosis en la supervivencia celular existan mecanismos reguladores que actúen a diferentes niveles (fig. 1).

#### Inactivación de ligandos

Consiste en la proteólisis o bloqueo de los ligandos de los receptores específicos de la apoptosis, FasL y TRAIL<sup>30</sup>.

#### Proteínas provida y proapoptosis<sup>52,53</sup>

Existen en los mamíferos diferentes proteínas capaces de formar heterodímeros de cuya composición resulta una acción apoptótica o una inhibidora de la misma<sup>25</sup>. El miembro más representativo de las proteínas provida es la Bcl-2<sup>22</sup>, que reside en la membrana mitocondrial externa, en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear<sup>13</sup>. Estas localizaciones y su homología con moléculas bacterianas formadoras de poros (toxina diftérica) hacen suponer que funcionen como formadoras o reguladoras de poros PTP mitocondriales (*permeability transition pore*)<sup>13</sup>. La otra proteína provida mejor conocida es la Bcl-xL. Ambas tienen las siguientes funciones<sup>43</sup>: a) dimerización con otras proteínas homólogas provida o proapoptosis; b) unión a proteínas sin homología, como la Apaf-1 (la Bcl-xL) y la calcineurina, y c) formación de poros iónicos mitocondriales pequeños y protectores. La protección sobre las membranas mitocondriales la ejercen previniendo la tumefacción osmótica, translocando las proteínas proapoptóticas a las membranas mitocondrial interna e impidiendo la formación de poros grandes, perjudiciales, por estas últimas (v. «Vía mitocondrial»).

La proteína proapoptótica mejor conocida es la Bax, que tiene localización citosólica antes de su activación. La proteína Bax favorece la apoptosis independientemente de la vía de las caspasas. Al ser activada por un estímulo apoptótico (p. ej., p53), se transloca a la membrana externa de la mitocondria<sup>43</sup>, donde forma poros grandes perjudiciales (poros VDAC), altera el potencial de membrana y libera citocromo c<sup>54</sup>. Otras proteínas proapoptóticas son: Bcl-xS, Bak, Bad y Bid<sup>34,35</sup>. La proteína Bcl-xL funciona de manera muy semejante a la Bax.

Las proteínas provida y proapoptosis forman dímeros entre sí. Si los dímeros contienen dos proteínas provida o una provida y otra proapoptosis se bloquea la muerte celular al no liberarse el citocromo c<sup>52</sup>. La proteína Bad es capaz de

TABLA 2

### Mecanismos reguladores de la apoptosis

Supervivencia por inactivación de FasL y TRAIL
Formación de dímeros provida*: Bcl-2/Bax y Bcl-xL/Bak
Formación de dímeros apoptóticos: Bax/Bax y Bax/Bak
Factores de transcripción para la supervivencia: Akt y NF- $\kappa$ B
Supervivencia por inhibición directa de las caspasas: IAP
Ambivalentes
p53 (supervivencia por bloqueo fase G1 o apoptosis vía Bax)
myc (supervivencia por bloqueo factor saf o apoptosis vía FasL o p53)

\*El Bad se une a Bcl-2 y Bcl-xL y facilita la formación de dímeros apoptóticos.

desplazar de los heterodímeros a las proteínas provida y favorece así el que se formen dímeros con dos proteínas proapoptóticas<sup>26,35</sup> (tabla 2).

#### Activación de factores de transcripción provida

Las células estarían luchando constantemente por evitar la apoptosis. La estimulación por factores de crecimiento es una forma de evitarla<sup>26</sup>. Mientras se activen los receptores de los factores de crecimiento se mantiene activado el factor Akt (factor dependiente de la cinasa serina-treonina) que fosforila al Bad. El Bad en este estado permanece secuestrado en el citosol por las proteínas específicas 14-3-3 y deja libre a la Bcl-2 y al Bcl-xL<sup>44</sup>. Con la proteína Bak funciona de forma semejante.

Algunos receptores apoptóticos, como el TNFR1 y 2, además de inducir la apoptosis, son capaces de activar factores transcripcionales que favorecen la supervivencia celular. El más importante es el NF- $\kappa$ B<sup>26</sup>. En este caso el dominio citoplásmico del receptor TNFR activado se une a una familia de proteínas citosólicas conocidas como TRAF que activan al gen NF- $\kappa$ B favoreciendo la producción de moléculas provida<sup>55</sup> e inhiben la activación de la procaspasa 8<sup>56</sup>. El receptor Fas carece de esta función de supervivencia<sup>29</sup>. Esta dualidad, supervivencia-apoptosis, también es evidente con otras proteínas. La p53 es capaz de frenar el ciclo celular para que la célula repare los daños del ADN. Si los daños son irreparables, la proteína p53 promueve la apoptosis<sup>57</sup> a través de la proteína Bax<sup>54</sup> e incrementa la transcripción de Bax y de los genes *mdm2* y *p21* implicados en la regulación de la p53<sup>13</sup>. El gen *ATM* actuaría induciendo la formación de la p53.

Otras proteínas que tienen la dualidad supervivencia-apoptosis son la myc y la ras. La myc normalmente favorece la proliferación celular. Si faltan factores de crecimiento, oxígeno o ciertos factores citotóxicos, la myc removería un hipotético factor conocido como Saf (*suppressor of apoptosis by Fas*), lo que permitiría que se completase la apoptosis<sup>58</sup>. También es capaz de inducir la activación de genes que producen sobreexpresión de FasL y Fas e, incluso, activar la vía apoptótica de la p53<sup>59,60</sup>. La inducción de la apoptosis por la ras es independiente de la p53 y se produce mediante la activación de factores de transcripción específicos (c-Jun) que pueden ser suprimidos, a su vez, por la activación del NF- $\kappa$ B<sup>51</sup>.

#### Inhibición de las caspasas<sup>62</sup>

Hay un grupo de proteínas bloqueadores de las caspasas (3, 7 y procaspasa 9) conocidas como IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*)<sup>63</sup>. Las IAP se identificaron primero en los baculovirus y tienen dominios definitorios: el BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat*) y el RING Zn finger, implicados en la interrelación ADN-proteína. Los genes IAP humanos son fundamentalmente los siguientes: XIAP, HIAP-1 y 2, y la survivina. La survivina sólo tiene un dominio BIR y es la IAP

más pequeña. Inhibe directamente la caspasa 3 y, fisiológicamente, sólo se expresa en tejidos embrionarios, placenta y timo, donde actúa como estabilizadora de los microtúbulos del huso mitótico<sup>63</sup>. Las proteínas bloqueadoras, HIAP-1 y 2, están también relacionadas con el gen *NF-κB*, el cual favorece la transcripción de factores de supervivencia<sup>33</sup>.

### Mecanismos amplificadores de la apoptosis

Los mecanismos amplificadores de la apoptosis no sólo expanden la señal apoptótica en la célula donde se ha iniciado, sino que algunos de ellos lo propagan a las células vecinas. Se ha comentado la posibilidad de la myc de activar genes productores de FasL y Fas, lo que aumentaría las probabilidades de apoptosis de las células cercanas portadoras de Fas.

La proteína proapoptótica Bid crea un circuito amplificador entre la vía del Fas y la mitocondrial. Así, la activación de la procaspasa 8 transloca al Bid hasta la mitocondria, donde libera un cóctel de factores letales, entre ellos el citocromo c, que amplificará la señal apoptótica utilizando la vía mitocondrial<sup>64</sup> (fig. 1).

La amplificación local y la propagación del estímulo apoptótico a las células vecinas también puede producirse por la vía de la Akt<sup>44</sup>. Si faltan factores de crecimiento deja de funcionar la citada vía y el factor FKHR-1 sin fosforilar (de la familia  *Forkhead*  que tienen un dominio característico de unión al ADN) se traslada al núcleo y transcribe Bax, TNF y FasL, con la consiguiente amplificación y transmisión de la apoptosis<sup>44</sup>.

Descritos los personajes, ¿cómo se representaría escuetamente el guión de la apoptosis? (fig. 1). Una vez activados el Fas o el TNFR1 se recluta el factor FADD que, a través del cofactor FLASH, promueve la agregación de procaspasa 8 con mínima actividad proteolítica. Al unirse las procaspasas 8 terminan autoactivándose en este «apoptosoma» y posteriormente activan las procaspasas de niveles inferiores que llevarán a efecto la desintegración celular. La vía mitocondrial comenzaría con la liberación de citocromo c que trunca al cofactor Apaf 1 induciéndole cambios conformacionales que producen su separación de la Bcl-xL y la agregación de procaspasa 9 que, al activarse, inicia la cascada de las caspasas. Como he comentado, la caspasa 8 es capaz, a través de la proteína Bid, de producir la liberación de citocromo c, lo que crea un circuito amplificador entre ambas vías<sup>34</sup>.

### Enfermedades con apoptosis alterada

Son innumerables las enfermedades en las que se ha demostrado una alteración de la apoptosis, bien por exceso bien por defecto<sup>65-67</sup> (tabla 3). No obstante, debe considerarse que el encontrar un defecto de la apoptosis en un proceso no significa que sea importante en su patogenia o en su evolución. Incluso si el defecto es importante, no puede asegurarse una respuesta significativa a tratamientos que influyan en la apoptosis.

Comentaré, agrupadas por sistemas o tipos patogénicos, algunas de las enfermedades en las que los estudios realizados han aportado resultados de interés.

### Enfermedades neurodegenerativas

Las neuronas parecen depender de la expresión de genes promotores de la supervivencia, como el *Bcl-xL* y el *p53*, para sobrevivir en la edad adulta y son muy susceptibles a la apoptosis, sobre todo por aumento de iones de calcio y de radicales libres<sup>67,68</sup>.

