

LA APOPTOSIS EN BIOLOGIA Y PATOLOGIA.

Dr. Rolando Calderón Velasco*

INTRODUCCION

En 1972, Jhon Kerr, Andrew Wyllie y Alistar Currie, publicaron en el British Journal of Cancer(1) un artículo pionero escribiendo una forma de muerte celular a la que denominaron apoptosis, nombre tomado del griego que significa la caída de los pétalos de una flor, que es hoy día uno de los tópicos más estudiados en biología. Los autores escribieron sobre una forma de muerte celular, un suicidio celular programado que es diferente del conocido proceso de muerte celular denominado necrosis. La necrosis se produce cuando una célula recibe una injuria aguda y se rompe, produciendo inflamación de los tejidos circundantes y dejando restos celulares que son limpiados por células que acuden a la lesión.

La muerte celular programada, por el contrario, es limpia y rápida y causa cambios estructurales que hacen que la célula se encoja y sea rápidamente digerida por las células vecinas. Este aspecto ha sido revisado recientemente(2). Las células que van a morir despliegan señales que atraen a los macrófagos. Una de esas señales es la fosfatidil serina (FS), un fosfolípido normalmente limitado a la parte interna de la membrana celular, que, en esta oportunidad, es desplegado en la parte externa. Un receptor en los macrófagos reconoce la FS y orquesta la desaparición de la célula «suicidada».

Por mucho tiempo se ha entendido que este suicidio celular juega un rol importante en esculpir los tejidos en el embrión en desarrollo(3), por ejemplo, la formación de los dedos de las manos y de los pies en el feto requiere la remoción por apoptosis de la membrana que los une. La apoptosis juega un papel amplio en los procesos de la vida normal y su falla contribuye a una variedad de enfermedades, como veremos más adelante, incluyendo entre ellas al cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y la autoinmunidad.

ANTECEDENTES HISTORICOS.

La muerte celular comenzó a considerarse como un fenómeno fisiológico importante dentro del desarrollo del organismo poco después del descubrimiento, a mediados del siglo XIX, de que los organismos están compuestos por células.

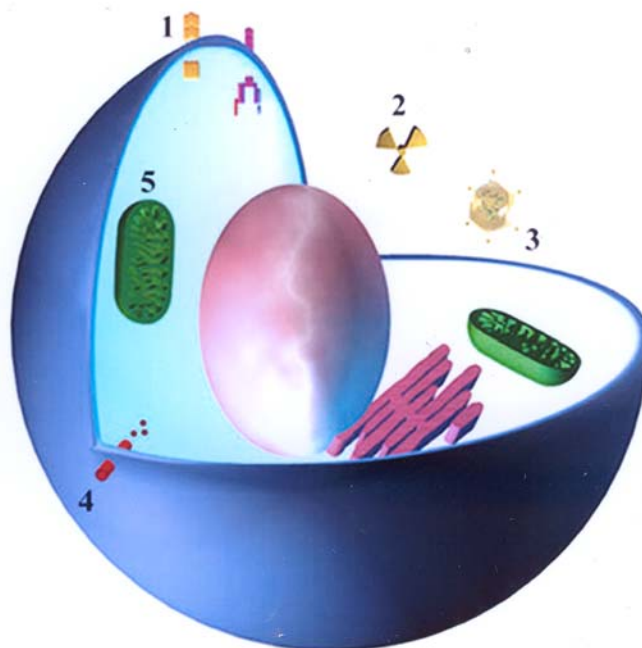


Figura 1.

1. Presencia de ligandos que inducen la muerte a receptores en la superficie de la célula.
2. Estrés celular por exposición a la radiación.
3. Sustancias químicas o infecciones virales.
4. Inducción de la apoptosis por linfocitos citotóxicos a través de la granzima.
5. Señales intrínsecas inician la apoptosis a través de las mitocondrias.

(*): Profesor Emérito de la Universidad Cayetano Heredia. Académico de Número de la Academia Nacional de Medicina.

Las primeras observaciones de muerte celular fisiológica fueron desarrolladas por Vogt en 1842.

El concepto de muerte celular programada fue acuñado por Lockshin y Williams en 1964 y describía la muerte de las células que ocurría en momentos y lugares determinados como eventos programados dentro del plan de desarrollo del organismo.

En 1972, Kerr, Wyllie y Currie(1) establecieron las diferencias entre los dos tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis. Según estos autores, la muerte por apoptosis respondía a un programa de muerte intracelular que podía ser activado o inhibido por una variedad de estímulos tanto fisiológicos como patológicos.

En 1982 se publicaron los estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* en los que se describieron los genes encargados del control y la ejecución de la apoptosis en este organismo. Gracias a la homología existente con organismos superiores, la apoptosis en este nemátodo ha sido tomada como referencia del proceso en otros organismos (4).

Veamos ahora, en forma resumida algunos aspectos del proceso de apoptosis.

CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.

Las características histológicas de la apoptosis son: el citoplasma comienza a encogerse, hay condensación nuclear y en algunos casos, el núcleo toma la forma de «herradura». Todos estos cambios preparan a las células para la fagocitosis por los macrófagos(2). Con el fin de promover este fenómeno las células apoptóticas efectúan cambios en la membrana celular.

Estos cambios en la membrana se observan histológicamente como ampollas (“blebs” en la literatura inglesa).

RECEPTORES DE MUERTE

Los receptores de muerte son receptores de la superficie celular que transmiten señales de apoptosis iniciadas por ligandos específicos. Activan la cascada de la apoptosis segundos después de haberse ligado. Estos receptores pertenecen a la familia de genes del Factor de Necrosis tumoral alfa. Producido por las células T y los macrófagos activados en respuesta a la infección. El TNF -puede tener varios efectos. En algunas células lleva a la activación del factor nuclear que induce genes proinflamatorios e inmunomoduladores. Puede inducir apoptosis. Se asocia dentro de la célula con moléculas adaptadoras, lo que lleva a la recolección y división de la procaspasa 8. También puede influir sobre la caspasa 2.

