PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Apoptose e morte celular induzida por ativação (AICD)

Gabriel Domingos Carvalho^{1,2}, Fabrício Luciani Valente²; Anna Paula Batista Ribeiro Ferreira²; Breno Souza Salgado³; Marlene Isabel Vargas⁴; Joaquín Hernán Patarroyo⁵

¹Professor do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Norte de Minas Gerais - IFNMG *Campus* Salinas, Salinas-MG.

²Pós-Graduando em Med. Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (DVT/UFV), Viçosa-MG.

³Pós-graduando em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Professor do curso de Med. Veterinária da Fundação de Ensino e Pesquisa de Itajubá (FEPI), Itajubá/MG.

⁴Pesquisador/CNPq, Professora Associada, DVT-UFV, Viçosa-MG.

⁵Professor Titular, DVT-UFV, Viçosa-MG.

Autor para correspondência: Gabriel Domingos Carvalho.

E-mail: gabriel.carvalho@ifnmg.edu.br

Endereço: Fazenda Varginha, Km 02, Rod. Salinas/Taiobeiras. 39.560-000. Salinas, MG. Tel./Fax. +55 38 3841 7000.

Resumo

A morte celular pode ser um processo fisiológico, relacionado com as fases do desenvolvimento do organismo ou com processos envolvidos na manutenção deste; ou um processo patológico, o qual nunca é programado e ocorre após

injúria celular ou quando há comprometimento da homeostase. O processo de apoptose é extremamente importante no desenvolvimento, homeostase, controle de neoplasias e nas funções do sistema imune, além da remoção de células em excesso, defeituosas, lesadas ou reativas. Apoptose é um fenômeno no qual a célula morre de forma programada sem que haja a presença de inflamação. Há evidências de que todas as células animais expressam constitutivamente as proteínas necessárias para que ocorra a apoptose, um processo complexo que envolve uma variabilidade de vias de sinalização que levam a múltiplas mudanças na célula em processo de morte. A morte celular está associada com a renovação de células danificadas ou de células que não recebem suporte do seu microambiente (fatores de sobrevivência). No curso da resposta imune, a morte celular neutraliza uma expansão clonal excessiva principalmente por dois mecanismos: privação de fatores de crescimento e pela morte celular induzida por ativação (AICD).

Palavras-chave: Apoptose, AICD, Morte Celular.

Apoptosis and activation-induced cell death (AICD)

Abstract

The cell death can be a physiological process, related with the phases of the development of the organism or with processes that involves the maintenance of this, or be a pathological process, which never is programmed and occurs after cellular injury or when it has involvement of the hemostasis. The apoptosis process is extremely important in the development, hemostasis, control of neoplasia and in the functions of the immune system, beyond the removal of defective, injured or reactive cells in excess. Apoptosis is a process in which the cell dies by programmed form without the presence of inflammation. There are evidences that all the animal cells express constitutently the proteins necessary to promote apoptosis, a complex process that involves a variability of signaling ways that take multiple changes in the cell in death process. The cell death is associated with the renewal of damaged

cells or cells that do not receive support from its microenvironment (survival factors). In the course of the immune response, the cell death mainly neutralizes excessive clonal expansion for two mechanisms: privation of factors of growth and for the Activation-Induced Cell Death (AICD).

Keywords: Apoptosis, AICD, Cell Death.

INTRODUÇÃO

O processo de morte celular pode ser fisiológico ou patológico. A morte celular fisiológica, morte celular programada (PCD- *Programmed Cell Death*), está relacionada com as fases do desenvolvimento do organismo ou com processos envolvidos na manutenção deste. Já a morte celular patológica nunca é programada, ela ocorre após injúria celular, quando a célula é mecanicamente corrompida, ou quando há comprometimento da homeostase, sendo esse processo de morte chamado de necrose (COHEN, 1991). O processo de apoptose é extremamente importante no desenvolvimento, homeostase, controle de neoplasias e nas funções do sistema imune (WAJANT, 2002), além da remoção de células em excesso, defeituosas, lesadas ou reativas (MARSDEN & STRASSER, 2003).

A revolução que ocorreu na pesquisa da apoptose é um resultado direto de um melhor entendimento do programa genético e dos mecanismos bioquímicos desse processo. Nas décadas de 70 e 80 do século XX, estudos revelaram que a apoptose não somente tem características morfológicas específicas, como também é regulada por processos bioquímicos específicos (HENGARTNER, 1997).

A morte celular está associada com a renovação de células danificadas ou de células que não recebem suporte do seu microambiente (fatores de sobrevivência). No curso da resposta imune, a morte celular neutraliza uma expansão clonal excessiva principalmente por dois mecanismos: privação de fatores de crescimento e pela morte celular induzida por ativação (AICD) (JANSSEN et al., 2000). Com relação a resposta imune, a memória imunológica é carregada por linfócitos T e B e durante o contato primário com o

antígeno a maioria dessas células são selecionadas para morrerem por apoptose e apenas poucas são selecionadas para gerar células de memória, com uma alta afinidade pelo antígeno (SPRENT, 1997). Essas células são marcadas por moléculas de adesão (marcadores de suas superfícies celulares) que interagem com fatores inibidores das funções pró-apoptóticas (CORY, 1995). O uso de modelos animais apropriados para imunizações tem mostrado claramente que há um delicado equilíbrio nas subpopulações de células T ativadas, o que influencia o resultado da vacinação, além de outros fatores como perfil de citocinas produzidas e a AICD.

REVISÃO DE LITERATURA

Apoptose

Em muitos órgãos e sistemas celulares há uma produção contínua de células devido a um processo de perda também contínua, tanto para o exterior (*turnover* de células intestinais e epiteliais) quanto por morte celular (*turnover* de neutrófilos) (COHEN, 1991). Essa capacidade que muitas células possuem, de poder controlar o seu tempo de vida por meio de um processo de morte celular programada (PCD), é chamado de apoptose (do grego *apo* – forma; *ptosis* – queda, como referência as folhas que caem das árvores) (NELSON & COX, 2005).