TABLA 3

### Enfermedades con apoptosis alterada

Demasiadas apoptosis	Apoptosis escasa
Sida	Síndrome Canale-Smith
Hepatitis virales	Linfomas
Enfermedad de Wilson	Leucemias
Colitis ulcerosa	Tumores sólidos
Anemia aplásica	Resistencia a la quimioterapia
Síndromes mielodisplásicos	Enfermedades autoinmunes
Algunos tumores sólidos	LES
Enfermedades neurodegenerativas	Artritis reumatoide
Diabetes mellitus tipo I	Enfermedad de Graves
Tiroiditis de Hashimoto	

La apoptosis es un mecanismo importante de pérdida celular en las enfermedades neurodegenerativas y puede afectar tanto a neuronas como a células gliales. Un nuevo anticuerpo, la fractina, frente a los fragmentos de actina resultantes de la acción de la caspasa 3, permite estudiar de forma más específica los fenómenos de apoptosis en el sistema nervioso, ya que marca tanto el citoplasma perinuclear como los largos procesos celulares de las células implicadas, con lo que demuestran mejor los circuitos implicados<sup>69,70</sup>.

La distribución anatómica de la apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas varía según el tipo de enfermedad<sup>71</sup>. Así, predomina en los lóbulos frontal y temporal en la enfermedad con cuerpos de Lewy difusos, en la enfermedad de Parkinson (EP) y en el síndrome de Down con Alzheimer, mientras que en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se detecta en la corteza motora y en las astas anteriores espinales<sup>72</sup>. En la EP hay, además, un exceso de apoptosis en las neuronas dopaminérgicas nigrostriadas en respuesta a la lesión oxidativa. El hidrocloreuro de selegilina, utilizado en el tratamiento del parkinsonismo, no sólo mejora la respuesta dopaminérgica al actuar sobre la MAO-B, sino que inhibe la liberación de sustancias inductoras de apoptosis desde las mitocondrias<sup>8</sup> e incrementa la transcripción de Bcl-2 y de Bcl-xL<sup>67</sup>. En cuanto a la levodopa, parece inducir la apoptosis en estas neuronas, lo que tendría importancia a la hora de considerar su uso en los estadios más precoces de la enfermedad<sup>73</sup>. En la enfermedad de Huntington hay una apoptosis selectiva de las neuronas del cuerpo estriado. La introducción, en ratones, de una mutación dominante negativa para la proteína huntingtoniana mejora la sintomatología de la enfermedad en los animales<sup>74</sup>.

En la ELA se han encontrado mutaciones en el gen codificante de la superóxido-dismutasa Cu-Zn. Esto provocaría una disminución de la capacidad de las neuronas motoras para eliminar radicales libres junto a un aumento de la entrada de iones de calcio y de aminoácidos excitadores, como el *N*-metil-D-aspartato, lo que produce un exceso de apoptosis<sup>29</sup>. Las formas hereditarias autosómicas dominantes de la enfermedad de Alzheimer (EA) son de presentación precoz y se deben a mutaciones en uno de estos tres genes: presenilina-1 (*PS-1*), presenilina-2 (*PS-2*) y precursor de la proteína amiloidea (*PPA*). La alteración de la *PS-1* es la causante del 50% de los casos y es muy rara la alteración de la *PPA*<sup>75,76</sup>.

La proteína *PS-1* se enrolla en la membrana del retículo endoplásmico y regula la proteólisis de la *PPA*, que se acumulará si la proteína *PS-1* es anómala. El péptido amiloide  $\beta$  estaría aumentado en las mutaciones del gen *PPA*, sobre todo su residuo amiloidógeno que se agrega fácilmente, se hace insoluble y formar las placas seniles<sup>77,78</sup>. Por otra parte, la proteína *PS-2* es un sustrato de la caspasa 3, que la rompe y deja un fragmento insoluble carboxiterminal<sup>70</sup> productor de apoptosis<sup>3,74,76,77</sup>.



Aunque la pérdida neuronal en la EA no se correlaciona totalmente con la densidad de placas seniles, parece que las neuronas circundantes no son totalmente normales y están predispuestas a la apoptosis por el amiloide  $\beta$  depositado, que es capaz de disminuir la cantidad de proteína Bcl-2 y aumentar la de Bax. Estos cambios incrementan la sensibilidad neuronal al estrés oxidativo<sup>3,36</sup>. Esta tendencia a la apoptosis también afectaría a la microglía asociada a las placas<sup>69</sup>. Además, en la EA existiría un círculo viciado creado por la caspasa 3. Durante la apoptosis neuronal incrementa la cantidad de caspasa 3, la cual produce proteólisis de la proteína PPA y con ello la formación del péptido  $\beta$ -amiloide que induciría más apoptosis<sup>79,80</sup>.

En las formas no hereditarias de EA de presentación tardía hay varios factores que podrían facilitar la apoptosis. Así, la cantidad de proteína Bcl-2 neuronal disminuye con la edad y hay, también, una mayor entrada citoplásmica de iones de calcio que favorecerían la apoptosis<sup>75</sup>. Además, un 50% de EA tardía se da en portadores del alelo de apolipoproteína E $\epsilon$ 4 que incrementaría el riesgo de padecer la enfermedad<sup>77</sup>. Se encuentra en estudio el análisis de las mutaciones del gen de la proteína que aclararía el amiloide  $\beta$  de la vesícula sináptica. Se trata del gen de la  $\alpha$ 2 macroglobulina que está presente en el 20% de la población y que también actuaría como factor de riesgo<sup>77</sup>.

Hay otras enfermedades neurodegenerativas en las que la apoptosis parece ser importante<sup>66</sup>. La retinitis pigmentosa se debe a mutaciones en cualquiera de los tres genes de los fotorreceptores: rodopsina, periferina y subunidad  $\beta$  de CGMP, lo que motiva un aumento de apoptosis de las neuronas fotorreceptoras de la retina. El alcohol induce apoptosis neuronal que podría ser la causa de la encefalopatía de Wernicke y de la psicosis de Korsakoff. También en el síndrome fetal producido por el alcohol se ha demostrado apoptosis en la cresta neural. Enfermedades como la epilepsia, en apariencia alejadas del proceso de apoptosis, se han reproducido experimentalmente induciendo focos neuronales apoptóticos<sup>66</sup>. Otras enfermedades neurodegenerativas, como la atrofia muscular espinal, pueden deberse a mutaciones en los genes de las IAP<sup>16</sup>.

El conocimiento de los mecanismos de apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas abre nuevos horizontes al tratamiento de las mismas. Algunos son más inespecíficos, como la utilización de factores de crecimiento neurales o de nifedipino para bloquear la entrada de calcio. Otros tratarán de actuar de forma más selectiva mediante nucleótidos antisentido o inhibiendo la síntesis de PS-1 en la EA, lo que bloquearía la fragmentación de la PPA<sup>78</sup>. Terapias contra la apoptosis, como la manipulación de genes de la familia del Bcl-2 o el bloqueo de la actividad de las caspasas, podrían ser útiles al evitar la apoptosis y conservar la función de las neuronas bruscamente alteradas por un traumatismo craneoencefálico o una isquemia aguda<sup>80</sup>, pero en las enfermedades neurodegenerativas no supone inevitablemente una recuperación de la función, como se ha demostrado en la enfermedad de la neurona motora murina<sup>68</sup>. Por el contrario, la recuperación de la visión en la mosca *Drosophila*, con pérdida de visión secundaria a mutaciones en el gen de la rodopsina, mediante inhibidores de las caspasas abre el camino hacia el logro del binomio: inhibición de apoptosis-recuperación de función<sup>16</sup>. La apoptosis también es importante en las alteraciones neurológicas producidas por el VIH<sup>81</sup>.

### Enfermedades cardiovasculares<sup>82</sup>

Además de la importancia que puede tener la apoptosis en la embriogénesis cardíaca, se ha demostrado fundamental en el desarrollo del sistema de conducción que ya se ha formado en las primeras semanas de la gestación, pero que se

modula en el período posnatal inmediato<sup>3</sup>. En este momento, el nodo sinusal se organiza en pequeños grupos de células redondas P, interconectadas por células transicionales alargadas. El resto de miocitos circundantes a esos grupos sufre apoptosis y, como consecuencia, se acumula colágeno. En cuanto al nódulo AV, tiene abundantes células P al nacer pero casi desaparecen por apoptosis en el centro fibroso y quedan algunos grupos cerca del haz de His. Si el proceso de apoptosis se realiza más lentamente pueden originarse arritmias que se resuelven posteriormente. Si la apoptosis es defectuosa en estas zonas del sistema de conducción, se producen taquiarritmias por reentrada del estímulo, pero si es excesiva se producen bradiarritmias e incluso la muerte súbita cardíaca. También, en algunas arritmias y en el síndrome del QT largo hay apoptosis excesiva en el nodo o cerca del mismo<sup>66</sup>.

Se creía que la apoptosis no ocurría en células terminalmente diferenciadas como las cardíacas o las neuronas. Recientemente, se ha podido comprobar que puede inducirse la apoptosis por agentes considerados como productores de necrosis convencional<sup>66</sup>. Factores que producen necrosis a altas dosis, como hipoxia, isquemia, déficit nutricional o tóxicos, sólo producen apoptosis cuando actúan a dosis menores. Así, en la periferia de un infarto miocárdico agudo y en zonas algo alejadas, donde la isquemia ha sido menor, pueden observarse miocitos en apoptosis. Por otra parte, la reperusión del área isquémica se asocia a una elevación brusca de radicales libres y del calcio intracelular, que son potentes inductores de la apoptosis<sup>82</sup>.

En la displasia ventricular derecha arritmogénica se han descrito concentraciones elevadas de caspasa 3 y de apoptosis<sup>67,83</sup>. Esta pérdida miocelular por apoptosis podría ser secundaria a los episodios repetidos de isquemia y reperusión que se asocian a las arritmias<sup>82</sup>. La presencia de apoptosis extensa se correlaciona con la presencia de síntomas agudos y con la cronicidad del proceso.