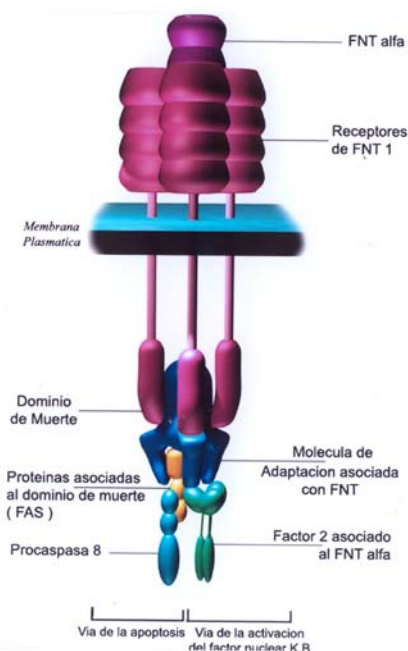


Figura 2. Señalización por el Factor de Necrosis Tumoral - 1. Al ligarse tiene varios efectos. En algunas células activa el factor nuclear Kappa beta que lleva a la inducción de genes pro-inflamatorios e inmunomoduladores. En algunas células induce la apoptosis.

CD95/Fas.

El ligando para el CD 95 es un trímero que en asociación con el receptor forma dominios de muerte (death domains) que a su vez se liga a la procaspasa 8 que es cortada para producir caspasa 8 que a su vez activa la caspasa 9 que es una de las llamadas caspasas de ejecución.

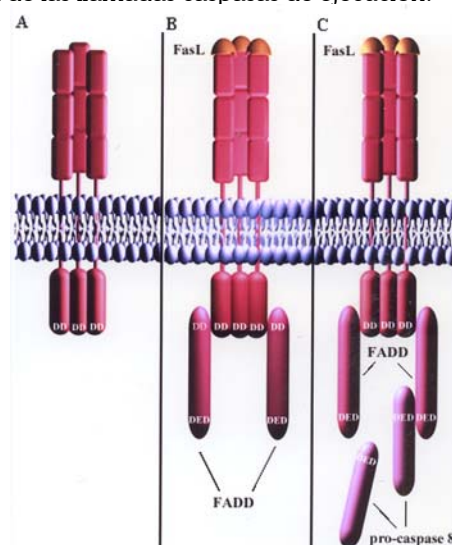


Figura 3. Señalización por células T. El ligando es un trímero que permite que se asocien dominios de muerte, lo que permite la formación de la proteína adaptadora (FADD). La FADD, contiene un factor que permite la asociación con la caspasa 8 la que activa las caspasas de ejecución como la caspasa 9.

TRAIL-TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) es similar al CD95. Sus receptores son el DR4 y el DR5, dado que estos receptores son constitutivos en muchos tejidos, se ha sugerido que hay mecanismos de protección en las células contra la apoptosis, uno de los posibles mecanismos es la presencia de receptores falsos (decoy) que compiten con el DR4 y Dr5 por ligarse al TRAIL (5).

LAS PROTEÍNAS Bc1-2.

Son una familia de proteínas relacionadas en la respuesta a la apoptosis. Algunas de ellas (bc1-2 y bc1-XL) son anti apoptóticas mientras que otras (Bad y Bax) son pro apoptóticas. La sensibilidad de las células a la apoptosis depende del balance entre estas proteínas. De eso dependen también la mayor o menor sensibilidad de las células a la apoptosis.

Las proteínas pro apoptóticas se encuentran en el citosol, donde actúan como sensores del daño celular o del estrés. Si hay estrés celular se trasladan a la membrana de la mitocondria, como explicaremos en la sección sobre la mitocondria y su papel en la apoptosis (6).

ROL DE LA MITOCONDRIA.

La mitocondria juega un importante rol en la regulación de la muerte celular. Los miembros anti apoptóticos de la familia de proteínas Bc1-2 y Bc1-XL están localizados en la parte exterior de la membrana de la mitocondria. Muchos de los miembros pro-apoptóticos de la familia BC1-2 como Bad y Bax también realizan sus efectos a través de la mitocondria, sea interactuando con el Bc1-2 y el BC1 X1 o por acción directa sobre la membrana de la mitocondria. (7)

Las mitocondrias tienen la habilidad de promover la apoptosis, dejando salir el citocromo C que junto con Apf-1 (apoptotic proteases activating factor-1) y el ATP forman un complejo (apoptosoma (8) que lleva a la activación de la caspasa 9 y de la cascada de las caspasas). Se ha sugerido que el Bax forma un poro a través de la membrana que lleva a la salida del citocromo-C y del AIF (apoptosis inducing factor).

LA PROTEÍNA P53.

La proteína P53 es la que ordena la ejecución de la apoptosis en respuesta a los agentes que dañan el DNA. Se ha demostrado que la P53 requiere del concurso de las proteínas P63 y P73 para realizar su acción. Estas proteínas actuarían en conjunto o en forma paralela a la P53 para inducir la apoptosis. Estudios genéticos en animales deficientes en estas proteínas así lo han confirmado (9).

Recientemente se ha sugerido (10) (11) que drogas que en realidad son pequeñas moléculas pueden ser

diseñadas para activar la P53 impidiendo la unión a un regulador negativo llamado Mdm 2.

La proteína Mdm 2 se liga a un amino terminal de la P53 en una relación proteína-proteína que bloquea la actividad de la P53.

Normalmente la proteína P53 actúa como un factor de transcripción, determinando la expresión de una batería de genes que detienen el ciclo celular o inician el proceso apoptótico.

Se trataría de conseguir tratamientos altamente selectivos para el cáncer, sin los inconvenientes de la quimioterapia tradicional.

CASPASAS.

Las caspasas son una familia de proteínas que son los principales efectores de la apoptosis. Las caspasas son un grupo de cisteína-aspartato proteasas que existen en la célula en forma inactiva llamada zimógeno.