Em 1885, Flemming realizou a primeira descrição morfológica do processo natural de morte celular, atualmente conhecido como apoptose, um termo conferido por KERR et al. (1972) para descrever a morfologia única associada a morte celular que a difere de necrose. KERR et al (1972) descreveram a morfologia de amostras de células em PCD, processo inicialmente chamado de “necrose de encolhimento”, no qual a célula perde 30% do seu volume por perda de água.

Resumidamente, as principais características da apoptose são: processo no qual a célula morre de forma programada; os estágios iniciais envolvem a clivagem da cromatina e colapso nuclear; condensação do citoplasma e

mudanças na membrana plasmática para que a célula seja reconhecida e englobada por fagócitos, sem a presença de inflamação (SAVILL et al., 1990; COHEN, 1992; GOLSTEIN & COHEN, 1991; RAFF, 1992; JOHNSON et al., 1997).

Os eventos que carregam a apoptose diferem daqueles da necrose. O processo de necrose é primeiramente marcado pela perda da integridade da membrana celular. O citoplasma e a mitocôndria da célula em necrose estão aumentados, e a célula e muitas de suas organelas internas sofrem lise. Não há formação de vesículas ou corpos apoptóticos no processo de necrose, e este afeta grupos de células adjacentes, além de provocar um processo inflamatório in vivo. A apoptose não provoca uma resposta inflamatória, e somente células individuais são afetadas pela apoptose in vivo. Apoptose e necrose representam dois extremos de morte celular (LEIST & JÄÄTTELÄ, 2001).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada primeiramente por mudanças no índice de refração das células, seguido de retração do citoplasma e condensação nuclear (HENGARTNER, 1997). A característica ímpar da apoptose é a extrema condensação da cromatina no núcleo. O colapso da cromatina forma, ao redor do envelope nuclear, estruturas esféricas isoladas ou múltiplas (SAVILL et al., 1990). A condensação nuclear vista no processo de apoptose é resultado da clivagem de DNA por endonucleases endógenas específicas, resultando em fragmentos de DNA compostos por mono e oligonucleossomas (WYLLIE, 1980). O DNA é fragmentado em regiões marcadas entre nucleossomas e cores de histona, eventualmente espaçado em 180 a 200 pares de bases ao longo da dupla hélice do DNA. Essa clivagem do DNA é randomizada. Essa distribuição de fragmentos de DNA não é vista na necrose e, propicia um índice para estimar a apoptose em populações celulares ou em tecidos (SELLINS & COHEN, 1991). Ainda não se sabe porque o DNA é clivado. Certamente, isto ocorre para prevenir reparos a sérios danos ao DNA, porém, sessões na transcrição de mRNA, isoladamente, não levam à morte celular em horas, como é visto na apoptose. Embora a clivagem

internucleossomal do DNA seja uma característica da apoptose, é provável que ela não ocorra em todos os tipos celulares (SELLINS & COHEN, 1991).

O núcleo é o local onde ocorre as mudanças mais significativas na apoptose. Essas mudanças podem ser visualizadas nas células, usando-se corantes fluorescentes de DNA, como a Laranja de Acridina (CROMPTON et al., 1992).

Além da condensação do citoplasma e do núcleo, levando a uma redução do volume celular, também ocorre a formação de bolhas na membrana plasmática devido a filamentos do citoesqueleto que se alinham de forma paralela no citoplasma e o retículo endoplasmático dilata fusionando-se à membrana plasmática (JOHNSON et al., 1997). A membrana celular começa a apresentar bolhas ou pontos (protusões da membrana), dependendo do tipo de célula (WILLIAMSON et al., 2000). Essas alterações levam a um comprometimento da integridade da membrana plasmática, pela perda de assimetria dos fosfolipídios, das microvilosidades e das uniões célula-célula. Como consequência disto, a célula se dissocia das vizinhas, sofre redução de tamanho e formam-se pequenas protuberâncias separadas pela união das membranas intracitoplasmáticas para, posteriormente, serem separados em “corpos apoptóticos” que são rapidamente reconhecidos e fagocitados por células vizinhas ou macrófagos (JOHNSON et al., 1997).

Antes de morrer, a célula apoptótica sinaliza para ser fagocitada por células vizinhas ou por fagócitos. Isto permite que ela seja destruída antes de sofrer lise e liberar o seu conteúdo celular pró-inflamatório (SAVILL et al., 1990). Uma característica fundamental deste processo é que a membrana celular permanece intacta, prevenindo o extravasamento do conteúdo celular, assegurando assim uma resposta não inflamatória (SAVILL et al., 1990; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003). Bioquimicamente, ocorre a exposição de moléculas na superfície celular que vão sinalizar para a fagocitose da célula apoptótica, como a fosfatidilserina (presente na face interna da membrana celular, onde estão normalmente confinados) (FADOK et al., 1992; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003). Os macrófagos têm receptores para fosfatidilserina e os

usam para se ligarem à célula em apoptose (FADOK et al., 1992). Na apoptose, a membrana mitocondrial externa (MOM) também passa por mudanças que incluem a perda de seu gradiente eletroquímico, possivelmente pela formação de poros nessa membrana, e substâncias como o citocromo C deixam a MOM e passam para o citoplasma. Finalmente, células adjacentes ou macrófagos fagocitam os corpos apoptóticos e as células mortas (LEIST & JÄÄTTELÄ, 2001).

Nas décadas de 70 e 80 do século XX, estudos revelaram que a apoptose não somente tem características morfológicas específicas, como também é regulada por processos bioquímicos específicos. Estudos com linhagens celulares do nematóide *Caenorhabditis elegans* contribuíram para o melhor entendimento dos mecanismos da apoptose (HENGARTNER, 1997).