Otro hecho importante en las enfermedades cardíacas es el conocido como fenómeno de Jano, por sus dos caras diferentes, que ocurre en la insuficiencia cardíaca<sup>83</sup>. Al principio, una insuficiencia cardíaca de diversos orígenes produce una hipertrofia compensadora. Esta situación no puede mantenerse indefinidamente y a la larga se promueve la apoptosis de los miocitos, quizás por los mismos factores (c-myc, c-fos y TGF- $\beta$ ) que al principio promueven la hipertrofia compensadora. En la insuficiencia cardíaca hay, por tanto, un aumento significativo de la apoptosis a pesar de que la concentración de proteína Bcl-2 está aumentada, pero no es suficiente para contrarrestar a las citocinas, los radicales libres y el propio estiramiento mecánico mantenidos<sup>67</sup>.

En los vasos sanguíneos, aparte de la importancia que pueda tener en el remodelamiento vascular la acción coordinada de proliferación y apoptosis, se han abierto caminos en el estudio de la aterosclerosis<sup>84</sup>. La formación de la placa de ateroma puede considerarse como un fenómeno inflamatorio que puede progresar o regresionar, y recuerda en parte la evolución de las heridas. Al principio hay predominio de la proliferación que incluye a los miofibroblastos. Después, las células inflamatorias y los miofibroblastos se eliminan por apoptosis y contribuyen a la regresión del tejido cicatrizal. Es posible que una apoptosis insuficiente y/o mal regulada en la zona del ateroma pueda contribuir a la progresión y gravedad de la enfermedad<sup>85</sup>. Además, el aumento de apoptosis de los macrófagos atrae a más macrófagos e incrementa las citocinas inflamatorias que inducen proliferación y migración celular. Esta apoptosis de los macrófagos está aumentada en la región del hombro de la placa de ate-

roma, lugar limítrofe con el vaso sano donde la placa se fragmenta más frecuentemente<sup>84</sup>. En ratas con aterosclerosis inducida se han demostrado grados diferentes de apoptosis según la región de la placa de ateroma, que varía desde el 10% en zonas de esclerosis al 40% en regiones ricas en macrófagos<sup>86</sup>. Las estatinas (fluvastatina, sinvastatina, pravastatina) inhiben la proliferación e inducen la apoptosis de los miofibroblastos presentes en la placa, por lo que pueden tener un papel en la prevención de la lesión inicial y de la reestenosis<sup>86</sup>.

En los órganos diana de la hipertensión arterial (HTA) también se han demostrado valores más elevados de apoptosis. La angiotensina II, en relación o sin ella con el TGF- $\beta$ , puede ser uno de los agentes responsables<sup>87</sup>. El tratamiento de la HTA con bloqueadores de los canales del calcio inhibiría la apoptosis al impedir el aumento intracelular de iones de calcio<sup>42</sup>.

### Enfermedades autoinmunes<sup>88</sup>

Las reacciones inmunes potencialmente perjudiciales al organismo pueden prevenirse por inactivación funcional o por apoptosis de los linfocitos implicados. En el timo se produce una presentación selectiva de los antígenos a los linfocitos T inmaduros y quedan eliminados por apoptosis aquellos que son autorreactivos. Por otra parte, los linfocitos B de los centros germinales del ganglio sufren, tras el contacto con el antígeno, una mutación somática de los genes de las inmunoglobulinas. Esta interacción entre las inmunoglobulinas de superficie y el antígeno es necesaria para suprimir la apoptosis y permite a los linfocitos B con inmunoglobulinas de superficie de alta afinidad sobrevivir selectivamente y diferenciarse<sup>50</sup>. Aquellos que reaccionan frente a autoantígenos son eliminados por linfocitos T CD4 mediante apoptosis inducida a través de la vía FasL/Fas<sup>89</sup>.

Cabe destacar que los medicamentos utilizados en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, como glucocorticoides o ciclofosfamida, inducen la apoptosis de los linfocitos<sup>66</sup>. En ratas con hepatitis autoinmune se ha intentado eliminar la apoptosis de los hepatocitos introduciéndoles Bcl-2 transgénico o inhibiendo la cascada de las caspasas<sup>65</sup>.

En la diabetes autoinmune experimental se produce al principio una infiltración de los islotes de Langerhans por leucocitos, y posteriormente linfocitos T autorreactivos destruirán las células de los islotes. En ratones, el rechazo del injerto pancreático puede prevenirse en algunos casos si se cotrasplantan miofibroblastos a los que se les ha hecho expresar FasL, dotándoles así de privilegio inmune (inducirían apoptosis de los linfocitos T que expresen Fas). Sin embargo, los linfocitos T pueden inducir la aparición de Fas en la superficie de los miofibroblastos, lo que motiva que se eliminen entre sí al reaccionar el Fas inducido con el FasL expresado<sup>3,68</sup>. El tiroides es uno de los órganos endocrinos en donde más se ha estudiado la importancia de la apoptosis en las enfermedades autoinmunes. En la enfermedad de Graves los fibroblastos intratiroides actúan como potentes inhibidores de los linfocitos B del órgano, los cuales prolongan así su vida y la producción de inmunoglobulinas estimuladoras<sup>65</sup>. En la enfermedad de Hashimoto es posible que el exceso de apoptosis de los tirocitos se produzca por más de una vía<sup>3,65,67,90</sup>. El aumento en el tiroides de IL-1 $\beta$ , producida tras una infección u otra agresión, induce la expresión de Fas en algunos tirocitos que transmiten la señal de apoptosis a sus células vecinas mediante la interacción con el FasL ya presente en sus membranas<sup>65,91</sup>. Los linfocitos T CD8 podrían participar en la patogenia pero son muy pocos los que tie-

nen perforina y, además, la cantidad de linfocitos infiltrantes que tienen FasL es muy escasa en relación con la de tirocitos que la poseen<sup>91</sup>. Sin embargo, es posible que el grado de expresión de Fas sobre las células diana pueda determinar la sensibilidad a la apoptosis por los linfocitos T en ausencia de perforina o granzima B<sup>90,91</sup>.

Cheng et al<sup>92</sup> describieron en el lupus eritematoso sistémico (LES) humano un incremento de Fas soluble en el plasma, que interaccionaría con el FasL e inhibiría la apoptosis interlinfocitaria. Estos hallazgos no se han comprobado posteriormente, aunque parece existir un aumento de Bcl-2 en los linfocitos T autorreactivos<sup>66</sup>. Además, en el LES es habitual una linfopenia y, en estudios *in vitro*, parece existir una apoptosis excesiva de los linfocitos mediada por Fas<sup>93,94</sup>. En la nefritis del LES hay evidencia de un aumento de la apoptosis glomerular que varía según el tipo de glomerulonefritis producida. Este aumento de apoptosis podría deberse, al menos en parte, al óxido nítrico que se induce por el aumento de IF- $\gamma$ , la IL-1 y el TNF-1<sup>95</sup>. En el LES un grupo de autoanticuerpos anti-ADN se unirían al receptor de la miosina 1, la cual les transporta hasta el núcleo para que puedan unirse a sus antígenos, como los de histona-ADN nucleosómico producido durante la apoptosis<sup>94</sup>. Además, la miosina 1 en el citoplasma formaría un complejo con la calmodulina y la ADNasa implicadas en la apoptosis<sup>96</sup>. Por último, las proteínas dañadas durante la apoptosis podrían dejar al descubierto epitopos antigénicos ocultos<sup>94</sup>.

En el síndrome de Sjögren se ha detectado una mayor tendencia a la apoptosis de los linfocitos T CD8, mientras que en la esclerodermia hay una disminución de la apoptosis de los miofibroblastos<sup>93</sup>. También hay una apoptosis deficitaria, en este caso en los sinoviocitos, en la artritis reumatoide, la artritis psoriásica y la asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>93</sup>.

### Enfermedades neoplásicas. Quimiorresistencia

El crecimiento tumoral está determinado por tres factores principales: a) la duración del ciclo celular; b) el porcentaje de células proliferantes, y c) el porcentaje de pérdida celular. Además, hay una amplia relación entre la proliferación y la apoptosis. Tumores con un crecimiento rápido suelen tener más apoptosis. El índice de renovación (mitosis + apoptosis en 10 campos de gran aumento) parece útil en el análisis de los linfomas y, en relación con los estadios de Gleason, en el carcinoma prostático<sup>2</sup>.

La carcinogénesis ofrece un claro ejemplo de cómo la célula puede escapar del control de la regulación fisiológica de la apoptosis, al alterar o aumentar la producción de factores que favorecen su supervivencia. Hay tumores que se asocian característicamente a una apoptosis disminuida y en los que se conoce el factor favorecedor<sup>2</sup>. Es el caso del linfoma folicular y el gen *Bcl-2*, la leucemia mieloide crónica y la proteína de fusión bcr-abl, o el condrosarcoma bien diferenciado y las abl quinasas<sup>54,91</sup>. Tumores con un índice de apoptosis bajo, como el melanoma en fase inicial o el carcinoma *in situ* de mama, se comportan agresivamente cuando pierden el control, por mutaciones, de la proteína Bcl-2 o de la proteína p53<sup>2</sup>. El carcinoma de colon tiene peor pronóstico y se hace resistente a la quimioterapia cuando sobreexpresa Bcl-2<sup>66</sup>. La sobreexpresión de Bcl-2 en algunos tumores, como el carcinoma de colon, el de próstata o el neuroblastoma, no significa que haya una translocación como la existente en el linfoma folicular<sup>6</sup>.