La inducción de la apoptosis por la vía de los «receptores de muerte» ya mencionados resulta en la activación de una caspasa inicial como la 8 o la 10. Estas caspasas activan otras caspasas en cascada. La cascada eventualmente lleva a la activación de las caspasas efectoras como la 3 y la 6. Estas caspasas son responsables por el corte de importantes proteínas celulares que llevan a los cambios celulares observados en la apoptosis.

Aparte de la unión con los receptores de muerte hay otros mecanismos a través de los cuales la cascada de las caspasas puede ser activada. Así la Granzima B puede ser entregada a las células por linfocitos citotóxicos T y es capaz de activar las caspasas 3,7,8 y 10.

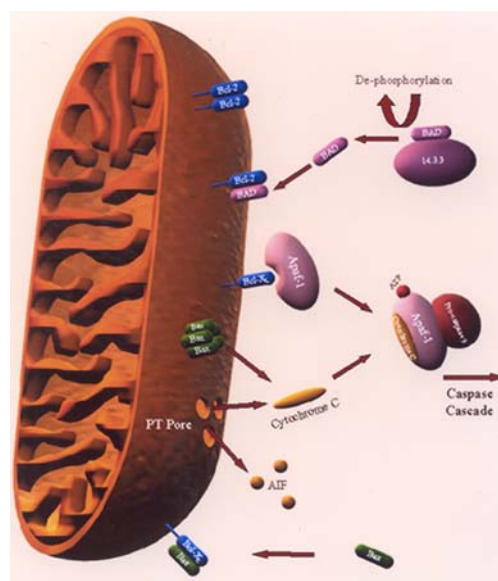


Figura 4. Rol de las mitocondrias. Inducen la apoptosis a través de la salida de citocromo C que junto con el Apaf -1 (Factor inductor de la apoptosis 1) y el ATP forman el apoptosoma que activa la caspasa 9 y la cascada de las caspasas.

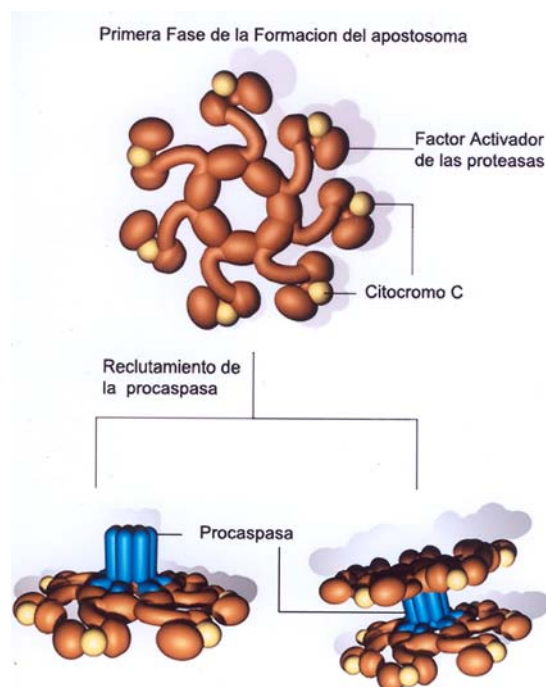


Figura 5. Formación del apoptosoma.

El citocromo C que sale de las mitocondrias, se liga a la proteína citosólica Apaf -1 que estabilizada por su unión a ATP les permita asociarse entre ellas. Esto resulta en la formación de una estructura similar a una rueda conocida como apoptosoma que permita reclutar siete moléculas de pro-caspasa 9.

La salida del citocromo C de las mitocondrias lleva a la activación de la caspasa 9 y luego a la activación de la caspasa 3.

El efecto es mediado a través de la formación del apoptosoma, un complejo multiproteico formado por el citocromo C, el APf 1 (apoptotic protease activating factor 1) la procaspasa 9 y el ATP.

El apoptosoma permite la unión con la procaspasa 9. Se unen dos apoptosomas y activan la caspasa 9 (8) (12) (13) (14).

EFFECTOS NUCLEARES DE LA APOPTOSIS

Uno de los efectos más significativos de la apoptosis es la división del DNA de los cromosomas en pequeñas unidades. La enzima poly ADP ribosa polimerasa o PARP fue la primera proteína identificada como sustrato para las caspasas. La PARP está comprometida en la reparación del DNA y sus funciones. Esta habilidad de reparar el DNA es impedida después que la caspasa 3 rompe el PARP.

Otro mecanismo es la activación de la enzima topoisomerasa II que es esencial para la replicación y reparación del DNA. Las caspasas inactivan esta enzima.

Las "lamins" son proteínas intranucleares que mantienen la forma del núcleo y median las interacciones entre la cromatina y la membrana nuclear.

La degradación de la cromatina por la caspasa 6 resulta en la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear que se observa en la apoptosis.

La fragmentación del DNA es causada por una enzima llamada CAD (caspase activated DNase) que existe normalmente en una forma inactiva (ICAD). En la apoptosis el ICAD es roto por las caspasas y el CAD queda libre. (15)

ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO

El Óxido Nítrico es una importante molécula de señalización que actúa en muchos tejidos para regular diversos procesos que incluyen la vasodilatación, la función neuronal, la inflamación y la función inmune.

Se ha demostrado que el óxido nítrico está envuelto en la regulación de la apoptosis. Se ha demostrado que puede inducir o proteger contra la apoptosis en diferentes clases de células. Se ha demostrado que inhibe la apoptosis en: leucocitos, hepatocitos, células del trofoblasto y en las células endoteliales. Lo haría a través de diferentes mecanismos como la nitrosilación de diferentes caspasas, incluyendo las caspasas 3, 1 y 8. Otro mecanismo sería activando la proteína p53, regulando hacia arriba la «Heat shock protein» 70 y consecuentemente bloqueando la aproximación de la caspasa 9 al apoptosoma, regulando hacia arriba las proteínas Bcl 2 y Bcl X con la consecuente inhibición de la salida del citocromo C de la mitocondria. (16)

LA ENZIMA PKC (PROTEÍNA KINASA C) EN LA APOPTOSIS

La enzima PKC es una enzima encargada de fosforilar. Se ha afirmado que la apoptosis depende de la activación de la PKC, ya que hay muchas formas de apoptosis en que la enzima se desplaza y se activa. Sin embargo, hay otro tipo de células que pueden entrar en apoptosis sin modificaciones de la PKC.

