

Muerte celular programada

J. Sillero F. de Cañete

Muerte celular programada

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico de autólisis (suicidio celular) que ha cobrado inusitado interés y reconocimiento en la última década. Se trata de un procedimiento normal necesario para el desarrollo armónico, la morfogénesis y la regulación inmune (1), entre otras funciones importantes.

Aspectos morfológicos

La destrucción celular en el organismo puede llevarse a cabo de dos formas diferentes, necrosis y apoptosis. La necrosis se produce como consecuencia de una injuria exógena a la propia célula (traumatismo, inflamación, isquemia). Morfológicamente se traduce por hinchazón celular, tanto de la membrana como de

La apoptosis o muerte celular programada es un fenómeno normal de alto interés no sólo para el investigador, sino también para el clínico.

En esta revisión se estudian los aspectos morfológicos, que le diferencian de la muerte por necrosis, así como algunas de sus modalidades fisiológicas más conspicuas, en el terreno de la morfogénesis, de la maduración inmune y las alteraciones genómicas.

Se hace luego alusión al mecanismo molecular de la muerte apoptótica, con su cadena proteolítica puesta en marcha por el enlace de un ligando al receptor de la muerte, y asimismo a sus posibilidades de control, en el que la familia de proto-oncogenes Bel-2 juega un papel relevante.

Se comentan, por último, procesos clínicos que tienen en su base una perversión de la apoptosis por defecto o por exceso, y que van desde la autoagresión a los tumores malignos y desde las virasis a los procesos neurodegenerativos, confirmando de este modo la versatilidad del concepto.

las organelas citoplásmicas, colapso y disfunción mitocondrial, cariorrhexis y lisis final.

En la apoptosis la imagen es distinta y característica, similar además para todos los tipos celulares (2): hay empequeñecimiento del volumen de la célula (contracción celular), cambios citoplásmicos con formación de vesículas o burbujas («blebbing») y condensación del núcleo, con fragmentación del

ADN en segmentos de unos 180 pares de bases (aproximadamente la longitud de cada nucleosoma).

Así las células pierden contacto con sus adyacentes y se convierten en «cuerpos apoptóticos», que en último término son englobados por los fagocitos de vecindad, sin que se origine proceso inflamatorio en su torno (3).

Palabras clave: Apoptosis. Receptor de muerte. Caspasas. Bel-2.

Fecha de recepción: Junio 2000

Seminario Médico

Año 2000. Volumen 52, N.º 3. Págs. 66-72

Papel fisiológico

La apoptosis tiene, como se ha avanzado, un papel fisiológico relevante, tanto en el desarrollo morfológico del nuevo ser en su etapa fetal como luego del nacimiento.

En la morfogénesis existe un delicado balance entre dos tipos de impulsos contrapuestos, el de proliferación celular (crecimiento y multiplicación) y el de destrucción y muerte por apoptosis. Esta última va a facilitar el deslinde final de los órganos. Por ejemplo, permite la eliminación de texturas sobrantes, tales las membranas interdactilares en los dedos del humano (su fracaso conduce pues a sindactilia), y también procura la desaparición de la cola del renacuajo al transformarse en rana adulta (4). Su papel en la maduración de una correcta inmunidad celular es esencial. El timo produce en principio linfocitos T CD8+ (citotóxicos) capaces de enfrentarse y destruir cualquier tipo de antígeno. Luego, siguiendo los dictados de la selectividad propuestos por Mc Farlane Burnett, polarizan su respuesta: a fin de evitar la existencia de linfocitos citotóxicos autorreactivos, se hace necesario que los timocitos progenitores sufran apoptosis (5). Eso ocurre probablemente en el 95% de las células tímicas, y de este modo quedan sólo aquellas destinadas a la fabricación de linfocitos adaptados a antígenos extraños al individuo, capaces de defender su identidad o «self».

Aun más: la apoptosis juega un rol muy importante en la eliminación de las células que han sufrido un daño genómico irreparable. Recordemos en este sentido que existen cuatro tipos de genes reguladores de la proliferación y diferenciación celular: protooncogenes que promueven crecimiento; supresores que lo moderan; reparadores de las injurias genéticas, e interruptores. Algunos de ellos tienen relación con el proceso de muerte celular programada: un claro ejemplo es el gen supresor p53, que ocupa un lugar destacado como policía que detecta esas anomalías genéticas y acelera el proceso apoptótico (6).