Los tumores tienen múltiples mecanismos para poder escapar de la apoptosis. Un ejemplo típico de independencia de las células neoplásicas a los factores tróficos lo tenemos en

el carcinoma de próstata. La castración en ratas macho produce en una semana la pérdida por apoptosis del 70% de las células epiteliales al desaparecer los andrógenos que las mantenían. En el hombre la dependencia del carcinoma de próstata a la testosterona se mantiene en el carcinoma localizado y en las metástasis, pero a la larga alcanza un estado de insensibilidad al tratamiento antiandrogénico al seleccionarse una clona celular insensible que sobreexpresa *Bcl-2*. Se conserva, sin embargo, la sensibilidad al 5-fluoracilo y a la trifluorotimidina, lo que sugiere la activación de la apoptosis por otra vía diferente<sup>97</sup>.

En la línea celular de melanoma metastásico o en el hepatocarcinoma, una disminución en la célula neoplásica de la expresión de Fas o un incremento en la del FasL produce la destrucción por apoptosis de los linfocitos T defensores del organismo<sup>3,67,98</sup>.

En algún caso un virus interviene en la patogenia de la neoplasia y puede producir sustancias que bloqueen la apoptosis. Un ejemplo es la proteína BHRF1 producida por el virus de Epstein-Barr que puede ejercer una acción parecida a la de la Bcl-2 en los linfocitos B infectados<sup>99</sup>.

Neoplasias con mutaciones en el gen *p53* o en sus reguladores disminuyen su apoptosis al no activarse la cascada de las caspasas<sup>3</sup>; por ejemplo, en la leucemia linfoblástica infantil, una sobreexpresión de *mdm2* produce degradación de la *p53* y, por tanto, una mayor resistencia al tratamiento. Incluso el medio extracelular puede influir en el proceso de contención de las neoplasias. En la matriz extracelular hay sustancias que intervienen en la angiogénesis<sup>98,100</sup>, y entre las proteínas supresoras de la angiogénesis cabe destacar la glucoproteína de la matriz, trombospodina-1 (TSP-1). En condiciones fisiológicas los fibroblastos y, probablemente, otras células segregan TSP-1. Si las células neoplásicas inducen la apoptosis de los fibroblastos, deja de producirse este factor y, por tanto, la angiogénesis se incrementaría. También las células de un órgano podrían expresar FasL ante la llegada de células tumorales, las cuales podrán ser eliminadas si expresan Fas<sup>59</sup>.

La survivina, una IAP estabilizadora de los microtúbulos que inhibe la apoptosis, está aumentada en la mayoría de los tumores (estómago, colon, pulmón, neuroblastoma) excepto en los linfomas no hodgkinianos de bajo grado. La survivina, al prolongar la vida de la célula neoplásica, facilita su inestabilidad genómica y con ella la progresión de la neoplasia<sup>16</sup>. En el neuroblastoma se ha descrito una correlación entre la presencia de survivina y un peor grado histológico y un estadio avanzado. Además, la survivina inhibe la apoptosis inducida por el taxol, un conocido tóxico de los microtúbulos<sup>63</sup>.

La quimioterapia y la radioterapia han logrado resultados contundentes en muchas enfermedades hematológicas malignas y en algunos tumores sólidos, como los tumores germinales y algunos tumores infantiles. La mayoría de los agentes quimioterápicos utilizados en la eliminación de las células actúan, *in vivo* e *in vitro*, mediante la inducción de apoptosis<sup>54,101</sup>. Es probable que cada agente quimioterápico ejerza su efecto alterando la función o lesionando una diana específica en el mecanismo de la apoptosis. Así, el etopósido activa una proteína específica (CPP-32/Price) que precede a la activación de la endonucleasa. Estos hallazgos deberían permitir delimitar nuevos agentes y una mayor especificidad en los tratamientos de los tumores. Un camino prometedor es el de la monitorización *in vivo* de la apoptosis inducida por quimioterápicos en modelos tumorales animales a los que se han producido genéticamente alteraciones del programa de apoptosis<sup>54</sup>.

La célula neoplásica puede desarrollar defectos de regulación de los genes que controlan la apoptosis, lo que produce resistencia a múltiples fármacos<sup>54,102</sup>. En la leucemia

mieloide crónica, la proteína de fusión bcr-abl confiere resistencia a la apoptosis que debiera producirse tras la retirada de factores de crecimiento. En los carcinomas de vejiga, mama y colon se ha descrito una mínima expresión de gel-solina, que dificultaría la ejecución de la apoptosis posquimioterapia<sup>51</sup>. Una hipótesis, que permitiría agrupar los diversos agentes utilizados, consiste en clasificarlos según sus supuestas acciones: a) por lesión o alteración de una diana específica, como los microtúbulos o el ADN; b) por alteración de la transducción de la señal producida. Así, la doxorubicina sobrerregula el FasL<sup>54</sup>, y c) por inducción de la maquinaria ejecutora de la apoptosis, como la radiación  $\gamma$  que induce la formación de Bax<sup>103</sup> o el paclitaxel y la vincristina que hiperfosforilan la Bcl-2 e inhiben su capacidad para heterodimerizarse con el Bax<sup>54</sup>. Los fármacos que alteran la síntesis de ADN inducen una apoptosis inmediata, mientras que el resto la produce de forma retardada. También influye en la rapidez de la apoptosis la dosis del fármaco, lo que justifica las estrategias con altas dosis que evitarían las resistencias<sup>54</sup>.

Por tanto, observamos que los medicamentos citotóxicos lesionan las células tumorales por una variedad de mecanismos (rotura o alquilación del ADN, alteración de microtúbulos o inhibición de nucleótidos precursores)<sup>101</sup>, y todos ellos se traducen en la producción de apoptosis<sup>104</sup>. Aunque se conocen otros mecanismos de resistencia a la quimioterapia, como la sobreexpresión del gen *MDR-1* o la pérdida de receptores para glucocorticoides<sup>104</sup>, estos nuevos datos orientan hacia el descubrimiento de estrategias que dificulten la inhibición de la apoptosis para mejorar la quimiosensibilidad. Es posible que la presencia de factores de supervivencia autocrinos o paracrinos, presentes en un microambiente celular, afecten a la efectividad de los citostáticos<sup>54</sup>. Recientemente, Pitti et al<sup>30</sup> han descrito un nuevo mecanismo, desarrollado por las células neoplásicas en tumores de pulmón y colon, que permite escapar al tumor de la apoptosis. Consiste en la producción del receptor soluble DcR3 (*decoy receptor 3*) que se une al FasL e inhibe así la apoptosis inducida por la vía Fas. Esta inhibición de la apoptosis, al igual que la lograda por sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL, crea un ambiente celular que permite nuevas mutaciones y otras alteraciones cromosómicas, algunas de ellas encaminadas a desarrollar otros mecanismos de resistencia a drogas<sup>53</sup>.

Aunque tumores característicamente quimiosensibles, como las leucemias agudas, los tumores germinales o el carcinoma pulmonar de célula pequeña, tienen muy diferentes índices de apoptosis, no hay duda de que una mayor resistencia a la apoptosis debe dificultar la acción de los agentes quimioterápicos o de la radioterapia<sup>103</sup>.

### Trasplante de órganos<sup>105</sup>

Los linfocitos necesitan para ejercer su función de las correspondientes células presentadoras de antígeno (CPA) que informan a sus receptores de membrana a través de los HLA I y II. Las moléculas HLA transportan hasta la membrana de la CPA fragmentos de péptidos extracelulares o sintetizados endógenamente, no distinguiendo entre antígenos propios o extraños. Se unen a cualquier péptido que encaje en su receptor. Por eso debe haber mecanismos que eviten el reconocimiento de péptidos propios por los linfocitos<sup>105</sup>. El más importante ya se ha comentado y consiste en la delección apoptótica de linfocitos T, que están desarrollándose en el timo, o de linfocitos B de los centros germinales ganglionares, que lleven receptores de afinidad para péptidos derivados de autoproteínas<sup>50</sup>. Otro mecanismo es expresar constitutivamente FasL, como lo hacen las células de Serto-

li, el epitelio corneal, el iris y la retina<sup>3</sup>. La posesión de FasL les confiere un privilegio inmune ya que son capaces de destruir por apoptosis a linfocitos T que expresen Fas en su membrana. En el caso del sistema nervioso central ese privilegio inmunológico probablemente se deba a la existencia de la barrera hematoencefálica<sup>89</sup>. Con estas premisas puede considerarse el rechazo como un fenómeno fisiológico en el que se activan los linfocitos T y B. Lo que los linfocitos T activados del huésped producen en el órgano trasplantado es, por tanto, una apoptosis<sup>106</sup> que entra totalmente dentro de la fisiología del sistema inmune<sup>107</sup>. Los fármacos que promueven la apoptosis de los linfocitos T periféricos podrían amplificar el efecto de los inmunodepresores convencionales<sup>108</sup>. Un producto nuevo, disponible para su utilización en el rechazo agudo resistente al tratamiento, es el IPS-1. Se trata de un extracto purificado de cultivos del hongo *Isaria sinclairii* y químicamente modificado a FTY 720. Su efecto se prolonga durante un par de semanas en las que disminuyen de forma importante los linfocitos T periféricos y se potencia la acción de la ciclosporina<sup>109</sup>. Otras experiencias para inhibir el rechazo intentan introducir, junto al órgano trasplantado, células tratadas para que expresen FasL y se comporten frente a los linfocitos T portadores de Fas igual que las citadas en el privilegio inmune.