EI CMAP (ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO EN LA APOPTOSIS)

Es una molécula mensajera que cuando llegan ciertas señales a los receptores de membrana, informa a otras enzimas y producen diversos fenómenos intracelulares. Se ha observado variaciones del CMAP cíclico en momentos en que se produce la apoptosis. Sin embargo, el fenómeno no se observa en todas las células (17).

EL CALCIO Y EL PROTON

Las moléculas, sobre todo las macromoléculas como el ADN el ARN y las proteínas mantienen una distribución de cargas eléctricas muy complejas que son las responsables de que adopten la configuración espacial determinada. Cuando se les acerca un ion, se altera la distribución de los campos eléctricos de las macromoléculas que adoptan una configuración distinta, con lo que exponen o dejan de exponer los sitios en los que se combinan con otras moléculas para llevar a cabo una reacción química.

Así, hay proteínas que sólo se combinan con glucosa si previamente se asocian con el ion sodio.

Entre los iones más distorsionadores de la configuración de las proteínas figuran el Ca^{2+} y el H^{+} .

Una de las reacciones que ocurren cuando se activan los genes de muerte es que aumenta la concentración de Ca^{2+} , que entra en una cantidad inusitada y activa enzimas (endonucleasas) que cortan las moléculas de ADN. Hay otras enzimas, las ribonucleasas que cortan el ARN (18)

LA APOPTOSIS Y EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

En el ventrículo derecho ocurre una remodelación fisiológica después del nacimiento, cuando ya este ventrículo no tiene que cumplir su función hemodinámica intrauterina. Una cantidad importante de células de ese ventrículo mueren de manera programada después del nacimiento. Esto suele durar unos días pero en ciertas condiciones, se prolonga indefinidamente y ocurre la denominada miocardiopatía de Uhl, caracterizada por una dilatación extrema del ventrículo derecho con la consecuente insuficiencia ventricular derecha.

Otra entidad donde se ha demostrado muerte celular programada es en la miocardiopatía dilatada, especialmente en su forma idiopática. Este proceso de apoptosis puede durar mucho tiempo y si no hay replicación celular compensadora, alrededor del cincuenta por ciento de la masa ventricular se perdería en un año. En la remodelación post infarto, esta muerte programada de tejido viable se ha demostrado que en tejido vecino contiguo a la necrosis post infarto, hay células apoptóticas.

Un buen número de factores presentes en el corazón insuficiente por ejemplo, las citoquinas inflamatorias, las especies de **oxígeno reactivo**, el Óxido nítrico, la hipoxia, la reperfusión los factores de crecimiento y el

estiramiento del tejido estimulan la apoptosis en una variedad de células entre ellas las del miocardio. (19)

El endotelio vascular está remodelándose constantemente por apoptosis y replicación. En la hipertensión arterial hay exceso de apoptosis que a su vez favorece la migración y el crecimiento del músculo liso arterial, lo que favorece la aparición de ateromas.

APOPTOSIS Y ENVEJECIMIENTO

El estrés oxidativo juega un rol primario en la fisiopatología del proceso de envejecimiento. La teoría de los radicales libres como productores del envejecimiento la liga con el daño producido por los radicales superóxido y otros oxidantes generados primariamente en la respiración mitocondrial.

La apoptosis también influencia el envejecimiento a través de la muerte celular programada de las células T, los cardiomiocitos, las neuronas y otro tipo de células(20). Células T: La apoptosis es una parte fundamental de la maduración y selección de los linfocitos T, las células que se ligan a antígenos del propio organismo sufren, en el timo, el proceso de apoptosis. Estudios recientes indican que con el avance de la edad, defectos en la apoptosis de las células T pueden relacionarse con el aumento de los desórdenes autoinmunes y la susceptibilidad a las infecciones. En otros estudios los linfocitos de sujetos viejos sobreexpresan las moléculas relacionadas con la apoptosis.

Cardiomiocitos: La apoptosis puede tener también un efecto en la disminución de la función cardiaca que se presenta con la edad. En el proceso de envejecimiento el corazón pierde un significativo número de miocitos. La apoptosis de los cardiomiocitos puede ser prevenida por ciertas drogas y por terapias de intervención como el ejercicio y el aumento en la ingestión de antioxidantes. Recientes estudios sugieren que el factor de necrosis tumoral (TNF) causa un rápido aumento en las especies reactivas de oxígeno y por lo tanto apoptosis en los miocitos y en las células endoteliales. Estudios de drogas que se usan para tratar la insuficiencia cardiaca, como el carvedilol tienen efectos antioxidantes y antiapoptóticos, además de su efecto sobre los beta-receptores. Otras drogas como el enalapril, en estudios se ha demostrado que disminuyen la apoptosis. (21)

NEURONAS Y APOPTOSIS

Estudios recientes han demostrado que con el envejecimiento hay una disminución en el número de neuronas encontrándose las características morfológicas

de apoptosis como el arrugamiento celular y la condensación de la cromatina.

La apoptosis es un factor notable en enfermedades como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer (22,23). En la enfermedad de Parkinson, se ha observado un estado de estrés oxidativo debido a la producción de radicales hidroxilo por la mitocondria y coincidentemente se ha encontrado un aumento de la superóxido dismutasa que protege contra el estrés oxidativo. La apoptosis se ha asociado a la enfermedad de Alzheimer, que se caracteriza por el desarrollo de placas amiloides. Se estima que estas placas se producen por una defectuosa conformación de la proteína precursora del amiloide beta, en esta situación estarían envueltos los radicales libres ya que la proteína precursora produce radicales libres. Este estrés oxidativo llevaría a la pérdida de neuronas. (24)

Además el efecto neuroprotectivo de los estrógenos sería debido al aumento en la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-2, lo que reduciría la apoptosis.