Mecanismos íntimos de la apoptosis

Un punto crítico a dilucidar es el de cuáles son los mecanismos que subyacen a la muerte apoptótica. Gracias a la inmensa investigación de estos últimos años, nuestro conocimiento al respecto ha avanzado considerablemente. En síntesis, podríamos decir que una célula aparentemente sana sufre de repente esta autólisis porque recibe una señal que le induce a ello. Esa señal se genera cuando una molécula extrínseca o ligando se une a un receptor situado en la superficie celular. El ligado procede frecuentemente de los linfocitos y tiene no pocas veces el carácter de citocina (7). En la célula, el camino que recorre la señal es una especie de cadena con tres eslabones:

- en primer lugar, existe un receptor que por su índole es lógico que se denomine «receptor de la muerte» (death receptor = DR) (8); se trata de una proteína transmembrana que por tanto posee un dominio fuera de la membrana citoplásmica y otro por dentro de ella; cuando el primero, rico en cisteína, enlaza con el ligando, transmite al interior de la célula un impulso que va a determinar la aproximación a su área de otros moléculas del citoplasma;
- la segunda molécula interviniente, a la que podríamos llamar pieza intermedia aunque el lenguaje al uso la designa como «adaptador», es la encargada de trasladar la señal al último eslabón; para ello debe acoplarse al dominio endocelular del receptor (9);
- el tercer eslabón de la cadena es la molécula efectora de la apoptosis; es en realidad una familia de cistein-proteasas o «caspasas», encargadas de verificar la proteólisis final (10). El adaptador tiene por misión ensamblar estas moléculas, activándolas desde una situación previa de zimógenos inactivos.

En la práctica, se conocen ya varios ejemplos de cadena apoptótica, tales como:

1. El sistema Fas-FasL, el mejor estudiado (11). Sabemos que se encuentra implicado en la destrucción celular mediada por linfocitos T citotóxicos, así como en la lisis linfocitaria a cargo de células tumorales. Fas

(o Apo-1) es la proteína transmembrana tipo 1 receptora, pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR) y tiene por ligando a FasL. Cuando se produce la conexión entre ambos, Fas se trimeriza y recluta como adaptador una proteína conocida como FADD o MORT-1 (12). A su vez, FADD conecta con otra molécula proteica que ya tiene capacidad enzimática, FLICE o caspasa-8 (13). El complejo formado por FAS-FADD-FLICE/caspasa-8 se conoce como MSC (14) o complejo que induce la señal de muerte, y concluye liberando caspasa-8 activa que a su vez hiende y así estimula otras caspasas, principalmente caspasa-3. A la postre, la proteólisis se extiende al núcleo, donde las endonucleasas determinan la fragmentación característica del ADN antes señalada (15).

2. Otro sistema apoptótico está integrado por TNFR-1 (receptor para el factor de necrosis tumoral y linfotóxina alfa) y el adaptador TRADD (16), capaz de interactuar con FADD y otras moléculas, activando así la maquinaria apoptótica.

3. La muerte celular programada no sólo es espontánea, puede ser también inducida por algunas circunstancias exógenas a la célula diana, tales la radiación gamma, la carencia en factor de crecimiento, el estrés celular en sentido amplio y la presencia significativa de glucocorticoides (1). Se pone en marcha una nueva vía apoptótica que incluye: disminución del potencial de membrana de las mitocondrias y escape subsiguiente de citocromo c; unión de este citocromo a una proteína citosólica activadora de proteasas (Apaf-1) (17), y reclutamiento de caspasa-9. La cascada así formada, que al final también activa caspasa-3, es independiente y funcionante en punto a apoptosis en ausencia de otras vías de señal.

Control de la apoptosis

Se nos plantea ahora el siguiente problema: si la apoptosis tiene tanta trascendencia, es obvio que el organismo del humano debe

contar con mecanismos de regulación muy fina que la mantienen dentro de límites normales (18). El conocimiento en profundidad de tal regulación no sólo tiene interés académico, sino que en la práctica puede representar una forma de abordaje terapéutico en enfermedades en las que, como se discute más adelante, se admite la existencia de una perversión de la apoptosis.

Era de esperar que los virus estuvieran provistos de mecanismos anti-apoptóticos. Como parásitos endocelulares, son los primeros interesados en prolongar la vida de la célula que los mantiene y permite su replicación. Ello se consigue frecuentemente colocando una molécula no funcional en algún punto de la cadena de señal, de manera que ésta no pueda llegar hasta su final. Hay algunos ejemplos conocidos: la proteína MC159 del poxvirus puede unirse al adaptador FADD, y la proteína E8 de los herpesvirus se liga al eslabón final FLICE/caspasa-8 (19). Por cierto: un inhibidor de FLICE (I-FLICE) ha sido descrito en mamíferos (20). Más distalmente, algunos virus tienen capacidad inhibitoria directa de las caspasas.

