

Veterinaria México

Volumen
Volume 33

Número
Number 2

Abril-Junio
April-June 2002

Artículo:

¿Es la muerte importante para la vida?

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



medigraphic.com

¿Es la muerte importante para la vida?

Is death important for life?

Fernando Iván Flores-Pérez*

Abstract

Programmed cell death (apoptosis) is one of the most studied phenomena in the context of biomedical science. The relevance of it is supported by the fact that several diseases which could affect both human beings and animals are caused by alterations of this physiological mechanism of death. In fact, it is proposed in this study that: "Without the existence of programmed cell death, life as we know now, could not be possible". The aim of this paper is to provide a general overview about programmed cell death, and also to define and show its own regulation. Alterations of programmed cell death, and the relationship with different diseases are also described, as well as the most common techniques to detect programmed cell death.

Key words: APOPTOSIS, PROGRAMMED CELL DEATH, REVIEW.

Resumen

El fenómeno de muerte celular programada, o apoptosis, es actualmente uno de los más estudiados en el campo de la biomedicina; su importancia radica en que varias enfermedades, que afectan tanto al hombre como a los animales, son causadas por una alteración en este mecanismo fisiológico tan relevante, a tal grado que sin la existencia de este fenómeno fisiológico, la vida, como actualmente se conoce no sería posible. El propósito del presente trabajo es definir el fenómeno de apoptosis, describir cómo se regula y dar cuenta de algunas enfermedades causadas por su alteración, así como de las técnicas de detección.

Palabras clave: APOPTOSIS, MUERTE CELULAR PROGRAMADA, REVISIÓN.

Introduction

In order to understand how a living being is capable of maintaining the balance in its vital processes, one must ask the following questions: How does he preserve and regulate the size of his organs? In what fashion does he renew the cells that have fulfilled their specific function or that have grown old? What mechanisms allow the formation and differentiation of various tissues and organs during different developmental stages? How can physiological death intervene in the processes that work against external pathogenic microorganisms? In order to be able to answer to some of these questions it is necessary to recognize what pro-

Introducción

Para comprender cómo un ser vivo es capaz de mantener un equilibrio en sus procesos vitales, cabe preguntarse: ¿Cómo conserva y regula el tamaño de sus órganos?, ¿de qué manera renueva las células que han cumplido con una función específica o han envejecido?, ¿qué mecanismos hacen posible la formación y diferenciación de los diferentes tejidos y órganos en las distintas etapas del desarrollo?, ¿cómo puede la muerte fisiológica intervenir en los procesos que actúan en contra de microorganismos patógenos externos? Para dar respuesta a estas preguntas es necesario conocer lo que significa muer-

Recibido el 3 de octubre de 2001 y aceptado el 13 de febrero de 2002.

* Departamento de Morfología, Sección de Histología y Biología Celular, Laboratorio de Biomorfología Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

grammed cellular death means since, it allows this balance to be possible.

The present study explains the cellular death phenomenon caused by apoptosis and describes some of the mechanisms that are involved in its execution and regulation.

What is apoptosis?

It is a mechanism that is part of cellular homeostasis and is involved in events such as cellular differentiation and the development of diverse organisms^{1,2} that belong to different species, and is therefore considered to have been preserved during evolution.^{2,3}

It is known that during this process cells actively participate in their death when carrying out a genetically regulated program^{2,4-6} in order to maintain cellular renewal, and consequently preserve tissue architecture.^{1,2,6}

Cells die by apoptosis during certain processes such as embryonic development during morphogenesis and in adult stages during the renewal of tissues as well as during the immune response.^{1,2,6}

The term apoptosis (*apo*-separate and *ptosis*-fall) was proposed and employed in 1972 with the purpose of describing the death that was observed during embryonic development,⁷ in hepatic regeneration and the relationship between proliferation and death that existed in murine tumor models *in vivo*, that is different from that which is caused by intoxications and in certain pathologies.⁷

The observations of programmed cellular death (apoptosis) occurred back in the beginning of the XIX century, when it was observed in embryos, where it was interpreted as the elimination of certain cell populations that showed aberrations. It wasn't until 1949 when Hamburger and Levi,⁸ with quantitative studies in chicken embryos, demonstrated that approximately 50% of the neurons and motoneurons formed during embryogenesis died before birth. Nevertheless, the merit of Kerr *et al.* was the proposal that in this type of death the cells were active participants and that this process was of vital importance for the preservation of the cellular structure of the tissues.

Programmed cellular death or apoptosis has been described in the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), flies, humans and plants.^{2,6,9}

A great variety of studies done in this field suggest that in almost all human cells one can find the capacity of undergoing apoptosis,^{2,4,5,6} that in turn allows us to suppose that this phenomenon has been a cellular level response created in order to be activated by intracellular as well as extracellular stimuli.

Death against death

There is a type of death called necrosis that is characterized by the fact that it is not regulated by

te celular programada, la cual permite que este equilibrio sea posible.

El presente trabajo explica el fenómeno de muerte celular por apoptosis y describe algunos de los mecanismos que se involucran en su ejecución y regulación.

¿Qué es apoptosis?

Es un mecanismo que forma parte de la homeostasis celular y que está involucrado en eventos tales como la diferenciación celular y el desarrollo de diversos organismos^{1,2} pertenecientes a distintas especies, por lo cual se considera evolutivamente conservado.^{2,3}

Se sabe que en este proceso las células participan activamente en su muerte al llevar a cabo un programa genéticamente regulado,^{2,4-6} con la finalidad de mantener el recambio celular, que por consecuencia conserva la arquitectura de los tejidos.^{1,2,6}

Las células mueren por apoptosis en algunos procesos como el desarrollo embrionario durante la morfogénesis, y en etapas adultas en el recambio de tejidos y en la respuesta inmune.^{1,2,6}

El término apoptosis (*apo*-separar y *ptosis*-caer) fue propuesto y empleado en 1972 con el propósito de describir la muerte que se observaba durante el desarrollo embrionario,⁷ en la regeneración hepática y la relación entre proliferación y muerte existente en modelos de tumores murinos *in vivo*, diferente a la que se ocasiona por intoxicaciones y algunas patologías.⁷

Las observaciones de muerte celular programada (apoptosis) se remontan a principios del siglo XIX, practicadas en embriones, en los cuales se interpretó como la eliminación de ciertas poblaciones celulares que presentaban aberraciones. No fue sino hasta 1949 cuando Hamburger y Levi,⁸ con estudios cuantitativos en embriones de pollo, demostraron que aproximadamente 50% de neuronas y motoneuronas formadas durante la embriogénesis morían antes del nacimiento. Sin embargo, el mérito de Kerr *et al.*⁷ fue proponer que en este tipo de muerte las células participaban activamente y que este proceso era de vital importancia para conservar la estructura celular de los tejidos.