APOPTOSIS Y EJERCICIO

El ejercicio extenuante estimula una variedad de señales, Como el aumento en la secreción de glucocorticoides el aumento del calcio intracelular y el aumento de las especies reactivas de oxígeno, todo lo cual puede inducir la apoptosis.

Sin embargo, se propone que la muerte de las células por apoptosis inducida por el ejercicio en tejidos metabólicamente muy activos como el corazón y el músculo esquelético puede ser un proceso normal para remover células dañadas.

La excesiva producción de energía por la mitocondria con el consiguiente aumento en la producción de radicales libres puede contribuir a la apoptosis.

Estudios en humanos han demostrado la quiebra de las hebras del DNA en los linfocitos después del ejercicio.

Para contrarrestar este efecto el organismo aumenta la producción de antioxidantes y enzimas antioxidantes.

La inactividad de los músculos esqueléticos puede inducir la apoptosis como se ha observado en pacientes con insuficiencia cardíaca.

APOPTOSIS EN LA OSTEOPOROSIS

Está bien establecido que todos los osteoclastos mueren por apoptosis y que esta puede ser apresurada o detenida por una serie de factores. Los estrógenos y los andrógenos promueven la apoptosis de los osteoclastos.

Inversamente la apoptosis de los osteoclastos se retrasa por la deficiencia de estrógenos.

De otro lado la estimulación de la apoptosis de los osteoclastos es el mecanismo de acción de los bifosfonatos.

Apoptosis de los osteoblastos: del 40 al 60 % de los osteoblastos, mueren por apoptosis. El resto son convertidos en células de revestimiento o son internalizados como osteocitos. Este proceso es apresurado por el exceso de glucocorticoides.

Los estrógenos y los andrógenos ejercen efectos anti-apoptóticos en los osteoblastos y en los osteocitos.

La apoptosis de los osteoblastos es retrasada por la calcitonina y los bifosfonatos.

La modalidad terapéutica óptima para la osteoporosis, especialmente para pacientes que ya han perdido masa ósea es un agente anabólico que restaure la masa ósea. Hay dos agentes que aumentan la masa Ósea. La hormona paratiroidea(25) y la prostaglandina E. que lo hacen reduciendo la prevalencia de la apoptosis.

El remodelamiento del hueso es favorecido por la administración de hormonas tiroideas, tanto la actividad osteoblástica como la actividad osteoclástica aumentan, pero, si las concentraciones de hormonas tiroideas son elevadas, prevalece la actividad osteoclástica. Para algunos autores las dosis supresivas de hormona tiroidea que se usan como tratamiento en el cáncer de tiroides no tienen efecto significativo sobre la masa ósea.

APOPTOSIS EN EL ACCIDENTE CEREBRO-VASCULAR

Cuando el aporte de sangre a una zona del cerebro está bloqueado, como sucede en el accidente cerebro-vascular, las neuronas, en el área más severamente afectada mueren por isquemia. Pero ¿qué causa la pérdida más gradual de las neuronas en la zona por fuera del centro de la lesión, en la que el aporte de oxígeno está reducido pero no eliminado? Parece ser que la isquemia parcial desencadena el proceso de apoptosis.(26) En experimentos en animales se han encontrado características de la apoptosis en estas células. Algunos neurólogos no usan el término apoptosis, prefieren llamarla “muerte inducida por las caspasas»

Esto ha llevado a algunos autores a sugerir que los inhibidores de las caspasas deberían estar entre la lista de drogas potenciales para el tratamiento del ACV.

En forma experimental en ratas, se han utilizado inhibidores de la síntesis de las proteínas, como la ciclohexamida, pero algunos la consideran inespecífica. Algunos estudios han demostrado que las caspasas juegan un rol en la muerte de las células ya que, usando inhibidores de las caspasas disminuyó el área del ACV en casi un 50%.

Otro tipo de factores a considerar, son las interluquinas. Así se ha demostrado que la actividad de la interluquina 1B aumenta en el cerebro después del ACV. Cuando se bloquea la acción de la interluquina con un antagonista se reduce el daño en un 50%. Basándose en investigaciones en ratas en que los recién nacidos han sido privados de oxígeno, los cerebros muestran signos de apoptosis. Se ha sugerido explorar la posibilidad de utilizar inhibidores de las caspasas para prevenir la parálisis cerebral en bebés que han sufrido isquemia en el parto o en aquellos que pesan menos de 1500 gramos que también sufren isquemia cerebral debido a inmadurez en su sistema respiratorio.

Se está experimentando en ratas para tratar de comprobar esta posibilidad.

Otra posibilidad a considerar es la actividad pro inflamatoria de las caspasas. (27)

APOPTOSIS Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Algunos investigadores han encontrado que los cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer contienen neuronas que muestran ciertos signos característicos de la apoptosis, como las secciones del ADN. No hay buenos modelos animales de enfermedad de Alzheimer, ni se ha podido probar si los inhibidores de la apoptosis pueden proteger contra la muerte celular en la enfermedad de Alzheimer. Si esto se llegara a demostrar se podrían descubrir nuevas drogas que, al inhibir la apoptosis mejoren la enfermedad.

Se ha demostrado que el beta amiloide provoca que las células en cultivo mueran por apoptosis.

Pero el beta amiloide, no es la única relación de la enfermedad de Alzheimer con la apoptosis. Se ha señalado que las presenilinas pueden regular la apoptosis. Los genes de estas proteínas están alterados en algunas formas hereditarias de enfermedad de Alzheimer. Se piensa que las presenilinas mantienen los frenos de la apoptosis y que formas mutadas interfieren con esta acción. Se ha encontrado que la proteína p53 que promueve la apoptosis impide la producción de presenilina 1 que es normalmente anti apoptótica. Esta misma acción sobre las presenilinas se ha demostrado para las caspasas. Estos hallazgos sugieren que si encontrara la forma de evitar el «corte» de las presenilinas se podría evitar la acción de las caspasas y por ende la apoptosis.