### Órganos hematopoyéticos

La apoptosis no es sólo un destino para células diferenciadas, terminales o lesionadas. También se utiliza para regular el número de células en distintos estadios evolutivos, desde las *stem cell* hasta las células maduras. La hematopoyesis es un caso típico de este aserto, que cuando se altera puede producir enfermedades como los síndromes mielodisplásicos. En ellos, aunque hay un incremento de la proliferación, el 75% de las células precursoras sufren apoptosis en estadios madurativos precoces<sup>73,109</sup>. Otros autores<sup>110</sup> detectan apoptosis en un número bastante menor de casos y aconsejan seguir estudiando su relación con las citopenias. Otro ejemplo es la anemia aplásica, en la que los linfocitos T segregan IF  $\gamma$  que induce apoptosis en las células precursoras CD 34. En la anemia por déficit de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, la ingestión de determinadas sustancias, como los antimaláricos, genera un exceso de radicales libres en los hematíes que al sufrir una apoptosis generalizada producen las crisis hemolíticas típicas de esta enfermedad<sup>66</sup>.

La importancia clínica de las leucemias y linfomas ha motivado un mayor número de estudios y conocimientos sobre la apoptosis en estas enfermedades. Las alteraciones en el gen o en la expresión de Bcl-2 son las que cuentan con más aportaciones en la bibliografía. Es clásico considerar la translocación recíproca t(14;18) (q32;q31) en la patogenia del linfoma folicular, en el que el incremento de Bcl-2 disminuye la apoptosis de las células neoplásicas. Entre los linfomas no hodgkinianos la expresión de Bcl-2 y Bax es diferente entre los tipos indolentes y más agresivos<sup>34</sup>. Sin embargo, hay linfomas que sobreexpresan Bcl-2 y sufren apoptosis, lo que indica que debe haber otros mecanismos de apoptosis que utilizan una vía diferente de la del Bcl-2<sup>53,111</sup>. En los linfomas foliculares la elevación de la Bcl-2 junto a la ausencia de la caspasa 3 justificaría la pobre respuesta a la quimioterapia<sup>112</sup>.

La translocación recíproca t(9;22) (q34;q11), que produce el cromosoma Filadelfia, codifica la proteína quimérica por fusión bcr-abl, que interviene en la patogenia de la leucemia mieloide crónica y, posiblemente, le proporciona resistencia al tratamiento al dificultar la apoptosis de la célula

la neoplásica<sup>109</sup>. La sobreexpresión de Bcl-2 se ha correlacionado con la resistencia a la remisión completa en la leucemia mieloide aguda. En la leucemia linfoblástica infantil también está incrementada la Bcl-2. Un aumento relativo del cociente Bcl-2:Bax se correlaciona *in vitro* con la quimiorresistencia y la disminución de la supervivencia en la leucemia linfática crónica<sup>104</sup>. En el linfoma difuso B de célula grande el aumento de Bcl-2 se asocia a un estadio avanzado y a una disminución de la supervivencia<sup>113</sup>. La lenta acumulación en los linfomas del tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) de bajo grado puede resultar parcialmente de una prolongación de la vida de los linfocitos neoplásicos debido al bloqueo de la apoptosis mediada por Bcl-2<sup>114</sup>.

Una mutación en línea germinal del gen *Fas* impide la transducción adecuada de la señal de apoptosis al alterarse la región citoplásmica del receptor Fas. Esto produce un síndrome linfoproliferativo pediátrico conocido como síndrome de Canale-Smith, en el que se acumulan en los ganglios linfocitos T inmaduros (CD4 y CD8 negativos) y hay hipergammaglobulinemia con fenómenos autoinmunes que causan anemia hemolítica, neutropenia, trombocitopenia y glomerulonefritis. Los pacientes que alcanzan la edad adulta tienen una mayor incidencia de neoplasias sólidas<sup>3,59,115</sup>. En otra enfermedad que simula un síndrome proliferativo autoinmune, la leucemia crónica de linfocitos granulares, caracterizada por la proliferación de linfocitos T CD8 activados y algunos signos sugerentes de autoinmunidad, se han descrito valores elevados de CD95 sin mutaciones. Esto sugeriría un defecto en la vía apoptótica del CD95<sup>11</sup>.

La variabilidad de la expresión de Fas en las neoplasias hematológicas no se ha examinado en profundidad, aunque las delecciones y reordenamientos del gen que lo codifica son importantes en el linfoma de Hodgkin y en los linfomas no hodgkinianos<sup>34,112,116,117</sup>, sobre todo los de tipo MALT<sup>115,118</sup>. En la enfermedad de Hodgkin clásica hay una elevación de la expresión de la caspasa 3, lo cual no ocurre en el tipo predominio linfocítico nodular<sup>112</sup>. En la leucemia mieloide aguda hay dos grupos, uno en el que, igual que ocurre fisiológicamente, la célula neoplásica sufre apoptosis al ser privada de los factores de crecimiento hematopoyéticos, mientras que en el otro no ocurre. Esto confiere a este último grupo un peor pronóstico y una resistencia a la quimioterapia<sup>109,113</sup>.

En las enfermedades hematológicas malignas son menos frecuentes las mutaciones del gen *p53* que en los tumores sólidos, pero su presencia se asocia a progresión de la enfermedad, a un peor pronóstico y a una resistencia al tratamiento. Por ejemplo, la adquisición de la mutación *p53* se asocia a la progresión del linfoma folicular a linfoma difuso de célula grande, a crisis blástica en la leucemia mieloide crónica, a desarrollo de leucemia mieloide aguda en los síndromes mielodisplásicos y a mayor recurrencia de la leucemia linfoblástica T<sup>113</sup>.

Como puede observarse, la demostración de una alteración de la apoptosis en las enfermedades hematológicas malignas puede mejorar la precisión diagnóstica e identificar grupos que debieran tratarse de forma más agresiva y, probablemente, con nuevas estrategias<sup>119</sup>.

### Enfermedades virales

En general, los virus tienden a disminuir la apoptosis de las células infectadas, que los linfocitos T citotóxicos pretenden eliminar mediante la transferencia de gránulos de perforina y granzima B o con señales a través de receptores de la familia del TNF<sup>109</sup>.



Para inhibir la apoptosis, los virus actúan fundamentalmente a tres niveles: el de la proteína Bcl-2, el de las caspasas o sobre la p53. Así, el adenovirus, el virus de la fiebre aftosa y el virus de Epstein-Barr producen sustancias semejantes a la Bcl-2: E1B, LMWS-HL y BHRF-1, respectivamente. La capacidad transformadora de los linfocitos B por el EBV podría deberse a la proteína LMP-1 que activaría el NF- $\kappa$ B. Este factor de transcripción genera factores provida y es capaz de inhibir la apoptosis por aumento de HIAP-1<sup>63</sup>. Los poxvirus y baculovirus tratan de inhibir el ICE con la Crm A y la p35<sup>66,97</sup>, mientras que la proteína E6 del virus de papiloma humano y la 40 Tag del virus simio inactiva la p53<sup>103</sup>.

Por el contrario, el virus de la inmunodeficiencia humana produce un exceso de apoptosis en los linfocitos T CD4 al sobreregular la expresión de Fas<sup>66,120</sup>, aunque no ha podido demostrarse *in vitro* que la vía para la apoptosis sea la interrelación Fas-FasL<sup>121</sup>. Otros autores<sup>122</sup> encuentran una activación del ICE como favorecedor de la muerte celular.

Los linfomas que se producen en los enfermos con infección por el VIH, a semejanza de aquellos que surgen en pacientes sin inmunodepresión, presentan expresión de proteínas inhibitoras de la apoptosis. La proteína Bcl-2 y la Bcl-xL se encuentran en el 42 y el 66% de los linfomas no Hodgkinianos presentes en el sida. Además, en los linfomas no Hodgkinianos de los enfermos con infección por el VIH, la presencia del virus de Epstein-Barr en las células neoplásicas se correlaciona fuertemente con la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL<sup>110</sup>, probablemente a través de la proteína LMP-1 del virus<sup>103</sup>. Por otro lado, la proteína Tat de enfermos VIH positivos tiene secuencias RGD, semejantes a las existentes en la matriz extracelular, que podrían ser activadoras de las caspasas<sup>40</sup>.

En el sistema nervioso central las principales células diana del VIH son los macrófagos y la microglía. Las neuronas no se infectan, lo que indicaría la existencia de un mecanismo indirecto de lesión neuronal que induciría la apoptosis posiblemente por factores solubles<sup>123</sup>.

## Riñón

El índice apoptótico en el riñón normal del adulto es relativamente bajo<sup>124</sup>, y se tiene poca información sobre la apoptosis en condiciones fisiológicas. Se cree que algunas alteraciones que se producen durante el desarrollo, como el riñón poliquistico, pueden deberse a una anomalía de la apoptosis de la nefrona durante la diferenciación del metanefros<sup>66</sup>. La isquemia y las sustancias tóxicas pueden producir apoptosis en los túbulos renales, al igual que pueden lesionarse en el rechazo crónico<sup>107</sup>. En el glomérulo la apoptosis parece importante para disminuir la celularidad, tanto inflamatoria como mesangial, y reparar las lesiones previas de las glomerulonefritis<sup>10,95,125</sup>. También parece importante en la producción de fibrosis intersticial<sup>126</sup> y en la carcinogénesis renal<sup>127</sup>. En la nefritis lúpica la miosina 1 podría internalizar determinados anticuerpos anti-ADN y transportarlos hasta el núcleo<sup>96</sup> (v. «Enfermedades autoinmunes»).

## Aparato digestivo

En el hígado, las sales biliares y el alcohol inducen apoptosis hepatocitaria por mecanismos no bien conocidos<sup>66</sup>. En las hepatitis virales se produce una expresión aberrante de Fas que conduce a la apoptosis hepatocitaria<sup>128</sup>, mientras que una mutación del gen *p53* por la aflatoxina B disminuye la apoptosis e interviene en la patogenia del hepatocarcinoma<sup>129</sup>. En enfermedades autoinmunes como la colangitis esclerosante primaria y la cirrosis biliar primaria, se sobre-

expresa Fas y la acción de los linfocitos T CD8 parece ser importante en su patogenia<sup>129</sup>.