La muerte celular programada o apoptosis ha sido actualmente descrita en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), moscas, los humanos y plantas.^{2,6,9}

Una gran variedad de estudios en este campo sugieren que en casi todas las células humanas existe la capacidad de sufrir apoptosis,^{2,4-6} lo cual permite suponer que este fenómeno ha sido una respuesta a nivel celular creada para ser activada tanto por estímulos intracelulares y extracelulares.

Muerte contra muerte

Existe un tipo de muerte denominada necrosis, que se caracteriza por no estar regulada por genes, producto

genes and is the product of cellular lesions caused by biological, physical or chemical means.¹⁰

During this type of death, a set of cells are affected by an inflammatory process,¹⁰ there is also a degradation of DNA at the nuclear level, but it is not a defined pattern as occurs in apoptosis, that is made up of 200 base pairs (bp) and their multiples.^{10,11}

During death by necrosis, the cellular organelles swell causing an increase in cellular volume, which does not occur during apoptosis, since in this case there is cytoplasmic condensation that is accompanied by a reduction in cell volume.¹⁰

A variety of changes have been associated with death by necrosis; for example: loss of osmotic balance, and therefore the membrane potential is altered due to a lowering of ATP this increasing its permeability.¹⁰

The final phase of death by necrosis consists of the fusion of the organelle membranes and the loss of integrity of the cell membrane. Additionally, the cytoplasmic content is liberated into the interstitial space creating an inflammatory response.^{6,10}

Death by apoptosis is characterized by the lack of liberation of cellular material into the interstitial space, which avoids the inflammatory process; furthermore in this type of cell death the organelles practically remain whole; however, they may be altered.^{6,10}

In order to achieve the absence of inflammatory processes, evaginations of the cell membranes are formed, and these end up forming vesicular structures, that in their interior have cytoplasmic material and organelles called apoptotic bodies that neighboring cells or macrophages phagocytose.^{6,10}

The enzymes that are contained in the lysosomes that are present in the dying cell affect the cellular structures during necrosis. During apoptosis this does not happen, since the cellular components are primarily affected by a family of proteases called caspases.¹²⁻¹⁴

A common event in both types of cell death is chromatin condensation; nevertheless, in the case of apoptosis it has an appearance that is similar to a half moon or a horseshoe,^{6,10} this does not occur during necrosis, where the condensation is much more compact but less homogeneous and less dense.

It is evident that there are key differences between apoptosis and necrosis that must be taken into consideration in order to understand apoptosis and the important physiological role that it has (Table 1).

Death, architect of development

At the cell level and during the development of the embryo, there are events such as genesis, migration, differentiation, maturity and death, that constitute the peak of the differentiation process.⁸

de lesiones celulares provocadas por causas biológicas, físicas o químicas.¹⁰

En este tipo de muerte se afecta regularmente a un conjunto de células mediante un proceso inflamatorio,¹⁰ también a nivel nuclear se da una degradación de ADN pero no en un patrón definido como en la apoptosis, que es de 200 pares de bases (pb) y sus múltiplos.^{10,11}

Durante la muerte por necrosis, los organelos celulares se hinchan, lo que provoca un aumento en el volumen celular, que no sucede en la apoptosis, ya que en ésta existe una condensación citoplasmática, acompañada de una disminución en el volumen celular.¹⁰

Una variedad de cambios se han asociado con la muerte por necrosis; por ejemplo, pérdida del equilibrio osmótico, por la cual el potencial de membrana se ve alterado a causa de una baja en ATP y de esta manera se incrementa su permeabilidad.¹⁰

La fase final de la muerte por necrosis consiste en que las membranas de los organelos se fusionan y se pierde la integridad de la membrana celular; además se libera el contenido citoplasmático al espacio intersticial, y se induce así una respuesta inflamatoria.^{6,10}

La muerte por apoptosis se caracteriza por no liberar material celular al espacio intersticial, lo que evita el proceso inflamatorio; también en este tipo de muerte celular los organelos prácticamente permanecen íntegros; sin embargo, pueden tener alteraciones.^{6,10}

Para lograr la ausencia de proceso inflamatorio se forman evaginaciones en la membrana celular, las cuales terminan por formar estructuras vesiculares, que en su interior contienen material citoplasmático y organelos, denominadas cuerpos apoptóticos (o apoptósicos) que son fagocitados por células vecinas o macrófagos.^{6,10}

Afectan a las estructuras celulares en una necrosis las enzimas contenidas en los lisosomas presentes en la célula que está muriendo. En apoptosis esto no sucede así, ya que primordialmente los componentes celulares son afectados por una familia de proteasas denominadas caspasas.¹²⁻¹⁴

Un suceso común en ambos tipos de muerte celular es la condensación de cromatina; sin embargo, en el caso de apoptosis tiene un patrón de apariencia que semeja una media luna o herradura,^{6,10} lo que no sucede en necrosis, ya que en ella la apariencia de la condensación se observa mucho más compacta, pero es menos homogénea y menos densa.

Es evidente que existen diferencias clave entre apoptosis y necrosis que deben tomarse en cuenta para comprender la apoptosis y el importante papel fisiológico que ésta desempeña (Cuadro 1).