También se han descrito receptores trampa o aňagaza (Decoy receptors = DcRs) que bloquean el enlace del ligando en la superficie de la célula (321).

Por último, conviene aludir a una familia de proto-oncogenes de capacidad reguladora ambivalente: la Bcl-2 (22, 23). En este amplio grupo hay moléculas pro-apoptóticas (como Bax) y anti-apoptóticas (como la Bcl-2 propiamente dicha). Y es que los miembros de esta familia de proto-oncogenes frenan o promueven crecimiento facilitando u obstaculizando respectivamente la muerte celular programada. Lo hacen así porque son elementos constitutivos de la membrana mitocondrial, controlando de este modo la permeabilidad para el citocromo c (24), que en el caso de Bax se potencia y en el de Bcl-2 se dificulta; ya se ha comentado antes la eficacia de la cadena citocromo c - Apaf-1 - caspasa-9 como vía

de señal para estímulos extrínsecos a la célula.

El virus de Epstein-Barr es capaz de convertir en «eternas» las células linfoides que parasita. Eso parece estar en relación con una proteína (LMP-1) asociada a la membrana, cuyo estímulo ocasiona la regulación al alza de la expresión de genes Bcl-2 inhibidores intracelulares de la apoptosis (325). Otra proteína del VEB, la BHFR1, es homóloga del Bcl-2 humano (39).

La apoptosis en patología

De acuerdo con lo que se ha señalado anteriormente acerca del papel fisiológico de la muerte celular programada, se deduce sin esfuerzo que sus perturbaciones pueden estar en la base de situaciones patológicas serias. Además de las posibles anomalías en el desarrollo fetal, un déficit apoptótico puede conllevar trastornos de la inmunidad y tendencia a la malignización.

Se ha estudiado ya el grado de influencia en diversas afecciones por autoagresión, ya sean no organoespecíficas, como es el caso del lupus eritematoso sistémico (donde WU y cols., han detectado mutaciones en el gen del ligando Fals) (26), ya organoespecíficas, de las que son ejemplo los procesos tiroideos, morbo Graves y tiroiditis de Hashimoto (trabajos de PHELSP (1), GIORDANO (27) y muchos otros).

Pero donde las desviaciones de la apoptosis en sentido minorativo tienen mayor calado es sin duda en el terreno del cáncer. La célula normal cuenta con un mecanismo eficiente para corregir posibles desviaciones genéticas (a la postre, modificaciones puntuales en su doble hélice de ADN), las que, de persistir, pueden convertirla en maligna, dotada de una capacidad proliferativa incontrolada: uno de los mejores ejemplos de este concepto es el de la transformación de una mucosa colónica normal en pólipo adenomatoso y carcinoma in situ, a través de cambios genéticos sucesivos.

Uno de los mecanismos correctores de estas desviaciones perniciosas es el que tiene

el ciclo celular hasta que se ha producido la reparación de los cambios sufridos por el ADN; otro es el de muerte celular de los elementos disregulados, promoviendo apoptosis. En ambas funciones el gen supresor p53 juega un papel básico (28); por eso resulta lógico el carácter amenazante y siniestro de su desaparición entre fumadores proclives al cáncer broncopulmonar (y se trate de prevenirlo con la aplicación in situ de este gen supresor), o la predisposición hacia diversas malignidades en pacientes heterocigotos para p53 que sufren síndrome de Li-Fraumeni. Otro gen que con frecuencia se activa en el curso de las neoplasias en el Rb (gen del retinoblastoma); igual que p53, está implicado en la regulación del ciclo celular (29).

Colateral a estos aspectos, aunque trascendente, es la constatación de que la acción de agentes antitumorales de tipo químico y las mismas radiaciones ionizantes gozan de capacidad tumoricida, más que por directa toxicidad, indirectamente por promoción apoptótica (30). Y, por lo mismo, la quimio- o radiorresistencia de las neoplasias tiene por base la incapacidad de nuestra terapia para inducir muerte programada en las células malignas (31); lo que, al menos teóricamente, podría superarse mediante manipulación genética (32). He aquí un vasto campo de aplicación de los conocimientos que nos brinda la apoptosis a la patología humana.

Sólo por estas consideraciones, la apoptosis merecería ya una atención especial. Pero es que además una disregulación en el sentido opuesto, de apoptosis exagerada, tampoco es compatible con una condición normal, y conduce según su localización o procesos de muy variada índole o al menos colabora en su patogenia.

En la diabetes mellitus tipo 2, y en forma paralela a la síntesis exagerada y deposición insular de sustancia amiloide (polipéptido amiloide) (33), se propone una exagerada apoptosis de las células insulares beta pancreáticas (34).