A via final da apoptose é o resultado da ativação de endonucleases que levam à fragmentação do DNA. O processo de apoptose é controlado geneticamente, havendo genes que podem promovê-lo ou inibi-lo (GUPTA, 1996). Esta via genética de eliminação celular pode responder a estímulos normais e patológicos (MARSDEN & STRASSER, 2003). Genes individuais têm sido associados à apoptose de duas formas: ou eles estão expressos em células em processo de apoptose ou eles modulam os efeitos do processo. Entre esses genes, o proto-oncogene *c-myc* participa da regulação para proliferação celular ou para apoptose. Esse gene programa a célula para crescer, e se esse procedimento for impedido (por falta de fatores de crescimento, ou por oncogenes secundários) a célula entra em processo de morte. A expressão de *c-myc* é necessária para o processo de apoptose (EVAN et al., 1992).

Estudos realizados *in vitro* por TAMAOKI & NAKANO (1990) mostraram evidências de que todas as células animais expressam constitutivamente as proteínas necessárias para sofrer apoptose. A apoptose é um processo complexo que envolve uma variabilidade de vias de sinalização que levam a múltiplas mudanças na célula em processo de morte (ALNEMRI et al., 1996;

CARDONE et al., 1998). As vias fundamentais da apoptose têm sido conservadas ao longo da evolução (CRABTREE, 1989).

Mecanismos de Apoptose

Na década de 80 do século XX, vários experimentos mutagênicos foram realizados em larga escala com o nematóide *C. elegans*, através dos quais foi possível identificar mutações que interrompem a PCD, os genes de morte celular anormal (genes *ced* - *cell death*) (HEDGECOCK et al. 1983; ELLIS & HORVITZ, 1986). Análises genéticas mostraram que um determinado gene, o *ced-3*, foi fundamentalmente requerido para a apoptose no *C. elegans*. O gene *ced-3* foi clonado e descobriu-se que ele codifica uma proteína que contém um resíduo de cisteína no sítio de atividade e que cliva seu substrato depois do aminoácido aspartato (cysteine + aspartate = *caspase*) (YUAN et al. 1993).

As caspases constituem uma grande família de proteínas que são altamente conservadas em organismos multicelulares. Essa família pode ser dividida em duas subfamílias: caspases que estão envolvidas no processo da inflamação e tem homologia com a caspase-1 (*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*) e as caspases que estão relacionadas ao *ced-3* e estão primariamente envolvidas na apoptose (CSISZAR, 2004).

As caspases são, direta ou indiretamente, responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas que caracterizam o processo da apoptose (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998; REED, 2000). A maquinaria efetora de morte celular direcionada pela família de caspases cliva muitas proteínas celulares vitais, e ativa proteoliticamente enzimas que contribuem para a destruição celular (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Algumas vias de tradução de sinal e de ativação da maquinaria de morte celular têm sido identificadas, demonstrando-se que há vias de ligação entre o estímulo externo e a resposta celular, seja ela de morte ou de sobrevivência (REED, 2000).

Muitas caspases estão presentes constitutivamente em células normais, como pró-enzimas cataliticamente inativas (zimogênios) e que são proteoliticamente processados antes de adquirirem atividade total em resposta

a sinais programados e também a estímulos de estresse que induzem apoptose (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Os zimogênios contêm muitos domínios, com predominância de um domínio N-terminal. A ativação das caspases envolve a clivagem dos zimogênios em uma região ácido aspártico específica na região entre as subunidades maiores e menores. O sítio de atividade é formado por um heterodímero contendo uma subunidade maior e uma menor, e a proteína caspase de atividade completa é um tetrâmero composto por dois heterodímeros (CSISZAR, 2004).

Diversos reguladores de caspases também têm sido descobertos, incluindo ativadores e inibidores dessas proteases (REED, 2000). As proteínas inibidoras de apoptose (IAP - inhibitor of apoptosis proteins) suprimem a apoptose por bloquear a atividade das caspases. Essa supressão pode ser realizada pela Smac/DIABLO, uma proteína mitocondrial liberada no citosol em resposta a um estímulo apoptótico (FESIK & SHI, 2001).

As caspases são consideradas as executoras da apoptose, uma vez que sua ativação leva à clivagem de importantes substratos celulares. Em linfócitos T maduros, a apoptose induzida por falta de fatores de crescimento e a morte celular induzida por ativação são mediadas por estes complexos enzimáticos (DE ALBORÁN et al., 2003).

Outro gene identificado no *C. elegans* é o gene *ced-9*, que protege contra a apoptose. A perda genética da sua função aumenta o índice de apoptose (HENGARTNER et al. 1997). A proteína codificada pelo *ced-9* é homóloga à do gene *bcl-2* em mamíferos, um proto-oncogene (TSUJIMOTO & CROCE, 1986).

A família de proteínas Bcl-2 inclui um grande número de proteínas que compartilham domínios Bcl-2 homólogos (BH). Estruturalmente, as proteínas Bcl-2 podem ser divididas em três grupos: grupo I inclui proteínas Bcl-2 que são anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 e A1), e os grupos II e III os membros que são pró-apoptóticos. Os membros do grupo II (Bax, Bak e Bok) contêm três domínios BH (BH-1, BH-2 e BH-3) e os do grupo III (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa e Puma) possuem somente um domínio, o BH-3 ("*BH3-only*").

Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 estão implicados na permeabilidade da MOM, permitindo a saída de proteínas para o citoplasma, como a citocromo C. os membros anti-apoptóticos dessa família, como o Bcl-2, protege as células do processo de apoptose por meio do seqüestro de proteínas pró-apoptóticas ou por interferir em suas atividades (DANIEL et al. 2003; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003).