La muerte, arquitecta del desarrollo

A nivel celular y durante el desarrollo embrionario, existen eventos tales como la génesis, migración, dife-

Cuadro 1
DIFERENCIA ENTRE NECROSIS Y APOPTOSIS
DIFFERENCES BETWEEN NECROSIS AND APOPTOSIS

<i>Necrosis</i> <i>Necrosis</i>	<i>Apoptosis</i> <i>Apoptosis</i>
No tiene un programa regulado por genes. Incremento en el volumen celular. Fragmentación del ADN nuclear variable.	Está controlada por un programa regulado por genes. Reducción en el volumen celular. Fragmentación del ADN nuclear en longitudes de 200 pares de bases (pb) y sus múltiplos (apariencia de escalera o internucleosomal).
Los organelos aumentan de volumen. Liberan citoplasma al espacio intersticial provocando inflamación. Activación de proteasas inespecífica, asociada con los lisosomas. No depende de energía (ATP).	Los organelos no sufren cambios en su tamaño. El citoplasma se conserva en cuerpos apoptóticos, no provoca inflamación. Activación de proteasas (caspasas) específica. Depende de energía (ATP).

Apoptosis is responsible for the development processes in some living beings, such as the loss of interdigital membranes in the superior vertebrates, palate fusion, intestinal mucosal and retinal development.^{8,15}

Some amphibians show a regression process of certain larval organs that is caused by apoptosis;⁸ in the *C. elegans* nematode, that has been used as a study model for apoptosis, this process has been observed as a normal part of the development and even the genes that regulate this are known.^{2,6,9}

Apoptosis during embryogenesis originates the necessary plasticity for the creation of structures that have limited and transitory functionality, that later disappear or are transformed into differentiated structures.⁸

In adult tissues it is known that certain types of cells such as the epithelium, hepatocytes, the intestinal epithelium, spermatozoids, the lactating mammary gland and processes such as the selection and involution of the thymus are regulated by apoptosis,^{6,8} which in turn maintains a balance that determines how many cells a tissue must have and therefore form this organ. In the same manner, in plants, the apoptosis process is responsible for sexual dimorphism differentiation.⁸

Apoptosis, works by steps?

Cellular death by apoptosis has been divided, for study purposes, in three stages, so that the phenomenon can be better understood. In each stage the most important morphological and biochemical characteristics are mentioned.

An external or internal stimulus to the cell is in charge of the activation of the cell death program; this can be hormones, endogenous proteins, gamma radiation, hypoxia, free radicals, low nutrient levels, patho-

renciación, maduración y muerte, que constituye la culminación del proceso de diferenciación.⁸

La apoptosis es responsable de procesos de desarrollo en algunos seres vivos, como la pérdida de membranas interdigitales en vertebrados superiores, fusión palatal, desarrollo de mucosa intestinal y retinal.^{8,15}

Algunos anfibios presentan un proceso de regresión de ciertos órganos larvarios, ocasionado por la apoptosis;⁸ en el nematodo *C. elegans*, que ha sido usado como modelo de estudio en apoptosis se ha observado como parte normal del desarrollo; incluso se conocen los genes que la regulan.^{2,6,9}

La apoptosis en la embriogénesis origina la plasticidad necesaria para crear estructuras que poseen una funcionalidad limitada y transitoria, que posteriormente desaparecerán o se transformarán en estructuras diferenciadas.⁸

En tejidos adultos se sabe que en ciertos tipos celulares como el epitelio, hepatocitos, epitelio intestinal, espermatozoides, glándula mamaria en lactancia, procesos como la selección tímica y la involución del timo son regulados por apoptosis,^{6,8} lo que mantiene un equilibrio que determina cuántas células debe tener un tejido y, por consecuencia, el órgano que éste constituya. Asimismo, en plantas el proceso de apoptosis es responsable de la diferenciación propia del dimorfismo sexual.⁸

Apoptosis, ¿va por partes?

La muerte celular por apoptosis se ha dividido para su estudio en tres fases con el propósito de entender mejor el fenómeno. En cada etapa se señalan las características morfológicas y bioquímicas más importantes.

Un estímulo externo o interno a la célula se encarga de activar el programa de muerte celular; pueden ser

genic microorganisms among others, this is known as the initiation stage.^{1,6,11}

During the execution stage most of the morphological and biochemical changes of programmed cell death take place.^{1,6,10}

At the cellular level, the calcium concentrations increase, basically by penetration of this ion from the exterior to the interior, as well as by the liberation of calcium that happens in certain organelles such as the mitochondria and the endoplasmic reticulum.^{6,10}

The high calcium concentration activates certain enzymes such as the endonucleases (enzymes whose function is the degradation of DNA)¹¹ and the proteases (caspases),¹² together with this there are modifications to the cytoskeletal structure, without reaching complete disorganization, that causes changes in the form and size of the cell, whose volume is reduced.^{1,10}

In structures such as the cell membrane, that are modified during apoptosis, there is a loss of symmetry that causes the externalization of the phosphatidylserine, that is normally in the internal layer of the cell membrane, a fact that must be taken into consideration since there are detection methods based upon this phenomenon that is considered as one of the earlier ones.⁶

The caspases degrade proteins that function in protecting the cell from death by apoptosis, such as Bcl-2,¹⁶ that degrade molecules such as actine, polymerases and protein kinase C.¹²⁻¹⁴

With the increase of intracellular free calcium and other proteins such as Bax (that may induce or inhibit apoptosis),¹⁶ the mitochondrial membrane becomes permeable and loses its potential, which in turn increases the liberation of mitochondrial calcium and increases the synthesis of ATP; in this manner, free radicals that cause the oxidation of DNA are generated.¹⁷⁻²¹

Due to the changes in mitochondrial permeability, water can penetrate and permit the liberation of cytochrome C and proteins such as the apoptosis inducing factor (AIF), that activates the caspases.^{18,19}

It is relevant that we mention that there have been experimental studies where the action of the caspases is inhibited, and even then death occurs, this makes it quite evident that lesions to the mitochondria are capable of activating the cell death program by themselves, and therefore we must consider that there may be routes, not dependent upon caspases, by which it is possible to have apoptosis.^{18,19}

According to the stimuli that activate death by apoptosis, different genes might be activated: p53, in the case of gamma radiations,²²⁻²⁶ p53 and p53 when the stimulants are corticosteroids,⁶ or the Fas protein (also called CD95 or APO-1), interacting with its ligand Fas L, in the elimination of mature T cells at the end of an immune response; in the activation of apoptosis by

hormonas, proteínas endógenas, radiación gamma, hipoxia, radicales libres, baja en nutrientes, microorganismos patógenos, entre otros, lo cual se conoce como fase de iniciación.^{1,6,11}