Hay dos genes presenilin 1 y presenilin 2, localizados, respectivamente, en los cromosomas 1 y 14. Disrupciones en estos genes causan una forma muy agresiva de enfermedad de Alzheimer. Ambos genes codifican para

proteínas que tienen como tarea cortar proteínas como la bAPP (proteína precursora del beta amiloide) . (28)

APOPTOSIS Y ESCLEROSIS LATERAL AMIOTROFICA.

Entre las enfermedades neurodegenerativas más devastadoras está la Esclerosis Lateral amiotrófica, que acusa una sorprendentemente rápida pérdida de neuronas motoras en la corteza, en el tronco cerebral y en la médula espinal con la consiguiente parálisis y muerte.

Una forma familiar de la enfermedad, puede ser atribuida a mutaciones en el gen SOD1 que codifica la enzima citosólica antioxidante superóxido dismutasa.

Al comienzo se pensó que esto disminuía la protección contra el estrés oxidativo, disminuyendo así la protección a las neuronas motoras. Pero en ratones que no tienen la superóxido dismutasa no se presenta la enfermedad, mientras que en ratones transgénicos que sobreexpresan el gen si presentan la enfermedad.

Se ha presentado evidencia que una mutación del SOD1 causa, en ratones, la muerte de la neuronas motoras por apoptosis a través de las caspasas.

En el mismo sentido la sobreexpresión del Bcl-2 que es un inhibidor mitocondrial de la apoptosis protege contra la pérdida de neuronas motoras.

Como se ha expresado en otra parte de este artículo, las mitocondrias segregan el citocromo C que activa la caspasa 9 que a su vez activa la caspasa 3 que «ejecuta» la apoptosis.

Li y col han demostrado que un pequeño péptido que es inhibidor de las caspasas, denominado VAD-fmk bloquea todas las caspasas conocidas y actúa en varios puntos de la cascada de activación de las caspasas. También disminuye la interluquina 1B, lo que sugiere que la apoptosis es un proceso que puede ser influenciado por agentes inflamatorios como la citoquina mencionadas. Estos hallazgos abren la posibilidad de encontrar otras drogas que influyeran el proceso de apoptosis. (29)

APOPTOSIS Y CANCER.

La relación entre apoptosis y cáncer no se estableció hasta 1988 en que se demostró que el gen bcl-2 bloquea la muerte de las células B en el linfoma folicular. Este gen produce una proteína que bloquea la apoptosis.

Se demostró así que las células tumorales también pueden desarrollarse impidiendo la muerte celular programada.

Se estableció también que el aumento en la producción de la proteína bc1-2 se presenta en varios tipos de cáncer: leucemias, linfomas, colon y próstata.

Además este aumento causa resistencia a los agentes quimioterapéuticos.

Se determinó que la proteína bc1-2 se ubica en la parte externa de la mitocondria e impide la salida del citocromo C, como ya ha sido explicado en otra sección de este artículo.

Pero hay otras proteínas como la p53 que sirve también como un importante supresor de tumores ya que bloquea la división celular de una célula dañada o desencadena la apoptosis a través de la salida del citocromo C.

En 50 a 70% de los cánceres la proteína p53 es deficiente(30). Actualmente hay en desarrollo ensayos clínicos probando nuevas drogas que inducen la apoptosis. Así el Valcade actúa sobre el proteosoma (ver sección anterior) permitiendo la acumulación de la proteína BX, ya mencionada que promueve la apoptosis bloqueando la proteína bc1-2.

Se le ha utilizado en pacientes con mieloma múltiple. Se le va a comparar con la dexametasona en el mieloma y se va a probar en nuevos tipos de cáncer: cáncer de seno, de pulmón, melanoma, sarcoma, leucemia mieloide crónica, linfoma non-Hodgkin y tumores neuroendocrinos y renales.

Genasense es otro agente inductor de la apoptosis. Bloquea la producción de la proteína Bc1-2 y deja a las células más vulnerables a la apoptosis.

Se está probando en cáncer de pulmón y leucemia.

Algunos virus asociados con el cáncer impiden la apoptosis de las células. Así el papiloma virus humano que está asociado al cáncer de cuello uterino produce una proteína que se liga e inactiva al promotor de apoptosis p53.

El virus de Epstein-Barr que se ha asociado a algunos linfomas produce una proteína similar al Bc1-2, y produce otra proteína que induce a la célula a aumentar su producción de BC1-2, lo que hace a la célula más resistente a la apoptosis.

Algunas leucemias y linfomas expresan altos niveles de Bc1-2 -bloqueando así las señales apoptóticas que reciben.

El melanoma evita la apoptosis inhibiendo la expresión del gen que codifica el Apaf-1 ya mencionado.

Algunos cánceres, especialmente del pulmón y del colon segregan elevadas cantidades de una molécula de «engaño» (decoy) que se liga al FASL, que por lo tanto no puede ligarse al FAS (ver capítulos anteriores) y por lo tanto las células citotóxicas no pueden matar a las células cancerosas. (31)

La habilidad para escapar del suicidio (apoptosis) es una de las marcas de fábrica de la mayoría de las células

cancerosas y a menudo correlaciona con la agresividad del tumor y la resistencia a los tradicionales tratamientos con drogas anticáncer.

En vista de esto, laboratorios académicos e industriales se han empeñado en desarrollar nuevas moléculas que activen la apoptosis en las células tumorales a través de la intervención en las interacciones entre proteínas que son una característica de casi todos los procesos biológicos en los organismos vivos.

Recientemente se han publicado en Science dos artículos (32,33) que muestran dos posibles medios de inducir la apoptosis en los tumores.

En ambos casos se actúa sobre la interacción entre proteínas que pertenecen sea a los receptores extrínsecos o a los receptores intrínsecos dependientes de las mitocondrias.

Hay mucho interés en explotar péptidos biológicamente activos como compuestos farmacéuticos. Sin embargo, el esfuerzo se limita por su baja biodisponibilidad, su ineficiencia para atravesar las membranas celulares (debido a su tamaño) y su poca estabilidad in vivo.

Se ha recurrido a la generación en el laboratorio de péptidos sintéticos que contienen aminoácidos no naturales, llamados «peptidomiméticos».