Vias de Ativação da Apoptose

A apoptose mediada pela família das caspases é o principal tipo de morte celular programada em muitos processos fisiológicos (ALNEMRI et al., 1996; CARDONE et al., 1998). Este fato poderia ser perigoso para o organismo, uma vez que dependeria de uma só família de proteases para a remoção de células não desejadas e que são potencialmente perigosas. Entretanto, alguns estudos indicam que a PDC pode ocorrer na completa ausência de caspases, como no caso de dano de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático ou lisossomos, que aumentam a liberação de cálcio e algumas espécies de radicais livres de oxigênio, além da liberação de proteínas efetoras (JÄÄTTELA & TSCHOPP, 2003).

Embora possam existir muitas vias para ativação das caspases, unicamente duas vias foram bem elucidadas detalhadamente, a via intrínseca, mitocondrial, e a via extrínseca, que é ativada por ligações nos “receptores de morte” (WALLACH et al., 1998; SALVENSEN & DIXIT, 1997; REED, 2000; WAJANT, 2002). Outros estudos ainda sugerem uma terceira via para a ativação da apoptose, a qual envolveria o retículo endoplasmático (NAKAGAWA et al. 2000).

A apoptose induzida em resposta a estímulos externos (via extrínseca) inclui a ativação de receptores de superfície celular como Fas (também chamado CD95 ou Apo-1), TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*, também chamado p55 ou CD120a), TRAIL-R1 (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1*), TRAIL-R2, p75-NGFR (*p75-nerve growth factor receptor*) (WAJANT et al. 2003) e outros como CAR1, DR3 (também chamado Apo3, WSL-1,

TRAMP ou LARD) (CHINNAIYAN et al., 1996), DR4 e DR5 (também chamado Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2 ou KILLER) (SMITH et al., 1995). Esses “receptores de morte” transmitem sinais apoptóticos iniciados por ligantes específicos e podem ativar as caspases em segundos, causando eliminação apoptótica da célula em horas (ASHKENAZI & DIXIT, 1998). Os receptores de morte têm dois motivos distintos para sinalização: o domínio de morte (DD) e o domínio efetor de morte (DED), que permitem interagir com outras proteínas envolvidas na cascata da apoptose. Tipicamente, a via extrínseca envolve a ativação e a iniciação das caspases, principalmente da caspase-8, a qual ativa a caspase-3 ou cliva o membro da família Bcl-2, Bid, levando à formação de uma apoptosoma e ativação da caspase-9 (HENGARTNER, 1997).

A sinalização extrínseca na superfície celular pode ser iniciada pela agregação dos receptores Fas quando eles se ligam ao seu ligante multivalente, FasL (*Fas Ligand*). Essa agregação libera no citoplasma os domínios dos receptores de membrana em contato próximo e induz a mudanças conformacionais que permitem a montagem de uma sinalização complexa, o complexo de sinalização de morte induzida (DISC - *death inducing signaling complex*), na cauda citoplasmática dos receptores. Alguns estudos sugerem que os receptores de morte podem ser pré-agregados na membrana através de interações com pré-ligantes de domínios montados (PLAD - *pre-ligand-binding assembly domains*) (CHAN et al. 2000; SIEGEL, et al. 2000). Os DISC compreendem os receptores e ligantes como “adaptadores” de proteínas, FADD (*Fas associated death domain protein*) que se liga através do DD c-terminal ao receptor ligante e recruta a pró-caspase-8. O Fas é uma proteína de membrana homóloga aos receptores de fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento neural (NGF) (ITOH et al., 1991; OEHM et al., 1992).

O sistema Fas/FasL tem um papel muito importante porque é o mediador de três tipos de morte celular fisiológica: deleção periférica de células T ativadas ao final de uma resposta imune; morte de células infectadas por vírus ou células cancerígenas por células T citotóxicas e por células assassinas naturais (NK – natural killers); e por último, morte de células inflamatórias em

sítios imunologicamente privilegiados como olho, testículo e ovário (ASHKENAZI & DIXIT, 1998).

A via mitocondrial (via intrínseca) envolve os membros da família de proteínas Bcl-2, e pode ser ativada pelos receptores de morte ou por estímulos que são independentes dos receptores de morte, como eventos relacionados a dano ao DNA, inibição de topoisomeases, retirada de fatores tróficos e liberação do citocromo C da mitocôndria (RICH et al. 1999; PARONE et al. 2003).

Alguns membros da família Bcl-2, como Bax, Bad e Bid, regulam uma variedade de mecanismos que incluem o processamento proteolítico, fosforilação e seqüestramento por inibição de proteínas. Sinais pró-apoptóticos direcionados pelos membros da família Bcl-2 para a mitocôndria interagem com os membros anti-apoptóticos dessa mesma família (Bcl-2 e Bcl-XL) para determinar se a apoptose será ou não iniciada. Se as proteínas pró-apoptóticas se sobressaem, o citocromo C e outras moléculas são liberadas da MOM. Uma vez que o citocromo C é liberado da mitocôndria, ele pode interagir com Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*, um homólogo em mamíferos da *C. elegans* CED-4), dATP (*2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate*) e pró-caspase-9 em um complexo de proteínas chamado de apoptosoma. A caspase-9 é processada e ativada como parte do apoptosoma, onde pode clivar e ativar a caspase-3. (ZOU et al. 1997).

A família de proteínas Bcl-2 representa um ponto crítico na via intrínseca, pois a expressão de bcl-2 aumenta a resistência de linfócitos para muitos estímulos de morte, incluindo diminuição de citocina, dano ao DNA e estresse oxidativo (HOCKENBERY et al., 1990; HOCKENBERY et al., 1993)

Morte Celular Induzida por Ativação (AICD)

A morte celular está associada com a renovação de células danificadas ou de células que não recebem suporte do seu microambiente (fatores de sobrevivência). No curso da resposta imune, a morte celular neutraliza uma expansão clonal excessiva principalmente por dois mecanismos: privação de

fatores de crescimento e morte celular induzida por ativação (AICD) (JANSSEN et al., 2000).