En la fase de ejecución se dan la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos de muerte celular programada.^{1,6,10}

A nivel celular, las concentraciones de calcio se incrementan, básicamente por la entrada de este ion del exterior al interior, así como por la liberación de calcio que ocurre en ciertos organelos como las mitocondrias y el retículo endoplásmico.^{6,10}

Las concentraciones elevadas de calcio activan ciertas enzimas como las endonucleasas (enzimas cuya función es degradar el ADN)¹¹ y las proteasas (caspasas),¹² aunado a esto existen modificaciones en la estructura del citoesqueleto, sin llegar a su desorganización, que provocan cambios en la forma y tamaño de la célula, cuyo volumen disminuye.^{1,10}

En estructuras como la membrana celular, que se ve modificada en apoptosis, se produce una pérdida de la simetría, lo que provoca que la fosfatidilserina, que normalmente está en la capa interior de la membrana, se exteriorice, hecho que debe ser tomado en cuenta ya que existen métodos de detección basados en este fenómeno, que es considerado como uno de los más tempranos.⁶

Las caspasas degradan proteínas, que tienen como función proteger a la célula de la muerte por apoptosis, como Bcl-2,¹⁶ que degradan moléculas como la actina, polimerasas y la proteína cinasa C.¹²⁻¹⁴

Por el incremento de calcio libre intracelular y de otras proteínas como lo es Bax (que puede inducir o inhibir apoptosis),¹⁶ la membrana mitocondrial será permeabilizada y perderá su potencial, lo que incrementará la liberación de calcio mitocondrial y un incremento en la síntesis de ATP, de esta manera se generan radicales libres que oxidan al ADN.¹⁷⁻²¹

Debido a los cambios de la permeabilidad mitocondrial, será posible que entre agua para permitir la liberación del citocromo C y de proteínas como el factor inductor de apoptosis (AIF), los cuales activan a las caspasas.^{18,19}

Es pertinente aclarar que se han llevado a cabo estudios experimentales en donde se inhibe la acción de las caspasas y aun así la muerte ocurre, de esta forma se hace evidente que un daño en mitocondria es capaz de activar el programa de muerte celular por sí solo, lo que hace pensar que pueden existir rutas no dependientes de caspasas por las cuales se lleve a cabo la apoptosis.^{18,19}

Según el estímulo que active la muerte por apoptosis, podrán activarse diferentes genes: p53, en el caso de radiaciones gamma,²²⁻²⁶ p53 y p53 cuando los estímulos sean corticosteroides,⁶ o la proteína Fas (denominada

TCR (antigen receptor), such as nur-77, erg-1 and c-myc, as a part of the immunogenic processes.⁹

Endonucleases degrade the DNA in a typical stepwise pattern cutting fragments of 180-200 base pairs (bp) and its multiples with a loss of microtubules and reorganization of the cytoskeleton accompanied by the condensation of chromatin.¹¹

The fragmentation of the plasma and nuclear membrane is a phenomenon that occurs in this stage, with the formation of evaginations of the membrane that give rise to the apoptotic bodies that are vesicles integrated mainly by ribosomes, mitochondrias and nuclear material.^{1,6,10} Once these events have happened, it is possible to observe the fragmentation of the cell.

In vitro, these apoptotic bodies remain as cellular residues that later on swell and finally disintegrate. This phenomenon is known as secondary necrosis. Nevertheless, *in vivo*, the last phase of apoptosis or cleaning stage will take place, whereby these apoptotic bodies are eliminated by the neighboring cells or macrophages.^{1,6,10}

Molecular control of apoptosis

The molecular control of apoptosis is considered to be highly preserved amongst species, given that it has been possible to find genes similar in function as well as in sequence, in species that are as distant as the *C. elegans* nematode and the human being.^{2,6,9}

The apoptosis machinery is regulated by a group of proteases called caspases, from which, up until now, 14 have been identified;¹²⁻¹⁴ these remain in different structures at the cell level and may be present mainly in the mitochondria and the cytosol,^{13,14} but also in other structures such as the nucleus. There are several signal cascades that belong to apoptosis; nevertheless most of them finally converge in the caspases activation stage and subsequent cellular degradation.^{4,12-14}

In a healthy cell, the caspases remain as proenzymes or zymogens and must be activated by the degradation of certain aspartate rich sites of the protein, thus liberating two fragments of an approximate molecular weight between 10 and 20 kDa (kilo Daltons), that later are assembled in the tetramere that will form the active enzymatic complex.¹²⁻¹⁴

This caspase activation mechanism may occur in two ways: the self activation that is called autocatalysis or the indirect activation by other caspases that are already active.¹²⁻¹⁴

In a first phase (autocatalysis), the caspases that are known as initiators are activated and these are the 2, 8, 9 and 10 caspases, that have in their structure long (amino) NH₂ zymogen ends, where there are specific sites or domains: the caspases recruiting domain (CARD) and the death effector domain (DED),^{4,13,14} these shall act

también CD95 o APO-1), interactuando con su ligando Fas L, en la eliminación de células T maduras al final de la respuesta inmune; en la activación de apoptosis por TCR (receptor de antígeno), como nur-77, erg-1 y c-myc, como parte de procesos inmunológicos.⁹

Las endonucleasas degradarán al ADN en un patrón típico de escalera cortándolo en fragmentos de 180-200 pares de bases (pb) y sus múltiplos, con una pérdida de microtúbulos y reorganización del citoesqueleto, acompañado de condensación de la cromatina.¹¹

La fragmentación de la membrana plasmática y nuclear es un fenómeno que ocurre en esta fase, al formarse evaginaciones de la membrana, que darán origen a los cuerpos apoptóticos, que son vesículas integradas principalmente por ribosomas, mitocondrias y material nuclear.^{1,6,10} Una vez que estos sucesos han ocurrido, es posible observar la fragmentación de la célula.