En el páncreas la apoptosis parece tener un papel destacado en la evolución de la pancreatitis alcohólica y en la atrofia postobstructiva<sup>24,40</sup>.

En el estómago, en las úlceras asociadas al alcohol, a los antiinflamatorios no esteroideos y a *Helicobacter pylori*, la apoptosis del epitelio gástrico podría ser fundamental<sup>66,129</sup>.

## Sistema osteoarticular<sup>130</sup>

La dureza de la estructura ósea es una barrera determinante para el estudio de la apoptosis en este tejido. Fisiológicamente, la apoptosis de los condrocitos hipertróficos de la placa de crecimiento es esencial como favorecedora de su osificación posterior. Una disminución de la apoptosis condrocitaria se asocia a la acondroplasia<sup>130</sup>.

En el proceso de apoptosis, la célula ósea mejor estudiada es el osteoclasto<sup>130</sup>. La duración de la reabsorción del hueso promovida por los osteoclastos puede variar por la acción de mediadores solubles que causarían su apoptosis y frenarían así su acción. El osteoclasto en apoptosis se reconoce fácilmente porque mantiene la expresión de fosfatasa resistente al tartrato. Los estrógenos pueden promover la apoptosis de los osteoclastos probablemente a través del TGF- $\beta$ . En la menopausia, al disminuir las concentraciones de estrógenos, disminuye la apoptosis osteoclástica y se produce fácilmente osteoporosis. Enfermedades que cursan con un aumento de reabsorción ósea, como la enfermedad de Paget el hiperparatiroidismo y la hipercalcemia tumoral, pueden beneficiarse de sustancias como los bifosfonatos que inducen apoptosis en los osteoclastos.

## Aparato respiratorio

El pulmón es un órgano que alcanza la maduración al final de la gestación y que debe sufrir una evolución rápida tras el nacimiento para adaptarse a la nueva función respiratoria. En concordancia con esto, estudios *in vivo* e *in vitro* en ratas<sup>131</sup> han demostrado que el mesénquima y el epitelio pulmonar sufren apoptosis tardía durante su desarrollo fetal. Durante el primer día de vida posnatal el número de células en apoptosis se multiplica por 14 y disminuye rápidamente hasta valores anteparto durante la primera semana después del nacimiento. La apoptosis afecta principalmente, tanto en la rata como en la especie humana, a las células intersticiales de los septos alveolares<sup>132</sup>.

En el epitelio bronquial de la rata se localiza FasL en las células de Clara. Su presencia disminuye durante los procesos alérgicos que afectan a la vía aérea, lo que sugiere que puede ser un factor a tener en cuenta como controlador de la actividad inmunológica en esta zona<sup>133</sup>. La apoptosis en el alvéolo se ha estudiado en algunas infecciones y en la neumonosis. Tanto en ratas como en humanos, se ha demostrado que el asbesto y el polvo de sílice inducen apoptosis en las células alveolares y en las que conforman los nódulos fibrohistiocitarios. La cantidad de apoptosis está en relación directa con la dosis<sup>134</sup> y puede ser un factor importante en la regulación de los cambios inflamatorios<sup>135</sup>. También el bacilo tuberculoso promueve la apoptosis de los macrófagos alveolares y es más extensa en los granulomas caseificantes<sup>136</sup>.

En el carcinoma pulmonar de célula pequeña puede existir una sobreexpresión de proteína Bcl-2 que se asocia con una resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia. Esta resistencia puede disminuirse mediante la utilización de oligonucleótidos antisentido con diana en el gen *Bcl-2*<sup>137</sup>. En

el carcinoma pulmonar de célula no pequeña la positividad de las células tumorales para Bcl-2 y p53 no se correlaciona con el índice apoptótico<sup>138</sup>. La cantidad de apoptosis tampoco se correlaciona con el pronóstico<sup>139</sup>, ni hay datos definitivos de que la positividad para Bcl-2 confiera un mejor pronóstico en el carcinoma epidermoide<sup>140</sup> o en el carcinoma de célula no pequeña en general<sup>141</sup>. Un aumento progresivo de la actividad apoptótica y de la proliferación del epitelio bronquial se ha descrito en la secuencia de metaplasia-displasia-carcinoma<sup>142</sup>.

### Piel<sup>143</sup>

Los melanocitos localizados en la piel deben emigrar durante el desarrollo embriológico desde la cresta neural hasta la epidermis y dependen de factores, parecidos a los neutrófilos, para su supervivencia y evitar así la apoptosis. Al igual que las neuronas, los melanocitos sobreexpresan Bcl-2, lo que les protege de la apoptosis inducida por la radiación UV. Una apoptosis fisiológica es evidente durante la maduración epidérmica, al igual que durante las fases cíclicas del folículo piloso. Diferentes formas de alopecia muestran alteraciones importantes de la apoptosis<sup>144</sup>; así, por ejemplo, la causada por los citostáticos que inducen prematuramente la fase de catágeno.

En enfermedades cutáneas de diverso tipo que cursan con reacciones liquenoides, se ha sugerido que el abundante infiltrado linfocitario podría inducir apoptosis a las células basales de la epidermis<sup>145</sup>. Los llamados cuerpos de Civatte y cuerpos coloides no son más que ejemplos morfológicos de apoptosis y no el resultado de una queratinización alterada. La apoptosis de los queratinocitos basales en el liquen plano probablemente esté inducida por linfocitos T CD8<sup>145</sup>. En el lupus eritematoso la radiación UV-B hace que los queratinocitos transporten hasta su membrana autoantígenos (Ro, La) y, durante la apoptosis, se acumulan en las pequeñas yemas que se forman en la membrana celular, lo que facilitaría la respuesta autoinmune<sup>146</sup>. También en la dermatomiositis se ha descrito un aumento de apoptosis en los queratinocitos basales por la acción de las radiaciones UV-B<sup>147</sup>. La buena respuesta obtenida con PUVA en las enfermedades con infiltrados ricos en linfocitos T como la psoriasis o el linfoma T cutáneo<sup>148</sup> se debe, no sólo a la apoptosis inducida en esos linfocitos, sino en gran medida a que los queratinocitos disminuyen su producción de IL-7. Esta citocina es esencial para mantener la respuesta linfocitaria T<sup>149</sup>.

Una disminución de la apoptosis de los fibroblastos dérmicos se ha observado en la esclerodermia<sup>150</sup> y en los queloides<sup>66</sup>. Las células del melanoma expresan FasL, lo que produce apoptosis de los linfocitos T portadores constitucionalmente de Fas<sup>98</sup>.

### Miscelánea

Algunas toxicidades producidas por medicamentos podrían deberse a que inducen apoptosis. Un ejemplo es la producida por los aminoglucósidos en el epitelio vestibular<sup>66</sup>. En la rotura prematura de las membranas fetales también está implicada en cierta medida la apoptosis aumentada del amnios<sup>151</sup>.

### Orientaciones terapéuticas futuras en enfermedades con alteraciones de la apoptosis

Se han comentado algunas sustancias, como los antagonistas del calcio o los bifosfonatos, que se vienen usando en enfermedades con apoptosis alterada. Enfermedades en

las que el tratamiento quirúrgico es importante en algún momento de su evolución podrían cambiar drásticamente su terapéutica. La hiperplasia nodular prostática puede beneficiarse de la apoptosis que induce el finasteride en el epitelio glandular, mientras el sulindac restaura o promueve la apoptosis en los adenomas de la poliposis familiar del colon y puede inducir su regresión<sup>129,152</sup>. La acción terapéutica del trióxido de arsénico en la leucemia aguda promielocítica se ejerce a través de la apoptosis de las células neoplásicas<sup>119</sup>.

En general, las nuevas terapias frente a las enfermedades con alteraciones importantes de la apoptosis pueden englobarse en tres categorías<sup>65</sup>. En la primera se incluirían las terapias génicas<sup>153</sup>. Con ellas se podría restaurar un gen *p53* alterado mediante otro normal encapsulado en liposomas y, así, hacer de nuevo quimiosensible una determinada neoplasia<sup>3,54,66</sup>. También se podría aprovechar la presencia de ese gen *p53* defectuoso para introducir adenovirus que sólo se repliquen en células que tienen esa alteración, concretamente las neoplásicas<sup>101,154</sup>. Una transferencia del alelo mutado de la *p53*, del gen *Bcl-2* o del gen de resistencia a drogas (*MDR1*) a *stem cell* hematopoyéticas les induciría resistencia a la quimioterapia y, por tanto, ventaja sobre las células neoplásicas<sup>54</sup>.

En la segunda categoría se incluirían las moléculas con diana en la modulación inicial (FasL) o tardía de la apoptosis. Se podrían utilizar inhibidores de las caspasas, como la CrmA del virus de la varicela, o proteínas sin relación con virus y homólogos a la caspasa 8, pero sin su función<sup>62</sup>. Los efectos apoptóticos obtenidos en los linfomas de linfocitos B con el anticuerpo anti-CD20 parecen deberse a las alteraciones que se producen en la concentración de los iones de calcio que inducirían apoptosis<sup>155</sup>. En otras ocasiones se pueden utilizar factores de crecimiento específicos<sup>3,109</sup> o eliminarlos, como se hace al usar sustancias antiestrogénicas o antiandrogénicas<sup>6</sup>. En la última categoría se incluirían las moléculas capaces de actuar sobre los genes que regulan la apoptosis<sup>3,53,62,104</sup>. Por ejemplo, se puede modular la relación Bcl-2:Bax<sup>65</sup>, fosforilizar la Bcl-2 para inhibir su acción o utilizar oligonucleótidos antisentido frente al gen *Bcl-2*, como se ha intentado en los cuadros neurodegenerativos asociados al alcoholismo<sup>66</sup> y en el carcinoma pulmonar de célula pequeña<sup>137</sup>.