A AICD é um processo que regula a duração e a intensidade da resposta imune primária de células T (GENESTIER et al., 1999). AICD em células T in vivo tem sido proposta primeiro como forma de limitar a expansão da resposta imune por eliminação de células efetoras que não são mais necessárias, e também para eliminar a auto-reatividade de células T que tenham escapado da seleção tímica (LYNCH et al., 1995). Tem sido sugerido que a persistência de células T de memória é dependente de períodos de re-estimulação por antígenos específicos ou reatividade cruzada (BEVERLEY, 1990; GRAY & MATZINGER, 1991). A AICD ocorre nas células T após o reconhecimento do antígeno, a união de um anticorpo a seu antígeno receptor ou exposição a mitógenos (GREEN & SCOTT, 1994). As células T que sofrem AICD apresentam as mudanças morfológicas típicas associadas à apoptose (JANSSEN et al., 2000).

GROSSMAN et al. (2004) consideram que o número, a freqüência e a eficácia das doses requeridas para que um programa de vacinação alcance uma efetividade prolongada, deverá otimizar o equilíbrio entre as populações de células efetoras e aquelas com grande capacidade para expansão clonal. Isso garante uma memória imunológica, uma vez que a estimulação antigênica repetida pode ser um potente estímulo para a apoptose, causando imunodepressão mais do que memória imunológica.

A AICD de células T depende do estado de ativação da célula, ou seja, células T ativadas recentemente são resistentes à indução de apoptose e esta resistência inicial precede a um posterior fenótipo sensível. Este processo representa a fase de diminuição da resposta imune e a eliminação de clones reativos. Somente poucas células T sobrevivem como células de memória. A AICD ocorre por mecanismos suicidas ou fratricidas, envolvendo prematuramente o sistema Fas após estimulação do receptor de células T (TCR), e o TNF-R2 nos estágios posteriores. A importância do sistema Fas/FasL para AICD foi demonstrada pelo descobrimento de um receptor solúvel

chamado DcR3, que se liga ao FasL inibindo a apoptose quando induzida por este fator (SCAFFIDI et al., 1999). AICD ocorre como uma consequência de um estímulo através do CD3/TCR das células T (ITOH et al., 1991; RUSSEL et al., 1993). A interação entre Fas e Fas-L está envolvida na apoptose induzida pelo TCR/CD3 na célula T, como foi demonstrado nos estudos realizados por DEHIN et al. (1995) e YANG et al. (1995). As evidências de que AICD de células T é mediada por Fas-FasL foi demonstrada em muitos grupos de células T de hibridomas, células T de linhagem leucêmica Jurkat e células T pré-ativadas não transformadas (DEHIN et al., 1995; JU et al., 1995), sendo que os estudos in vitro com células Jurkat é tido como o sistema modelo de avaliação da AICD via ativação do complexo TCR/CD3 (RUIZ, 1997).

Estudos usando *c-myc* (SHI et al., 1992) ou domínios recíprocos negativos mutantes de Myc ou Max (BISSONNETTE et al., 1994), os quais antagonizam a função do heterodímero Myc/Max, demonstraram que a função do c-Myc é requerida para AICD em células T (GENESTIER, et al., 1999). Foi também observado que em células T de linhagens leucêmicas humanas e em outros tipos de células linfóides, a expressão de *c-myc* é fundamental para proteger essas células da indução de apoptose (THULASI et al., 1993; FISCHER et al., 1994).

A expressão de FasL durante a AICD requer a ativação de fatores de transcrição. HUEBER et al. (1997) reportaram que a apoptose induzida por *c-myc* requer a expressão de Fas e FasL. Entretanto GENESTIER, et al. (1999) sugerem que c-Myc pode ser essencial para a função do FasL e subsequente apoptose em alguns sistemas, e que TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor*) inibe a expressão de FasL via *down-regulation* da expressão de *c-myc* mRNA, e que o requerimento de c-Myc durante a AICD pode ser ao nível da expressão de FasL. NGUYEN & RUSSELL (2001) discutem que algumas células T que expressam altos níveis de FasL podem entrar em processo de AICD, enquanto outras expressam baixos níveis de FasL são sensíveis à AICD, sugerindo que a susceptibilidade da AICD não está correlacionada com a cinética de “*up*” ou “*down-regulation*” de FasL.

O processo de AICD pode ocorrer em células T imaturas ou em células transformadas, assim como também em células T maduras e ativadas de sangue periférico (JONES et al., 1990; NEWELL et al., 1990; WESSELBORG et al., 1993; THOME et al., 1997; KRAMMER, 2000; HILDEMAN et al., 2002; CHEN et al., 2003). Isolados frescos de linfócitos T esplênicos são relativamente resistentes à indução de AICD desenvolvida via TCR ou à associação do complexo CD3, embora a pré-ativação via complexo TCR/CD3 as torna susceptíveis (OWEN-SCAUB et al., 1992).

Os linfócitos usam vários mecanismos para iniciar a morte celular na fase de declínio da resposta imune. Além do sistema Fas/FasL, outro mecanismo que ajuda na resolução de uma resposta imune seriam os sinais traduzidos pelo receptor do antígeno e as moléculas co-estimulatórias (TCR/CD3) que começam a diminuir, levando conseqüentemente a uma diminuição na interação com as células apresentadoras de antígeno. Esta diminuição dos sinais leva à redução na expressão de moléculas anti-apoptóticas e aumento nas pró-apoptóticas. Então, tanto os receptores de morte quanto o desequilíbrio entre proteínas pró e anti-apoptóticas seriam os responsáveis pela diminuição dos linfócitos antígeno-específicos originados durante uma resposta imune adaptativa (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003).