De manera *in vitro*, estos cuerpos apoptóticos quedan como restos celulares que posteriormente se hinchan y, por último, se desintegrarán. Este fenómeno se denomina necrosis secundaria. Sin embargo, en condiciones *in vivo* se proseguirá a la última fase de la apoptosis o fase de limpieza, donde estos cuerpos apoptóticos serán eliminados por células vecinas o por macrófagos.^{1,6,10}

Control molecular de apoptosis

El control molecular de apoptosis se considera como altamente conservado entre las especies, ya que ha sido posible encontrar genes parecidos tanto en funcionalidad como en secuencia, en especies tan distantes como el nematodo *C. elegans* y el ser humano.^{2,6,9}

La maquinaria de apoptosis es regulada por un grupo de proteasas denominadas caspases, de las cuales hasta la fecha se han identificado 14;¹²⁻¹⁴ éstas permanecen en diversas estructuras a nivel celular y pueden estar presentes en mitocondria y citosol, principalmente,^{13,14} pero también en otras estructuras como el núcleo. Existen diversas cascadas de señalización propias de apoptosis; sin embargo, la mayoría de ellas finalmente convergen en la fase de activación de las caspases y la consecuente degradación celular.^{4,12-14}

En una célula saludable, las caspases permanecerán como proenzimas o zimógenos, y deben ser activadas mediante la degradación de determinados sitios ricos en aspartato propios de la proteína, liberando así dos fragmentos de un peso molecular aproximadamente entre 10 y 20 kDa (kilo Daltons), los cuales posteriormente serán ensamblados en el tetrámero, que formará el complejo ezimático ya activo.¹²⁻¹⁴

Este mecanismo de activación de caspases puede darse por dos formas: La autoactivación que se deno-

together with other molecules that function as adaptors: Apaf-1 or DED, which promote proximity and with a combination of their intrinsic proteolytic activity shall cause an autocatalytic activation of the initiating caspases later these will be in charge of activating the effector caspases (indirect activation), among these are the 3, 6 and 7 caspases that are characterized by a much shorter NH₂ (amino) end whose function is the degradation of the proteins that are vital for the cell.^{4,12-14}

Several of the studies performed to find the molecular regulation of cellular death during apoptosis are based on the use of animals or cells that have gene mutations that must be activated during this process, in such a way that if their function is affected it is known, by the modifications of their phenotype characteristics, in what processes they specifically participate.^{4,6}

The caspases that are activated as initiators may vary according to the stimulus that induces the apoptosis; in the same manner, the adaptors that make the activation possible and the subsequent activation of effector caspases, may also vary with the stimulus.^{12,14}

Apoptosis, an essential part of the pathological processes

Cancer is an excessive or unregulated cellular proliferation together with a lack of the capacity of cells to die.⁶ Cells, when in a certain environment, may suffer mutations of their DNA,¹⁷ when this occurs the mechanisms of repair and apoptosis get activated with the purpose of avoiding a lack of control that would initiate cancer.²³

It has been said that in patients with cancer the gene that codifies the p53 protein is mutated in more than 50% of the cases.²⁷⁻²⁹ Its more relevant biological functions are the arrest of the cellular cycle and the induction of cellular death by apoptosis,²⁴ therefore, when it loses or diminishes its functionality, the apoptosis process does not develop, thus originating tumors.^{23,24,27}

At the present time it is known that the phenomena of hypoxia and angiogenesis that accompany the presentation of tumors cause an increment in the expression of the p53 protein.²³ A theory has been proposed stating that when p53 is mutated and its function is altered, tumor angiogenesis is potentialized and a greater tumor growth is induced.^{23,24,27}

Certain viruses, such as the human papilloma, also use the function of p53, degrading p53 using the protein HPV E6, avoiding thus the elimination by apoptosis of the cells inhabited by the virus.^{23,30}

The importance of p53 in the apoptosis induction process is also related to the resistance against radiations and chemotherapy in certain cellular types in which p53 is altered or has lost its functionality. In these cases, therapy shall not give the expected results in the patient.^{22-24,26} There is data that supports the observation

mina, autocatálisis, o la activación indirecta por otras caspasas ya activas.¹²⁻¹⁴

En una primera fase (autocatálisis) se activan las caspasas denominadas iniciadoras que son las caspasas 2, 8, 9 y 10, y que tienen en su estructura como zimógenos extremos NH₂ (amino) largos, donde se encuentran sitios o dominios específicos: El dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) y el dominio efector de muerte (DED),^{4,13,14} que actuarán en conjunto con otras moléculas que funcionarán como adaptadores: Apaf-1 o DED, los cuales favorecerán una proximidad, que en combinación con su actividad proteolítica intrínseca, promoverán una activación autocatalítica de las caspasas iniciadoras; posteriormente éstas se encargarán de activar a las caspasas efectoras (activación indirecta), dentro de las cuales están las caspasas 3, 6 y 7, que se caracterizan por tener un extremo NH₂ (amino) mucho más corto, cuya función es degradar proteínas vitales para la célula.^{4,12-14}

Varios de los estudios tendientes a encontrar la regulación molecular de muerte celular por apoptosis se basan en el uso de animales o células que tienen mutaciones en los genes que deben ser activados durante este proceso, de tal manera que si su función se ve afectada se sabe, por las modificaciones en sus características fenotípicas, en qué procesos participan específicamente.^{4,6}

Las caspasas que sean activadas como iniciadoras pueden variar según el estímulo que induzca apoptosis; asimismo, los adaptadores que harán posible su activación y la subsecuente activación de caspasas efectoras, también varían con el estímulo.^{12,14}

Apoptosis, parte esencial de procesos patológicos

El cáncer es una proliferación celular excesiva o desregulada, aunada a la incapacidad de las células para morir.⁶ Las células, al estar en un ambiente, pueden sufrir mutaciones en su ADN,¹⁷ cuando esto ocurre los mecanismos de reparación y apoptosis se activan con el propósito de evitar que ésta se torne incontrolable e inicie así un cáncer.²³

En pacientes con cáncer se ha referido que el gene que codifica para la proteína P53 se encuentra mutado en más de 50% de los casos,²⁷⁻²⁹ cuyas funciones biológicas más relevantes son arresto del ciclo celular e inducción de muerte celular por apoptosis,²⁴ por ello, al perder o disminuir su funcionalidad, el proceso de apoptosis no se desarrolla, lo que origina tumores.^{23,24,27}

Actualmente se sabe que fenómenos que acompañan a la aparición de un tumor como la hipoxia y angiogénesis, causan un incremento en la expresión de la proteína P53.²³ Incluso se ha propuesto como una teoría que al estar p53 mutado y su función alterada, la

that tumors where p53 is mutated, located in lung, mammary gland, prostate, to mention some examples, typically respond less to chemotherapy in comparison to tumors that have a non-mutated p53.²³ Also, it also represents a therapeutic target since it has been proposed that when the function of p53 is renewed the tumor can regress, this type of observations have been seen in animals as well as in humans.^{1,6,23,27}

Auto-immune diseases

The immune system has the task of defending the organism from external agents, as well as recognizing its own structures in order to not destroy them.³⁰ The T lymphocytes are considered as the main effectors of the immune response against some pathogens such as viruses.^{30,31}

T lymphocytes have the capacity of dying by apoptosis in different stages of their life, an alteration of this phenomenon would cause auto-immunity.