Walensky, y col, han generado un péptido que bloquea la acción de los componentes antiapoptóticos de la familia de las proteínas BC1 2 ya mencionadas. En segundo lugar induce a los miembros proapoptóticos de la familia, lo que resulta en la salida del citocromo C, activación del apoptosoma y la subsecuente inducción de la apoptosis.

En el trabajo de Li y col. generaron un compuesto sintético que imita las interacciones proteína-proteína de un activador de la apoptosis SMAC, Second mitochondria derived activator of caspases, ya mencionado anteriormente.

Como ya se ha mencionado los efectores de la apoptosis son las caspasas que son mantenidas inactivas por proteínas que bloquean la apoptosis. Estas proteínas se sobreexpresan en los tumores y a su turno estas proteínas son inhibidas por cuatro residuos del SMA. Los autores han generado un péptido que no permite la acción de las caspasas. El tratamiento de las células de glioblastoma con este compuesto produjo apoptosis en las células tumorales. Las células normales no fueron afectadas. Se ha demostrado además que este compuesto interactúa con el TNF alfa por lo que tiene propiedades antiinflamatorias y podría ser usado en otras enfermedades.

El campo de los peptidomiméticos recién está emergiendo.

LA AUTOFAGIA: ¿UNA NUEVA FORMA DE APOPTOSIS?

La autofagia es la forma en que se degradan organelas enteras, dentro de la célula. En este sistema una estructura de doble o múltiples membranas, llamada autofagosoma o vacuola autofágica se forma para secuestrar parte del citoplasma. Luego esta vacuola se fusiona con el lisosoma y le entrega su contenido que es degradado.

La autofagia, a niveles basales, ocurre en la mayoría de los tejidos y contribuye al recambio de los componentes celulares. Sin embargo, además de esta misión este procedimiento se presenta en el desarrollo, la diferenciación y el remodelado tisular.

La autofagia está implicada en ciertas enfermedades en el hombre. Paradójicamente la autofagia puede servir para proteger a las células pero puede también contribuir al daño celular(34). La autofagia está comprometida en la muerte celular programada (MCP) La autofagia (MCP tipo II) está implicada en la MCP tipo I, que es la apoptosis. Ya hemos visto en párrafos anteriores las características de la apoptosis. El tipo II de MCP, la autofagia, se caracteriza por la acumulación de vesículas autofágicas (autofagosomas y autofagolisosomas) se observa cuando los fagocitos no tienen fácil acceso a las células que van a morir. Una de las características que distinguen la autofagia de la apoptosis, es que en la apoptosis se usan las enzimas de las células fagocíticas mientras que en la autofagia se utilizan las enzimas de la propia célula.

Uno de los factores implicados en la apoptosis, el TNF (tumor necrosis factor) que se liga al receptor de muerte TRAIL, ya mencionado, puede inducir también la autofagia.

Cuando el estímulo es menor, la autofagia puede representar un intento primario para restablecer la homeostasis, cuando la capacidad autofágica es superada, la apoptosis se dispara.

En el caso del cáncer la autofagia puede jugar un doble rol. Así la inhibición de la autofagia puede permitir el crecimiento de células precancerosas, pero al mismo tiempo la acción autofágica puede actuar como un supresor del cáncer. Ya en el desarrollo del cáncer la autofagia puede servir para limitar el número de células cancerosas y permitirles el mejor uso de los nutrientes y del oxígeno.

El Beclin I es un compuesto que se requiere para la formación de autofagosomas, este compuesto está suprimido en un alto porcentaje de cánceres al seno, del ovario y de la próstata. Algunas drogas usadas para tratar

el cáncer es probable que actúen a través de la autofagia, por ejemplo, el tamoxifeno, que se usa para tratar el cáncer de seno, actuaría regulando hacia arriba el Beclin I.

Otros compuestos que inducen la autofagia, como la rapamicina están siendo investigados en pacientes con tumores malignos.

La acumulación de vesículas autofágicas se ha observado en muchos trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica o las enfermedades inducidas por priones que están asociadas a proteínas mal conformadas que tienden a formar agregados. Sin embargo no se sabe si esto representa un aumento en la autofagia o un bloqueo en el consumo de los autofagosomas.

Uno de los roles de autofagia en la defensa celular es la remoción de los patógenos que invaden la célula, por endocitosis, son llevados al lisosoma para ser degradados ahí, pero, algunos escapan esta defensa bloqueando el fagosoma. Así la autofagia puede proteger contra la invasión bacteriana. Sin embargo, algunos patógenos utilizan para multiplicarse, en los autofagosomas (por ejemplo la brucella abortus y la legionella neumofila). La aparición de estructuras similares a los autofagosomas también se observa en ciertas infecciones virales. La infección por virus como el herpes simple induce la autofagia.

Análisis genéticos recientes, en varios organismos, han identificado genes relacionados con el control de la longevidad. La vía más caracterizada es la de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF I).(35) En nemátodos como el *Caenorhabditis elegans* (ya mencionado) la inhibición de la cascada que desatan estos factores aumenta su vida en 300% y aumenta la resistencia al calor y al estrés oxidativo que puede contribuir a la extensión del tiempo de vida (36).

La restricción calórica que puede inducir autofagia tiene efectos positivos en la extensión del tiempo de vida.

La velocidad de la autofagia disminuye con la edad lo que puede explicar su correlación con el proceso de envejecimiento.

APOPTOSIS EN LAS CELULAS BETA DEL PANCREAS.

La masa de células beta del páncreas está regulada por, cuando menos, cuatro mecanismos:

1. La replicación de las células beta, es decir, la división mitotónica de las células beta existentes.
2. El tamaño de las células beta.
3. La neogénesis de las células beta, es decir, a emergencia de nuevas células beta procedentes del epitelio de los conductos del páncreas y

4. Por la apoptosis celular.

Las células apoptóticas, como ya se ha explicado en otra parte de este artículo, son “limpiadas» por los macrófagos, así que es difícil establecer la magnitud de la apoptosis.