Em linfócitos existem vários sinais inibitórios que evitam a morte celular, por exemplo, vários membros da família de interleucinas têm mostrado que possuem atividade anti-apoptóticas. A exposição de uma célula T a um estímulo antigênico origina sua ativação, e como conseqüência, se produz um aumento na síntese de receptores de citocinas que se dispõem na membrana plasmática, bem como um aumento na síntese de citocinas que regulam o crescimento, proliferação, diferenciação e apoptose das células T e de outras células do sistema imune (CRABTREE, 1989). A IL-2, por exemplo, atua na ativação e proliferação de células T e também protege estas células pelo aumento da expressão de Bcl-2, mas também podem mediar a morte celular (AYROLD et al., 1998). A IL-12 é uma citocina imunoregulatória, estimula a produção e secreção de muitas outras citocinas, especialmente interferon

gama (IFN- γ) (WU et al., 1993). Uma importante atividade da IL-12, agindo juntamente com o IFN- γ , é direcionar a resposta imune para um fenótipo mais Th1 ou Th2 (O'GARRA, 1998). VARADHACHARY et al. (1997) analisaram clones de células T para sua susceptibilidade a AICD em resposta a ligação CD3/TCR. Eles observaram que AICD ocorreu somente em clones Th1, mediada pelo Fas, e os clones Th2 resistiram a AICD.

SANCHEZ (2004) demonstrou que linfócitos T SBm7462-reativos, de camundongos BALB/c imunizados por via subcutânea com o peptídeo sintético anti-carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SBm7462), expressam constitutivamente a maquinaria necessária para a indução de apoptose após ativação com o antígeno, e que o processo de síntese de novo de proteínas não está envolvido na AICD após sinalização via TCR, sendo a AICD induzida pelo peptídeo sintético SBm7462 mediada por uma via independente da calcineurina, não havendo a inibição do gene *c-myc* após re-estimulação dos linfócitos. CARVALHO (2007) após obter uma linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo SBm7462 por via oral e nasal, observou que ocorreu indução da AICD por inibição da expressão do *c-myc* e por aumento da expressão de Fas após estímulo via TCR. A AICD foi mediada por uma via independente da calcineurina e da cinética de regulação do FasL, para esses clones de linfócitos T (CARVALHO, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No curso da resposta imune, a morte celular neutraliza uma expansão clonal excessiva principalmente por dois mecanismos: privação de fatores de crescimento e pela morte celular induzida por ativação (AICD). Como a morte de linfócitos induzida por ativação está diretamente relacionada à geração da memória imunológica e à manutenção da homeostase desse sistema, mais estudos se fazem necessário para avaliar a indução de apoptose em órgãos linfóides, além do perfil de citocinas produzidas e a indução ou inibição da AICD após o reconhecimento de antígenos.

REFERÊNCIAS

- ALNEMRI, E. S., LIVINGSTON, D. J., NICHOLSON, D. W., SALVESEN, G., THORNBERRY, N. A., WONG, W. W., YUAN, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell**. 87:171.
- ASHKENAZI, A., DIXIT, V. M. 1998. Death Receptors: signaling and modulation. **Science**. 281, 1305-1308.
- AYROLDI, E., ZOLLO, O., CANNARILE, L., D'ADAMIO, F., GROHMANN, U., DELFINO, D.V., RICCARDI, C. 1998. Interleukin-6(IL-6) prevents activation-induced cell death: IL-2-independent inhibition of Fas/FasL expression and cell death. **Blood**. 92: 4212-4219.
- BEVERLEY, P. C. 1990. Is T-cell memory maintained by crossreactiv estimation? **Immunology Today**. 11:203-205.
- BISSONNETTE, R. P., MCGAHON, A., MAHBOUBI, A., GREEN, D. R.. 1994. Functional Myc-Max heterodimer is required for activation-induced apoptosis in T cell hybridomas. **Journal of Experimental Medicine**. 180:2413-2418.
- CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S., REED, J. C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**. 282: 1318-1321.
- CARVALHO, G. D., PANIAGO, J. D. G., CARVALHO, P. H., ROCHA, H. G. R., SALGADO, B. S., PECONICK, A. P., MEDEIROS, C. L., PATARROYO, J.; VARGAS, M. 2007. **Obtenção de linhagem de linfócitos T SBm7462-reativos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético anti-carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (SBm7462)* por via oral e nasal**. In: XVII Simpósio de Iniciação Científica (SIC), VII SIMPÓS - Mostra Científica da Pós-graduação, V Simpósio de Extensão Universitária e I Simpósio de Ensino - UFV, 2007.
- CARVALHO, G. D. **Estudo "in vitro" da apoptose induzida em linfócitos de camundongos BALB/c imunizados com o peptídeo sintético anti-carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (SBm7462)* por via oral e nasal**. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CHAN, F. K., CHUN, H. J., ZHENG, L., SIEGEL, R. M., BUI, K. L., LENARDO, M. J. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. **Science**. 288: 2351-2354.
- CHEN, A., ZHENG, G., TYKOCINSKI, M. L. 2003. Quantitative interplay between activating and pro-apoptotic signals dictates T cell responses. **Cellular Immunology**. 221, 128-137.
- CHINNAIYAN, A. M., O'ROUKE, K., YU, G.-L., LYONS, R. H., GARG, M., DUAN, D. R., XING, L., GENTZ, R., NI, J., DIXIT, V. M. 1996 Signal Transduction by DR3, a Death Domain-Containing Receptor Related to TNRF-1 and CD95. **Science**. 274: 990.
- COHEN, J. J. 1991. Programmed cell death in the immune system. **Advances in immunology**. 50:55-85.
- COHEN, J. J. 1992. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. **Chest**. 103: 99-101.
- CORY, S. 1995. Regulation of lymphocyte survival by the *bcl-2* gene family. **Annual Review of Immunology**. 13: 513-544.
- CRABTREE, G. R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. **Science**. 243: 355-361.
- CROMPTON, T., PEITSCH, M. C., MACDONALD, H. R., TSCHOPP, J. 1992. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 183: 532-537.