When inflammation exists in the organism, the cells that have participated in this phenomenon must be eliminated⁹ in order to avoid a chronic inflammatory process; in this case apoptosis is also a mechanism of elimination, and because of this, once the T lymphocytes have been activated by a pathogenic agent, they circulate for some days and are later discarded.³²

The explanation for certain auto-immune diseases is that the mechanism to eliminate the lymphocytes is not efficient or is altered, and this permits the reaction against its own tissues.³⁰ We must mention that the specific route to eliminate the auto-reactive lymphocytes is the so called Fas route.⁹

It is known that in pathologies such as rheumatoid arthritis and erythematous lupus the mechanism of lymphocyte elimination is delayed and thus induces a prolonged auto-inflammatory process.³²

In the future the therapeutic possibilities for this type of diseases shall be directed to the reestablishment of the apoptosis routes, in order to avoid the presentation of auto-immune phenomena.^{1,9,32}

Some methods for the detection of apoptosis

Electron microscopy

The description of apoptosis was achieved by its observation under the electron microscope whereby the characteristics mentioned above are made evident: Chromatin condensation in half moon pattern, reduction of cell volume, formation of apoptotic bodies and phagocytosis of these by neighboring cells; this technique is commonly applied in cell cultures that have been subjected to some apoptosis inducing stimulus.⁶

angiogénesis tumoral se potencializa e induce mayor crecimiento tumoral.^{23,24,27}

El afectar la función del gene p53 es un mecanismo también empleado por ciertos virus, entre ellos el de papiloma humano que con la proteína HPV E6 degrada a p53, evitando así que las células en donde permanece el virus sean eliminadas por apoptosis.^{23,30}

La importancia de p53 en el proceso de inducción de apoptosis se relaciona también con la capacidad de resistencia a radiaciones y quimioterapia en ciertos tipos celulares en los cuales p53 está alterado o ha perdido su funcionalidad, en estos casos la terapia no dará los resultados esperados en el paciente.^{22-24,26} Existen datos que apoyan la observación de que en tumores donde p53 se encuentra mutado, como los localizados en pulmón, glándula mamaria, próstata, por mencionar algunos, responden típicamente en menor grado a la quimioterapia, en comparación con los tumores que presentan un p53 no mutado.²³ Asimismo, representa un blanco terapéutico, ya que se ha propuesto que al restablecer la función de p53 se podría lograr una regresión tumoral, este tipo de observaciones han sido practicadas tanto en animales como en humanos.^{1,6,23,27}

Enfermedades autoinmunes

El sistema inmune tiene la tarea de defender al organismo de agentes externos, así como de reconocer las estructuras propias para no destruirlas.³⁰ Los linfocitos T se consideran como los principales efectores de la respuesta inmune en contra de algunos patógenos como los virus.^{30,31}

Los linfocitos T tienen la capacidad de morir por apoptosis en diferentes etapas de su vida, una alteración en este fenómeno provocaría, consecuentemente, autoinmunidad.

Cuando en el organismo existe inflamación, las células una vez que participan en este fenómeno deben ser eliminadas⁹ con el propósito de evitar un proceso inflamatorio crónico; también en este caso el mecanismo de eliminación es apoptosis, por eso una vez que los linfocitos T han sido activados por algún agente patógeno, permanecerán por algunos días en circulación para luego ser desechados.³²

La explicación a algunas enfermedades autoinmunes radica en que el mecanismo para eliminar a los linfocitos no es eficiente o se encuentra alterado, lo que permite que reaccionen en contra de los tejidos propios.³⁰ Es necesario mencionar que una ruta específica denominada vía de Fas es la encargada de eliminar a los linfocitos autorreactivos.⁹

Se sabe que en patologías tales como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso, el mecanismo de eliminación de los linfocitos se retrasa e induce así un autoproceso inflamatorio prolongado.³²

In tissues that form part of organisms, this phenomenon may be observed but in a small or limited group of cells and therefore this technique is not adequate for quantification of this phenomenon, since the number of cells present may be underestimated, given that they will not always exhibit the morphological characteristics of apoptosis, which does not exclude the possibility of them being part of the phenomenon, but that perhaps they are in a morphologically non-detectable phase.

Hematoxylin and eosin stain

The observation of cells stained by hematoxylin and eosin (HE) is a technique that has several advantages since it has a lower cost than others; it only requires a light microscope and a microtome and the personnel that performs it needs relatively little training. In it, samples can be used that were previously collected from other patients, fixed in 10% formaldehyde and then processed.⁶

In this technique the chromatin may be observed with its half moon pattern; also, it allows us to observe a greater amount of cells than with the electron microscope; nevertheless the disadvantage is that it confuses the chromatin condensation that exists in the non-apoptotic cells with that which is found in the apoptotic cells (example of this type of cells are the small lymphocytes); occasionally it is difficult to distinguish the cells that are truly apoptotic from those that are damaged by the microtome or the tissue processing in general. It must be remembered that this tool, in the hands of an experienced and knowledgeable pathologist, can be very effective, mainly when culture cells are examined to which an apoptosis inducing stimulus is applied.⁶

Fluorescence stains

In order to observe cells stained with fluorescent colorants Hoechst 33258 or the colorant known as DAPI may be used. Using these it is possible to easily identify the characteristics such as chromatin condensation and nuclear fragmentation;⁶ as well as to evaluate and quantify a considerable amount of cells.