En una misma enfermedad se podría utilizar más de una estrategia. Así, en el sida podríamos utilizar ciclosporina muy precozmente para inducir apoptosis de los linfocitos T CD4 infectados o inhibir su apoptosis, en fases muy avanzadas, con la levocartinina o el ácido aurtinricarboxilo que bloquearía las proteasas virales<sup>66</sup>.

Sin embargo, la utilidad real de todas estas terapéuticas está por demostrar, ya que salvar una célula de la apoptosis no quiere decir que se haya preservado su función<sup>68</sup>.

### Consideraciones finales

En resumen, existe un tipo de necrosis celular fisiológica, la apoptosis, que permite la homeostasis de los tejidos. Al principio conocíamos tan sólo su morfología pero en los últimos años se han ido desvelando sus mecanismos de producción y de regulación, así como la manera de detectarlos. Cada vez conocemos mejor las relaciones entre apoptosis y enfermedad, aunque desconocemos en gran medida la importancia de la misma en la mayoría de los procesos patológicos. Enfermedades tan frecuentes como la neurodegenerativa o las autoinmunes conllevan una importante alteración de la apoptosis en su fisiopatología, lo que nos permite ser optimistas en la búsqueda de nuevos fármacos que ayuden a

regular la necrosis celular que dejó de ser fisiológica. El reconocimiento de que la mayoría de los agentes antineoplásicos actúan induciendo apoptosis en las células tumorales abre nuevos horizontes para el desarrollo de productos más resolutivos en el control del cáncer.

# Agradecimiento

Este artículo no hubiese sido posible sin el apoyo, ayuda y comprensión de Nadia Álvaro. Toda mi gratitud por ello. Gracias, también, al Dr. Josep M.<sup>a</sup> Ribera por sus consejos y por las múltiples revisiones del manuscrito.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995; 146: 16-19.
- Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis. Basic concepts and potential significance on human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 310-319.
- Hetts SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354.
- Boswan FJ, Vissner BC, Deveren J. Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract* 1996; 192: 676-683.
- Farber E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* 1994; 7: 605-609.
- Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Pathol* 1997; 21: 88-101.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implantation in tissu kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Davill J. Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 12-21.
- Salomon RN, Diaz-Cano S. Introduction to apoptosis. *Diag Mol Pathol* 1995; 5: 235-238.
- Driscoll M. Cell death in *C. Elegans*: molecular insights into mechanism conserved between nematodes and mammals. *Brain Pathol* 1996; 6: 411-425.
- Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulated cell survival and cell death. *Oncogene* 1998; 17: 3207-3213.
- Savill J. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 1998; 392: 442-443.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.
- Bergmann A, Agapite J, Steller H. Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates. *Oncogene* 1998; 17: 3215-3223.
- Ameisen JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1996; 272: 1278-1279.
- Heilein UAO. Dead box for the living. *J Pathol* 1998; 184: 354-347.
- Hochman A. Programmed cell death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol* 1997; 23: 207-214.
- Verhaegen S. Microscopical study of cell death via apoptosis. *Europ Microscop Anal* 1998; 8: 31-33.
- Soini Y, Pääko P, Lehto VP. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 1998; 153: 1041-1049.
- Peng L, Lin JJ. A novel method for quantitative analysis of apoptosis. *Lab Invest* 1997; 78: 547-555.
- Leers MPG, Kölgén W, Björklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 567-572.
- Gorczyca W, Bedner I, Burfeind P, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Analysis of apoptosis in solid tumors by laser-scanning cytometry. *Mod Pathol* 1998; 11: 1052-1058.
- Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanaptosis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1309.
- Green DR. Apoptotic pathways: the roads to win. *Cell* 1998; 94: 695-698.
- Basu S, Kolesnick R. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* 1998; 17: 3277-3285.
- Pitti RM, Masters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, David P et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998; 396: 629-630.
- Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamuki K, Yonehara S. The ced-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 1999; 398: 777-785.
- Medema JP. Life and death in a FLASH. *Nature* 1999; 398: 756-757.
- Grunville DJ, Carthy CM, Hunt DWC, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 1998; 72: 893-913.
- Wheaton S, Netser J, Guinee D, Rahn M, Perkins S. Bcl-2 and Bax protein expression in indolent versus aggressive B-cell-non-Hodgkin's lymphomas. *Human Pathol* 1998; 29: 820-825.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
- Hengartner MO. Death cycle and Swiss army knives. *Nature* 1998; 391: 441-442.
- Bari M. Death by dozen of cuts. *Science* 1998; 280: 32-34.
- Martinou JC. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 1999; 399: 411-412.
- Hetts SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
- Ruoslahti E, Reed J. New way to activate carpases. *Nature* 1999; 397: 479-480.
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1322.
- Mason RP. Effect of calcium channel blocker on celular apoptosis. Implications for carcinogenic potential. *Cancer* 1999; 85: 2093-2102.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F et al. Ca<sup>2+</sup> induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of Bad. *Science* 1999; 284: 339-343.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Linz MZ, Juo P, Hu LS et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-868.
- Hengartner M. Death by crowd control. *Science* 1998; 281: 1298-1299.
- Thornberry NA, Lazeburk J. Caspases: enemies within. *Scienc* 1998; 281: 1312-1316.
- Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237-3245.
- Susin SS, Lorenzo HR, Zamzani N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-445.
- Hughes JH, Cohen MB. Nuclear matrix proteins and their potential applications to diagnostic pathology. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 267-274.
- Hollowood K, Goodlad JR. Germinal centre cell kinetics. *J Pathol* 1998; 185: 229-233.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997; 278: 294-298.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemioresistance in hematologic malignancies. *Sem Hematol* 1997; 34 (Supl 5): 9-19.
- Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 1999; 187: 127-137.
- Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogen* 1998; 3261-3270.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF 2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683.
- Amordson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 1998; 17: 3287-3299.
- Green DR. A Myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science* 1997; 278: 1246-1247.
- Green DR. Death deceiver. *Nature* 1998; 396: 629-630.
- Hoffman B, Liebermann DA. The proto oncogen c-mye and apoptosis. *Oncogen* 1998; 17: 3351-3357.
- Mayo HW, Wang CY, Cogswell PC, Rogers-Graham KS, Lowe SW, Der CJ et al. Requirement of NF-κB activation suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenetic Ras. *Science* 1997; 278: 1812-1825.
- Schwarz SM. Cell death and the caspase cascade. *Circulation* 1998; 97: 227-229.
- La Casse EC, Baird S, Korneluk RG, Mackesie AE. The inhibition of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259.
- Earnshaw WC. A cellular poison cupboard. *Nature* 1999; 397: 387-389.
- Peter ME, Henfelder AE, Hengartner MV. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12736-12737.
- Thatte W, Dahanukar S. Apoptosis. Clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* 1997; 54: 511-532.
- Hetts SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
- Johnson EM, Deckwerth TL, Deshmukh M. Neuronal death in developmental models: possible implications in neuropathology. *Brain Pathol* 1996; 6: 397-409.
- Le Blanc A. Detection of acting cleavage in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 1998; 152: 329-332.