- CSISZAR, A., UNGVARI, Z., KOLLER, A., EDWARDS, J. G., KALEY, G. 2004. Proinflammatory phenotype of coronary arteries promotes endothelial apoptosis in ageing. **Physiological Genomics**. 17: 21-30.
- DANIEL, P. T., SCHULZE-OSTHOFF, K., BELKA, C., GÜNER, D. 2003. Guardians of cell death: The Bcl-2 family proteins. **Essays in Biochemistry**. 39: 73-88.
- DE ALBORÁN, I. M., ROBLES, M. S., BRAS, A., BAENA, E. MARTÍNEZ, A. C. 2003. Cell death during lymphocyte development and activation. **Seminars in Immunology**. 15, 125-133.
- DHEIN, J., WALCKZAK, H., BÄUMLER, C., DEBATIN, K. M. KRAMMER, P. H. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(fas/CD95). **Nature**. 373, 438-441.
- ELLIS, H. M., HORVITZ, H. R. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. **Cell**. 44: 817-829.
- EVAN, G. I., WYLLIE, A. H., GILBERT, C. S., LITTLEWOOD, T. D., LAND, H. 1992. **Cell**. 69, 119-128.
- FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L., HENSON, P. M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**. 148: 2207-2216.
- FESIK, S. W., SHI, Y. 2001. Structural Biology: Controlling the Caspases. **Science**. 294(5546): 1477 – 1478.
- FISCHER, G., KENT, S. C., JOSEPH, L., GREEN, D. R., SCOTT, D. W. 1994. Lymphoma models for B cell activation and tolerance. X. Anti-MIU-mediated growth arrest and apoptosis of murine B cell lymphomas is prevented by the stabilization of myc. **Journal of Experimental Medical**. 179: 221-228.
- GENESTIER, L., KASIBHATLA, S., BRUNNER, T., GREEN, D. R. 1999. Transforming Growth Factor β 1 Inhibits Fas Ligand expression and subsequent Activation-induced Cell Death in T cells via downregulation of c-Myc. **Journal of Experimental Medicine**. 189(2): 231-239.
- GOLSTEIN, P., OJCIUS, D. M., YOUNG, D. E. 1991. Cell death mechanisms and the immune system. **Immunology Review**. 121:29-65.
- GRAY, D., MATZINGER, P. 1991. T cell memory is shortlived in the absence of antigen. **Journal of Experimental Medicine**. 174: 969-974.
- GREEN, D. R., SCOTT, D. W. 1994. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**. 6: 476-487.
- GROSSMAN, Z.; MIN, B.; MEIER-SCHELLERSHEIM, M. PAUL, W. 2004. Concomitant regulation of T-cell activation and homeostasis. **Nature Reviews of Immunology**. 4: 387-395.
- GUPTA, S. 1996. **Apoptosis/Programmed Cell Death: A historical Perspective**. In: P. Press (Ed) Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation VI, Vol. 406. Plenum Publishing Corporation, New York, p. 270.
- HEDGECOCK, E. M., SULSTON, J. E, THOMSON, J. N. 1983. Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**. 220:1277-9.
- HENGARTNER, M.O. 1997. **Programmed Cell Death**. In: *C. elegans* II. Riddle, D. L. et al. eds. 383-496. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1997.
- HILDEMAN, D. A., ZHU, Y., MITCHELL, T. C., KAPPLER, J., MARRACK, P. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. **Current Opinion in Immunology**. 14, 354-359.
- HOCKENBERY, D., NUNEZ, G., MILLIMAN, C., SCHREIBER, R. D., KORSMEYER, J. T. 1990. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**. 348: 334-336.

- HOCKENBERY, D. M., OLTVAI, Z. N., YIN, X. M., MILLIMAN, C. L., KORSMEYER, S. J. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**. 75: 241-251.
- HUEBER, A. O., ZORNIG, M., LYON, D., SUDA, T., NAGATA, S., EVAN, G. I. 1997. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. **Science**. 278:1305-1309.
- ITOH, N., YONEHARA, S., ISHII, A., YONEHARA, M., MIZUSHIMA, S., SAMESHIMA, M., HASE, A., SETO, Y., NAGATA, S. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell** 66: 223-243.
- JÄÄTTELÄ, M., TSCHOPP, J. 2003. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. **Nature immunology**. 4: 416-422.
- JANSSEN, O., SANZENBACHER, R., KABELITZ, D. 2000. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. **Cell Tissue Research**. 301: 85-99.
- JONES, L. A., CHIN, L. T., LONGO, D. L., KRUISBEEK, A. M. 1990. Peripheral clonal elimination of functional T cells. **Science**. 250: 1726-1729.
- JOHNSON, S., HARRISON, D. J., WYLLIE, A. H. 1997. **Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease**. In: Kaufmann, S. H. (Ed) Apoptosis: Pharmacologic implications and therapeutic opportunities, Vol. 41. Academic Press, Rochester, Minnesota. 1997.
- JU, S. T., PANKA, D. J., CUI, H., ETTINGER, R., EL-KHATIB, M., SHERR, D. H., STANGER, B. Z., HARSHAK-ROTHSTEIN, A. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. **Nature**. 373: 444-448.
- KERR, J. F. R., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. 26:239-57.
- KRAMMER, P. H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**. 407: 789-795.
- LEIST, M., JÄÄTTELÄ, M. 2001. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 2: 589-598.
- LYNCH, D.H., RAMSDELL, F., ALDERSON, M.R. 1995. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. **Immunology Today**. 16:569-574.
- MARSDEN, V. S., STRASSER, A. 2003. Control of apoptosis in the immune system: Bcl2, BH3-Only proteins and More. **Annual Review of Immunology**. 21: 71-105.
- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B. A., Yuan, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid beta. **Nature**. 403: 98-103.
- NELSON, D. L., COX, M. M. 2005. **Biosignaling** p.473-474. In: Lehninger: Principles of Biochemistry. 4 ed. New York : W. H. Freeman and Company. 1119 p.
- NEWELL, M. K., HAUGHN, L. J., MAROUN, C. R., JULIUS, M. H. 1990. Death of mature cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. **Nature**. 347: 286-289.
- NGUYEN, T., RUSSELL, J. 2001. The regulation of FasL expression during activation-induced cell death (AICD). **Immunology**. 103: 426-434.
- O'GARRA, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T-helper cell subsets. **Immunity**. 8: 275-283.
- OEHM, A. BEHRMANN, I., FALK, W. PAWLITA, M., MAIER, G. Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., Postinger, H., Krammer, P. H. 1992. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. **Journal of Biological Chemistry**. 267, 10709-10715.