The disadvantages of this technique lie in its higher cost and that in order to perform such a technique the specific fluorescence system is required, besides that, the same evaluation errors mentioned for the HE technique may be committed.⁶

DNA electrophoresis

The fragmentation of DNA in agar gel is one of the most frequently used techniques for the detection of the

En un futuro probablemente las posibilidades terapéuticas para este tipo de enfermedades se enfocarán en restablecer las vías de apoptosis, para evitar que aparezcan fenómenos de autoinmunidad.^{1,9,32}

Algunos métodos de detección de apoptosis

Microscopía electrónica

La descripción de apoptosis se llevó a cabo mediante observación por microscopía electrónica, en la cual se hacen evidentes las características ya mencionadas: Condensación de cromatina en patrón de media luna, reducción del volumen celular, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis de éstos por células vecinas, esta técnica se aplica comúnmente en cultivos celulares que han sido sometidos a algún estímulo que induzca apoptosis.⁶

En tejidos que forman parte de organismos, este fenómeno puede ser observado, pero en un grupo pequeño o limitado de células, por ello esta técnica no resulta muy adecuada para la cuantificación del fenómeno, ya que el número de células que se presenten pueden ser subestimadas, debido a que no siempre exhibirán las características morfológicas de apoptosis, lo cual no excluye que estén experimentando el fenómeno, pero quizá en otra fase no detectable desde el punto de vista morfológico.

Tinción con hematoxilina y eosina

La observación de células teñidas por hematoxilina y eosina (HE) es una técnica que presenta ventajas por ser económica en relación con otras; solamente requiere un microscopio de luz y un microtomo, y relativamente poca capacitación del personal que la lleva a cabo. En ella, se pueden usar muestras que han sido colectadas anteriormente para otros pacientes, fijadas en formalina amortiguada al 10% y procesadas.⁶

En esta técnica se puede observar la cromatina con su patrón de media luna; asimismo, permite valorar un número mayor de células que con la microscopía electrónica; sin embargo, la desventaja es que confunde la condensación de la cromatina existente en células no apoptóticas de las que están en apoptosis (ejemplo de estas células son linfocitos pequeños); en ocasiones puede ser difícil distinguir las células que de verdad están en apoptosis de las que son dañadas por el microtomo o el proceso del tejido en general. Cabe señalar que esta herramienta en manos de un patólogo experimentado y con conocimiento suele ser efectiva, primordialmente donde se examinan células en cultivos a las cuales se les aplica un estímulo que induce apoptosis.⁶

apoptosis phenomenon given that it makes evident the specific stepwise or nucleosomal pattern, composed of 200 bp fragments and their multiples, that are originated after the degradation of the DNA by the endonucleases that participate in the phenomenon.^{6,11}

The cells or tissues used for this assay must be treated physically (temperature) as well as chemically (enzymes, for example proteinase K) to free the DNA, using phenol and chloroform to remove the proteins. When the DNA of the samples is obtained, these are subjected to electrophoresis in agar gel at a density of 1% to 2%, in this manner, when the DNA is stained in the gel with etidium bromide the fragmentation pattern can be observed.⁶ This technique is considered qualitative, but not quantitative; one of its advantages is that it is very simple and has a very low cost.

This technique is characterized by being not very sensitive, since it cannot detect very small quantities of the genetic material when this phenomenon occurs. This disadvantage may be reduced if *southern* type hybridization is performed, marking the DNA with radioactive phosphorus; this test may be used to distinguish between apoptosis and necrosis.⁶

TUNEL assay

When the DNA is degraded by the action of the endonucleases, 3' fragments are generated, these form the substrate for an enzyme called deoxyribonucleotidil transferase that catalyzes the addition of the nucleotides marked with fluorescein, and this allows the observation of the cells with fragmented DNA as well as simultaneously viewing their morphology under the microscope.⁶

This technique has the advantage that it can be observed in an ordinary light microscope without a fluorescein system; it is considered a quantitative methodology, it has the disadvantage of being costly and that its extreme sensitivity detects the fragmentation that is induced by topoisomerases.⁶ It can be applied in cell suspensions as well as paraffin processed tissues.

Flow cytometry

Flow cytometry permits the detection of the intensity of the fluorescence of cells by an electronic and mechanical device called a cytometer.³³ In this apparatus it is possible to analyze great amounts of cells in a few minutes, besides there are techniques that are based on the measurement of DNA, morphology evaluation, detection of fragmentation and even the expression of the proteins of apoptosis, that may be detected, measured and quantified within a cell population. It is considered as one of the most sophisticated techniques.³³ Even though it is extremely sensitive, its

Tinciones con fluorescencia

Para la observación de las células teñidas con colorantes fluorescentes pueden emplearse los colorantes Hoechst 33258 o el colorante denominado DAPI, mediante ella se pueden identificar fácilmente características como son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear;⁶ asimismo, se puede evaluar y cuantificar un número considerable de células.

Las desventajas de esta técnica radican en que es de un costo mayor y que para llevarla a cabo se necesita un sistema de fluorescencia; además, se pueden cometer los mismos errores de valoración mencionados para la técnica de HE.⁶

Electroforesis de ADN

La fragmentación de ADN por geles de agarosa es una de las técnicas más frecuentemente utilizadas para detectar el fenómeno de apoptosis, que permite hacer evidente el patrón específico de escalera o nucleosomal, el cual posee fragmentos de 200 pb y sus múltiplos, que se origina tras la degradación del ADN por las endonucleasas que participan en el fenómeno.^{6,11}

Las células o tejidos que se destinen a este ensayo deben ser tratadas tanto física (temperatura) como químicamente (enzimas, por ejemplo, proteinasa K) para liberar al ADN, utilizando fenol y cloroformo, para remover las proteínas. Al obtener el ADN de las muestras, éstas se someten a una electroforesis con geles de agarosa entre una densidad de 1% a 2 %, de esta manera, al ser teñido el ADN presente en el gel con bromuro de etidio, se visualiza el patrón de fragmentación.⁶ Esta técnica se considera como cualitativa, mas no cuantitativa; una de sus ventajas es que es muy simple y de bajo costo.