70. Jang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, Sigel J et al. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998; 152: 379-389.
71. Morrison JH, Hof PR. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 1997; 278: 412-419.
72. De la Monte SM, John YK, Ganje N, Wands JR. P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases. *Lab Invest* 1998; 78: 401-411.
73. Gezer S, Mundie S, Gao XF, Alvi S, Borok R, Rifkin S et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1995; 86: 268-276.
74. Haas C. Dead end for neurodegeneration? *Nature* 1999; 399: 204-207.
75. Barinaga M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* 1998; 281: 1303-1304.
76. Kim TW, Pettingel WH, Jung YK, Roaves DM, Tanzi RE. Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 1997; 277: 373-375.
77. Edwardson J, Morris C. The genetics of Alzheimer's disease. The number of genetic risk factors associated with this disorders in increasing steadily. *BMJ* 1998; 137: 361-362.
78. Haas C, Selkoe DJ. A technical KO of amyloid- $\beta$  peptide. *Nature* 1998; 391: 339-340.
79. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang JQ et al. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- $\beta$  precursor protein and amyloidogenic  $\beta$ -peptide formation. *Cell* 1999; 97: 395-406.
80. Barinaga M. Stroke damage neurons may commit cellular suicide. *Science* 1998; 281: 1302-1303.
81. Shi B, De Girolami V, He J, Wand S, Lorenzo A, Busciglio J, Gabuzda D. Apoptosis induced of HIV-1 infection of the central neurons systems. *J Clin Invest* 1996; 98: 1979-1990.
82. Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the heart. *Chest* 1997; 112: 1358-1362.
83. Valente M, Calabrese F, Thiene G, Angelini A, Basso C, Nava A et al. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998; 152: 479-484.
84. Schwartz SM, Benneth MR. Death by any other name. *Am J Pathol* 1995; 147: 229-234.
85. Han DKM, Handschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Loon MB, Liao G. Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995; 147: 262-277.
86. Baetta R, Donetti E, Comparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C et al. Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells. *Pharmacol Res* 1997; 36: 115-121.
87. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Wetcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *J Clin Invest* 1998; 101: 890-898.
88. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Pathol* 1994; 173: 1-4.
89. Abbas AK. Die and let live: eliminating dangerous lymphocyte. *Cell* 1996; 84: 655-657.
90. Ludgate M, Jasani B. Apoptosis in autoimmune and non-autoimmune thyroid disease. *J Pathol* 1997; 182: 123-124.
91. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richins P, Papoff G et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997; 175: 960-963.
92. Cheng J, Zhon T, Lin C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759-1762.
93. Font J, Vivancos J. Apoptosis y enfermedades autoinmunes. *Med Clin (Barc)* 1996; 106: 619-621.
94. Levine JS, Koh JS. The role of apoptosis in autoimmunity: immunogen, antigen and accelerant. *Sem Nephrol* 1999; 19: 34-37.
95. Wang JS, Tseng HH, Shih DF, John S, Ger LP. Expression of inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human lupus nephritis. *Nephron* 1997; 77: 404-411.
96. Madaio MP. The role of autoantibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Sem Nephrol* 1999; 19: 48-56.
97. Harris DR, Vavil J. Apoptosis and the prostate. *Br J Urol* 1985; 75 (Supl 1): 27-33.
98. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/C95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363-1366.
99. Huang H, Zhou JH, Zhou SM, Hu JH, Pan XH, Kong XT et al. Epstein-Barr virus BHRF1 prohibits the cell of nasopharyngeal carcinoma from apoptosis. *J Laryngol Otol* 1997; 111: 1147-1450.
100. Mezquita C. Oncogenesis y genes supresores: mecanismos de apoptosis. *Med Clin (Barc)* 1995; 105: 389-395.
101. Hannon YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1997; 89: 1845-1853.
102. Dalton NS. Mechanism of drug resistance in hematology malignancies. *Sem Haematol* 1997; 34 (Supl 5): 3-8.
103. Gonus Cano M, Soriano V. Apoptosis celular. *JANO* 1997; 52: 60-62.
104. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Sem Hematol* 1997; 34: 9-19.
105. Thorsby E. Transplantation immunology: a brief update. *Transpl Proc* 1997; 29: 3129-3134.
106. Kraus SM, Egawa H, Quinn MB, Villanueva JC, García-Kennedy R, Martínez OM. Apoptosis as a mechanism of cell death in liver allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 621-625.
107. Laine J, Etelämäki P, Holmberg C, Dunkel L. Apoptotic cell death in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1997; 63: 101-105.
108. Perico N, Remuzzi G. Prevention of transplant rejection. Current treatment guidelines and future developments. *Drugs* 1997; 54: 533-570.
109. Ekert PG, Vaux DL. Apoptosis, haemopoiesis and leukaemogenesis. *Baillieres Clinical Haematology* 1997; 10: 561-576.
110. Kibern SW, Pringle JH, Sobolewski S, Murphy P, Lauder I. Correlation between apoptosis, proliferation and bcl-2 expression in malignant non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996; 49: 268-272.
111. Lepelletier P, Campergue L, Grardel N, Prendhomme C, Cosson A, Fenaux P. Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndromes? *Br J Haematol* 1996; 95: 368-371.
112. Izban KF, Wronski-Smith T, Hsi ED, Schnitzler B, Quevedo ME, Alkan S. Characterization of the interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme/Ced-3-family protease, caspase-3/CPP 32, in Hodgkin disease. *Am J Pathol* 1999; 154: 1439-1447.
113. Digninseppe JA, Kastan MB. Apoptosis in hematological malignancies. *J Clin Pathol* 1997; 50: 361-364.
114. Du M, Singh N, Hussienin A, Issacson PG, Pan L. Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa associated lymphoid tissue (MALT). *J Pathol* 1996; 178: 379-384.
115. Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu JLC, Elkon KB. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 1996; 335: 1643-1649.
116. Lamy T, Lin JH, Landowski TH, Dalton WS, Loughran TP Jr. Dysregulation of CD95/CD95 ligand apoptotic pathway in CD3+ large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 1998; 92: 4771-4777.
117. Schlaifer D, Krajenski S, Galois S, Rigal-Huguet F, Laurent G, Massip P et al. Immunodetection of apoptosis regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Pathol* 1996; 149: 177-185.
118. Grønbaek K, Straten P, Ralfkier E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998; 92: 3018-3024.
119. Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanism of arsenic trioxide (AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with down regulation of BCL-2 expression and modulation of PML-RAR $\alpha$ /PML proteins. *Blood* 1996; 88: 1052-1061.
120. Dickson DW. Apoptosis in the brain. Physiology and pathology. *Am J Pathol* 1996; 146: 1040-1044.
121. Noraz N, Gozlan J, Corbeil J, Brunnu T, Spector SA. HIV-induced apoptosis of activity primary CD4+ T lymphocytes is not mediated by Fas-Fas ligand. *AIDS* 1997; 11: 1671-1680.
122. Sloan EM, Maciejewski JP, Sato T, Bruny J, Rumar P, Kim S et al. The role of interleukin-converting in Fas-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1998; 101: 195-201.
123. Shi B, De Girolami V, He J, Wang S, Lorenzo A, Busciglio J et al. Apoptosis induced of HIV-1 infection of the central neurons system. *J Clin Invest* 1996; 98: 1979-1990.
124. Sorenson CM. Life, death and kidneys: regulation of renal programmed cell death. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7: 5-12.
125. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Davill J. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994; 94: 2105-2116.
126. Savill J, Mooney A, Hughes J. Apoptosis and renal scarring. *Kidney Int* 1996; 49 (Supl 54): 14-17.
127. Chandler D, El-Naggar AK, Brisbay S, Redline RN, McDonnell TJ. Apoptosis and expression of the bcl-2 protooncogene in the fetal and adult human kidney: evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. *Human Pathol* 1994; 25: 789-796.
128. Hayashi N, Mita E. Fas system and apoptosis in viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 223-226.
129. Que FG, Gores GJ. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 1996; 116: 1238-1243.
130. Hughes DE, Boyce BF. Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997; 50: 132-137.
131. Kresch MJ, Christian C, Wu F, Hussain N. Ontogeny of apoptosis during lung development. *Pediatr Res* 1998; 43: 426-431.
132. Scavo LM, Ertsey R, Chapin CJ, Allen L, Kitterman JA. Apoptosis in the development of rat and human fetal lungs. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1998; 18: 21-31.
133. Gochuico BR, Miranda KM, Hessel EM, De Bie JJ, Van Osterhout AJ, Cruikshank WN et al. Airway epithelial Fas ligand expression: potential role in modulating bronchial inflammation. *Am J Physiol* 1998; 274 (3): 444-449.



134. Leigh J, Wang H, Bonin A, Peters M, Ruan X. Silica-induced apoptosis in alveolar and granulomatous cells in vivo. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (Supl 5): 1241-1245.
135. Holian A, Uthman MO, Goltsova T, Brown SD, Hamilton RF Jr. Asbestos and silica-induced changes in human alveolar macrophage phenotype. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (Supl 5): 1139-1142.
136. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ et al. Infection by mycobacterium tuberculosis pranotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immunol* 1997; 65: 298-304.
137. Ziegler A, Luedke GH, Fabbro D, Altmann KH, Stahel RA, Zangmeiss-ter-Witte V. Induction of apoptosis in small-cell lung cancer by antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. *J Natl Cancer Int* 1997; 89: 1027-1036.
138. O'Neill AJ, Staunton MJ, Gaffney EF. Apoptosis occurs independently of bcl-2 and p53 over-expression in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 1996; 29: 45-50.
139. Komaki R, Milas L, RO JY, Fujii T, Perkins P, Allen P et al. Prognostic biomarker study in pathologically sataged N1 non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 787-796.
140. Fleming MV, Guinee DG Jr, Chu WS, Fredman AN, Caporaso NE, Bennett WP et al. Bcl-2 immunohistochemistry in a surgial series of non-small cell lung cancer. *Hum Pathol* 1998; 29: 60-64.
141. Anton RC, Brown RW, Younes M, Gondo MM, Stepherson MA, Cagle PT. Absence of pronostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Human Pathol* 1997; 28: 1079-1082.
142. Törmänen U, Nuorva K, Soini Y, Pääkko P. Apoptotic activity is increased in parallel with the metaplasia-dysplasi-carcinoma sequence of the bronchial epithelium. *Br J Cancer* 1999; 79: 996-1002.
143. Raskin CA. Apoptosis and cutaneous biology. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36: 855-896.
144. Livry J, Moore PF, Naydan DK, Preget BJ, Alforter VK, Kline AE. Antifollicular cell-mediated and humoral immunity in canine alopecia-areata. *Vet Dermatol* 1996; 7: 67-69.
145. Shimizu M, Higaki Y, Higaki M, Kawashima M. The role of granzyme B-expressing CD-8 positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 527-532.
146. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of the surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1317-1330.
147. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Carriera PE, Ballestin C, Gómez-Reino JJ. Keratinocyte apoptosis and p53 expression in cutaneous lupus and dermatomyositis. *J Pathol* 1999; 188: 63-68.
148. Hansen ER. Immunoregulatory events in the skin of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol* 1996; 132: 554-561.
149. Dalloul A, Laroche L, Bagot M, Mossalayi MV, Fourcade C, Tracer DJ et al. Interleukin-7 is a growth factor for Sezary lymphoma cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 1054-1060.
150. Sgone R, Grunschwitz MS, Dietrich H, Rechsis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial-cell apoptosis is a primary pathogenic event underlying skin-lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996; 98: 785-792.
151. Parry S, Strauss JF. Primary rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998; 338: 663-670.
152. Mahmoud NN, Boolbol SK, Dannenberg AJ, Mestre JR, Bilinski RT, Martucci C et al. The sulfide metabolite of sulindac prevents tumors and restores enterocyte apoptosis in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis* 1998; 19: 87-91.
153. Viora M, Di Genova G, Rivabene R, Malorni W, Fattorossi A. Interference with cell cycle progression and induction of apoptosis by dideoxynucleoside analogs. *Int J Immunopharmacol* 1997; 10: 311-321.
154. Bischoff JR, Kirn DH, Williams J. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient tumor cells. *Science* 1996; 274: 373-376.
155. Shan D, Ledbetter JA. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91: 1644-1626.