OPFERMAN, J. T., KORSMEYER, S. J. 2003. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nature Immunology**. 4: 410-415.

OWEN-SCHAUB, L. B., YONEHARA, S., CRUMP, W. L. R., GRIMM, E. A. 1992. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. **Cell Immunology**. 140: 197-205.

PARONE, P. PRIAULT, M., JAMES, D., NOTHWEHR, S. F., MARTINOU, J. C. 2003. **Apoptosis: Bombarding the mitochondria**. In: Essays in Biochemistry: Programmed Cell DEATH. COTTER, T. *et al.* eds. 39, 41-51. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

RAFF, M. C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**. 356: 397-400.

REED, J. C. 2000. Warner Lambert/Parke Davis award lecture: mechanisms of apoptosis. **American Journal of Pathology**. 157: 1415-1430.

Rich, T., Watson, C. J., Wyllie, A. 1999 Apoptosis: The germs of death. **Nature Cell Biology**. 1: 69-71.

RUIZ, M. D. C. R. 1997. Identificación y estudio de moléculas de la superficie de células T con capacidad de inducir apoptosis. **Tesis de doctorado**. Granada: Universidad de Granada, 155p.

RUSSEL, J. H., RUSH, B., WEAVER, C., WANG, R. 1993. Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 90: 4409-4413.

SALVENSEN, G. S., DIXIT, V. M. 1997. Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis. **Cell**. 91: 443-446.

SANCHEZ, I. X. B. 2004. Estudo "in vitro" da apoptose induzida em linfócitos de camundongos (Balb/c) imunizados com o peptídeo sintético SBm7462. **Dissertação (mestrado)**. Viçosa: UFV, 79p.

SAVILL, J. S., DRANSFIELD, I., HOGG, N., HASLETT, C. 1990. Vitronectin receptormediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Nature**. 343: 170-173.

SELLINS, K. S., COHEN, J. J. 1991. Cytotoxic T lymphocytes induce different types of DNA damage in target cells of different origins. **Journal of Immunology**. 147: 795-803.

SHI, Y., GLYNN, J. M., GUILBERT, L. J., COTTER, T. G., BISSONNETTE, R. P., GREEN, D. R.. 1992. Role for c-myc in activationinduced apoptotic cell death in T cell hybridomas. **Science**. 257:212-214.

SIEGEL, R. M., FREDERIKSEN, J. K., ZACHARIAS, D. A., CHAN, F. K. M., JOHNSON, M., LYNCH, D., TSIEN, R. Y., LENARDO, M. J. 2000. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. **Science**. 288: 2354-2362.

SMITH, M. L., CHEN, I. T., ZHAN, Q., O'CONNOR, P. M., FORNACE, A. J. 1995. Involvement of the p53 tumor suppressor gene in repair of UV-type DNA damage. **Oncogene**. 10: 1053-1059.

SPRENT, J. 1997. Immunological memory. **Current Opinion in Immunology**. 9: 371-379.

TAMAOKI, T., NAKANO, H. 1990. Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. **Bio Technology**. 8: 732-735.

THOME, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., FICKENSCHER, H., MEINL, E., NEIPEL, F., MATTMANN, C., BURNS, K., BODMER, J. L., SCHROTER, M., SCAFFIDI, C., KRAMMER, P. H., PETER, M. E., TSCHOPP, J. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. **Nature**. 386: 517-521.

THORNBERRY, N. A., LAZEBNIK, Y. 1998. Caspases: enemies within. **Science**. 281: 1312-1316.

THULASI, R., HARBOUR, D. V., THOMPSON, E. B. 1993. Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. **Journal of Biological Chemistry**. 268: 18306-18312.

TSUJIMOTO, Y., CROCE, C. M. 1986. Analysis of the structure of transcripts and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. 83: 5214-5218.

VARADHACHARY, A. S., PERDOW, S. N., HU, C., RAMANARAYANAN, M., SALGAME, P. 1997. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. **Immunology**. 94: 5778-5783.

WAJANT, H. 2002. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. **Science**. 296(5573): 1635-1636.

WAJANT, H. *et al.* (2003) Death Receptors. In: *Essays in Biochemistry*. Cotter, T. *et al.* eds. 39: 53-71. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

WALLACH, D., KOVALENKO, A. V., VARFOLOMEEV, E. E., BOLDIN, M. P. 1998. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. **Current Opinion in Immunology**. 10: 279-288.

WESSELBORG, S., JANSSEN, O., KABELITZ, D. 1993. Induction of activation-driven death(apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. **Journal of Immunology**. 150: 4338-4345.

WILLIAMSON, P., VAN-DEN EIJNDE, S., SCHLEGEL, R. A. 2000. Phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic cells. **Methods in Cell Biology**. 66: 339-64.

WU, C. Y., DEMEURE, C., KINIWA, M., GATELY, M., Delespesse, G. 1993. IL-12 induces the production of IFN- γ by neonatal human CD4 T cells. **Journal of Immunology**. 151: 1938-1949.

WYLLIE, A. H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous nuclease activation. **Nature**. 284: 555-556.

YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H. M., HORVITZ, H. R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. **Cell** 75: 641-52.

ZOU, H., HENZEL, W. J., LIU, X., LUTSCHG, A., WANG, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome-c dependent activation of caspase-3. **Cell**. 90: 405-413.