Esta técnica se caracteriza por ser poco sensible, ya que no puede detectar cantidades pequeñas de material genético que presenten el fenómeno. Esta desventaja puede reducirse si se llevan a cabo hibridaciones tipo *southern*, marcando el ADN con fósforo radiactivo; esta prueba puede ser empleada para distinguir entre apoptosis y necrosis.⁶

Ensayo de TUNEL

Al existir una degradación del ADN por acción de las endonucleasas se generan fragmentos 3', éstos constituyen el sustrato para una enzima denominada deoxyribonucleotidil transferasa que cataliza la adición de nucleótidos marcados con fluorocéina, lo que permite observar a las células con un ADN fragmentado y su morfología de forma simultánea en el microscopio.⁶

Esta técnica tiene la ventaja de que puede observarse en un microscopio óptico común sin sistema de fluores-

cost is very high and it can only be applied in cellular suspensions which can be limiting.

Annexin satin stain

This assay is based upon the cellular membrane alteration in which the phosphatidilserine that is present in the membranes in a normal fashion, is exteriorized when the cells are undergoing an apoptotic process, and thus the phosphatidilserine may join the annexin.⁶

The disadvantages are the fact that the color can enter any cell that has a loss of membrane integrity and that it must not be used in permeable cells or in tissues embedded in paraffin; nevertheless, it has the advantage that it allows the examination of a large amount of cells.⁶

Acknowledgements

I would like to thank doctors Edda Sciutto and Gladis Frago for their unconditional support, motivation and patience in the preparation of this paper and especially Doctor Aline Schunemman de Aluja for her valuable comments and suggestions, as well as Patricia Lopez Perez and Maria Isabel Aguilar for her technical assistance in the review of this text; I also thank Conacyt of Mexico for the grant given to the author.

cencia; se considera como una metodología cuantitativa, tiene la desventaja de ser costosa y de que su extrema sensibilidad detecta fragmentación inducida por topoisomerasas.⁶ Se puede aplicar tanto en suspensiones celulares como en tejidos procesados en parafina.

Citometría de flujo

La citometría de flujo permite detectar la intensidad de fluorescencia de las células mediante un dispositivo electrónico y mecánico denominado citómetro.³³ En este aparato es posible analizar grandes cantidades de células en pocos minutos, adicionalmente existen técnicas que se basan en la medición del ADN, evaluación de la morfología, detección de fragmentación e incluso expresión de proteínas propias de apoptosis, que pueden ser evidenciadas, medidas y cuantificadas en una población celular. Se considera como una de las técnicas más sofisticadas.³³ Aunque es extremadamente sensible, su costo es muy alto y solamente puede aplicarse en suspensiones celulares, lo que es una limitante.

Tinción con anexina

Este ensayo se basa en alteraciones propias de la membrana celular en las cuales la fosfatidilserina presente en las membranas de manera normal se exterioriza cuando las células están en un proceso apoptótico, de esta manera la fosfatidilserina puede acoplarse con la anexina.⁶

Las desventajas son que se puede introducir el colorante en cualquier célula que tenga una pérdida de la integridad de la membrana y que no debe ser usado en células que han sido permeabilizadas o en tejidos incluidos en parafina; sin embargo, tiene la ventaja de que permite examinar grandes cantidades de células.⁶

Agradecimientos

Se agradece a las doctoras Edda Sciutto y Gladis Frago su apoyo incondicional, motivación y paciencia en la elaboración del presente trabajo, y, en especial, a la doctora Aline Schunemman de Aluja sus valiosos comentarios y sugerencias, así como a Patricia López Pérez y a María Isabel Aguilar por su asistencia técnica en la revisión del presente texto; también se agradece al Conacyt de México la beca otorgada al autor.



References

1. Bright J, Khar A. Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Biosci Rep* 1994;14:677-681.
2. Hale JA, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, *et al.* Apoptosis: the molecular control. *Eur J Biochem* 1996;236:1-26.
3. Blackstone NW, Green DR. The evolution of a mechanism of cell suicide. *Bioessays* 1999;21:84-88.
4. Coultas L, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* 2000;5:491-507.
5. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1988;281:1317-1322.
6. Kaufmann HS. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. San Diego (Ca): Academic Press, 1997.
7. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239.
8. Milligan CE, Schwartz LM. Programmed cell death during development of animals. In: editors. *Cellular aging and cell death*. New York: John Wiley & Sons, 1996:181-208.
9. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1988;281:1305-1308.
10. Tomei LD, Cope OF. Apoptosis: the molecular basis of cell death. New York: Cold Spring Harbor Press, 1991.
11. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
12. Thornberry AN, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1988;281:1312-1316.
13. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:644-651.
14. Utz PJ, Anderson P. Life and death decisions: regulations of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ* 2000;7:589-602.
15. Wride MA. Minireview: apoptosis as seen through a lens. *Apoptosis* 2000;5:203-209.
16. Adams MJ, Suzanne C. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
17. Friedberg CE, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington (DC): American Society of Microbiology Press, 1995.
18. Green D, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1988;281:1309-1312.
19. Kroemer G, Reed J. Mitochondrial control of cell death. *Nature* 2000;6:513-519.
20. Simon HU, Haja-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000;5:415-418.
21. Yakes MF, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci* 1997;94:514-519.
22. Arrowsmith CH. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ* 1999;6:1169-1173.
23. Bendi A, Mookerjee B. Biological significance and molecular mechanisms of p53-induced apoptosis. *Apoptosis* 1988;3:224-237.
24. Burns FT, El-Deiry WS. The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Phys* 1999;181:231-239.
25. Geske FJ, Liberman R, Strange R, Gerschenson LE. Early stages of p53-induced apoptosis are reversible. *Cell Death Differ* 2001;8:182-191.
26. Wani MA, Zhu QZ, El-Mahdy M, Wani AA. Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells. *Carcinogenesis* 1999;20:765-772.
27. Fisher DE. The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer. *Apoptosis* 2001;6:7-15.
28. Walker RD, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS *et al.* Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene* 1999;19:211-218.
29. Zangmeister-Wittke U, Simon HU. Apoptosis-regulation and clinical implications. *Cell Death Differ* 2001;8:537-544.
30. Barber GN. Host defence, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 2001;8:113-126.
31. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 2001;6:103-116.
32. Lorenz HM, Herrmann M, Winkler T, Gaip U, Kalden R.J. Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis* 2000;5:443-449.
33. Ormerod MG. Flow cytometry: a practical approach. 2nd ed. Oxford (UK): Oxford University Press, 1994.