En adultos la vida media de las células beta se estima en 60 días. En condiciones normales, más o menos el 0.5% de las células beta van a la apoptosis..

En la vejez, la masa de las células beta disminuye debido a que la apoptosis predomina sobre la replicación y la neogénesis.

Esto explica, parcialmente, por que los adultos mayores presentan un aumento en la posibilidad de tener diabetes mellitus tipo 2.

En los seres humanos el aumento en la apoptosis en la diabetes tipo 2 es exacerbada por el depósito de placas amiloide en los islotes.

Muchos mecanismos pueden disparar el aumento de la apoptosis en las células beta. Entre ellos, el desarrollo de estrés en el retículo endoplasmático, la hiperglicemia crónica, el estrés oxidativo, la hiperlipidemia y algunas citoquinas (IL-18), leptina, factor de necrosis tumoral alfa e interleuquina 6.

El conocimiento de las vías que controlan la apoptosis, el proceso de crecimiento y desaparición de las células beta permitirá diseñar drogas que impidan la apoptosis de la célula beta y por lo tanto, permitan su supervivencia (37).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kerr, J.F.R., Willie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics *British Journal of Cancer* 1972;26:239-257
- Savill, J. Gregory, C. Haslett C. Cell biology: Eat me or die. *Science* 2003;302:1516-1517
- Saunders, J.W. Death in embryonic tissues. *Science* 1966;154:604-612
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E., Horvitz, H.R. Caernohabditis elegans gene ced9 protects cells from programmed cell death *Nature* 1992;356:494-499
- Ashkenazi A. and Dixit V.M. Death receptors, signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308
- Adams, J.R., Cory S. the Bcl-2 protein family: arbiters of cell, survival. *Science* 1998;281:1322-1325
- Green, D.R and Reed, J.,C. Mitochondria and apoptosis *Science* 1998;281:1309-1312
- Tansey, W.P. Death, Destruction and the proteasome *N Engl J Med* 2004;351:393-394 July 22.
- Flores, E.R. et al. p63 and p73 are required for p53 dependency apoptosis in response to DNA damage *Nature* 2002;416:560-564
- Lane, D.P., Fischer, P.M. Turning the key on p53 *Nature* 2004;427:789-790
- Vassilev, L.T., Vu B.T., Graves, B. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small molecule antagonist of MDM2. *Science* 2004;303:844-848
- Fesik S.W., Shi, Y. Perspectives: Structural Biology: Controlling the caspases. *Science* 2001;294:1477-1478
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N et al. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum specific apoptosis and cytotoxicity by amiloid beta. *Nature* 2000;403:96-103
- Gurney, M.E., Tomasselli, A.C., Heinrichson, R.L. Perspectives: Neurobiology: Stay the executioners hand *Science* 2000;288:283-284
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. Caspases: enemies within *Science* 1998; 281:1312-1316
- Li, C.Q., Trudel, L.J, Wagen, G.N. Nitric oxide induces enotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human Lymphoblastoid cells expressions in wild-type mutant p53. *Proc. Ntl Acad Scie.* 2002;99:10364-10369
- Evan, G. Littlewood. T. A matter if life and cell death. *Science* 1998; 281:1317-1322
- Abbate, H., Bussani. R, Biondi-Zoccai, GG. et al. Persistent infarct-related artery occlusion is associated with an increased myocardial apoptosis at post mortem examination in humans late after an acute myocardial infarction. *Circulation* 2002; 105:1951-1954
- Hayakawa ,K., Takemura, G., Kode, M et al. Sensitivity to apoptosis signal, clearance rate and ultrastructure of fas-ligand induced apoptosis in the normal aging brain skeletal muscle and heart. *Ann N Y Acad Scie.* 2002;959:93-107
- Kane, D.J., Sarafian, T.R., Antón R. Bcl-2 inhibition of neural death decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274-1277
- Ferder, L., Romano, L.A., Ercole, L.B. Biomolecular Changes in the aging myocardium. The effect of enalapril. *Am J Hypertens* 1998;11:1297-1304
- News: Is apoptosis key in Alzheimer disease. *Science* 1998;Vol. 281:1303-1304
- News: Stroke damaged cells neurons may commit cellular suicides. *Science* 1998;281:1302-1303
- Selkoe, D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 2002; 298:789-791
- Neer, R.M., Arnaud, C.D., Zanchetta, J.R. et al. Effect of parathyroid hormone, (1-34) on fractures and bone mineral density in post menopause women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001;344:1434-1441
- Barinaga, M. Stroke damaged neurons may commit cellular suicide. *Science* 1998;281:1302-1303
- Tracey, K.D. Warren H.S. An inflammatory issue. *Nature* 2004;429:35-36
- Marx, J. News focus: New leads on the «how» of Alzheimer disease. *Science* 2001;293:2102-2103
- Li, L., Ranny, M.T., Hidetaka, S. et al. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL and TNF alfa mediated cell death. *Science* 2004;305:1471-1474
- Polyak, K., Xia, Y., Zweie, J.L. A model for p53 induced apoptosis. *Nature* 1997; 389:300-305
- Denicourt, C., Diowdy, S.F. Targeting apoptotic pathways in cancer cells. *Science* 2004;305:1411-1413
- LiL., Thomas, R.M., Suzuki, et al. A small molecule Mimic potentiates TRAIL and TNF alfa-Mediated cell death. *Science* 2004;305:1471-1474
- Walensky ,L.D., Kung A.L., Escher, I. et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon stapled BH3 helix. *Science* 2004;305:1466-1470
- Shintani, T., Klionsky, D.J. Autophagy in health and disease: a double edged sword. *Science* 2004;306:990-995
- Tratar, M., Bartke, A., Antebi, A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 2003;299:1346-105
- Longo, V.D., Finch, C.E. Evolutionary medicine: from dwarf model system to healthy centenarians. *Science* 2003;299:1342-1346.
- Rodhes, Cristopher, J. Type 2 diabetes, a matter of beta cell life and death. *Science* 2005;309:380-384