Por lo que concierne al sistema nervioso central, la muerte celular programada de cuenta de la desaparición «necesaria» de más del 50% de las neuronas en vías de desarrollo, pero un control aberrante por ineficaz de este mecanismo ha sido implicado no sólo en procesos neurodegenerativos tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica, sino también en desórdenes del neurodesarrollo incluyendo el autismo, el síndrome de X frágil y la misma esquizofrenia (MARGALIS et al.) (35).

La apoptosis puede estar exaltada en procesos hepáticos de destrucción celular difusa. SEARLE (36) señala que los cuerpos acidófilos que se visualizan en las hepatitis virales corresponden en realidad a hepatocitos apoptóticos.

Un ejemplo práctico de apoptosis inadecuada se nos ofrece en el miocardio. La verdad es que teleológicamente la apoptosis miocitaria tiene poco sentido en el corazón del adulto, ya que las células muertas no pueden ser sustituidas. En determinadas condiciones patológicas esto ocurre en forma exagerada: tal es el caso de la cardiopatía isquémica y también del ventrículo izquierdo sometido a sobrecarga de presión. Los trabajos de HIRODA y su grupo han demostrado el papel que en el mantenimiento de la señal celular tienen determinados receptores de superficie miocitaria que enlazan como ligando la proteína gp130, la que a su vez sirve de enganche a citocinas, especialmente del complejo de la interleucina-6. Ratones desnudos del receptor para esta proteína y otras emparentadas van a sufrir una apoptosis acelerada cuando son sometidos a sobrecarga de presión mediante la creación de una estenosis en el arco aórtico. Gp 130 promueve señales que incluyen activación del factor de transcripción STAT-3 y proteínas anti-apoptóticas del tipo

Bcl-x1, y por tanto se piensa ya en su posible utilización en el humano con la aludida patología.

Otra condición cardíaca con exagerada apoptosis es la displasia arritmogénica del ventrículo derecho, afección recientemente reconocida como causa común de trastornos del ritmo, muerte súbita e insuficiencia cardíaca, en personas no pocas veces jóvenes. La destrucción miocitaria apoptótica (a la que en ocasiones se añade un proceso inflamatorio, una miocarditis) se ve sustituida aquí por amplias áreas de tejido adiposo y fibroso, especialmente del ventrículo derecho, de acuerdo con los trabajos de FONTAINE y otros (37).

El caso del virus de inmunodeficiencia humana merece finalmente un breve comentario. En contraposición al de la mononucleosis infecciosa antes considerada, su nefasta influencia estriba en la capacidad para inducir apoptosis tanto en células parasitadas por el virus como en las no invadidas. Se admite ahora (y así lo afirmó el mismo Luc MONTAGNIER en *Science*) (38), que VIH procura de este modo una profunda disfunción inmunológica (arrasando apoptóticamente las células soporte de la respuesta inmune, principalmente linfocitos T CD4+) y también puede inferir una agresión neuronal similar que conduce a la demencia.

Concluamos pues afirmando que la apoptosis o muerte celular programada es un concepto apasionante que nos sumerge en la intimidad molecular de la célula y que además puede explicarnos múltiples fenómenos tanto fisiológicos como patológicos. Un avance fértil, fecundo, que todavía no ha proporcionado sus últimos frutos. ◀

J. Sillero E. de Cañete, *Medicina Interna*

Referencias bibliográficas

1. PHELPS, E.; WU, P.; BRETZ, J.; BAKER, J.R.: «Thyroid cell apoptosis. A new understanding of thyroid autoimmunity», *End. & Met. Clin. N.A.*, 2000. 29:2:375-388.
2. WILLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R.: «Cell death: the significance of apoptosis», *Int. Rev. Cytol.*, 1980. 68:521-606.
3. ARENDS, A.H.; WILLIE, A.H.: «Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology», *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 1991. 32:223.
4. KERR, J.F.; HARMAN, B.; SEARLE, J.: «An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with especial reference to apoptosis of striated muscle fibers», *J. Cell Sci.*, 1974. 14:571.
5. DUKE, R.; OJCIUS, D.; YOUNG, J.D.: «Cell suicide in health and disease», *Sci. Am.*, 1996. December: 80.
6. LACAL, J.C.: «Mecanismo de activación celular en células normales y transformadas por oncogenes», *Sem. Méd.*, 1995. 47:2:55-66.
7. BAZZONI, E.; BEUTLER, B.: «The tumor necrosis factor ligand and receptor families», *N. Engl. J. Med.*, 1996. 334:1:717-1.725.
8. SING, A.; AGGARWAL, B.: «Death domain receptors and their role in cell demise», *J. Interferon Cytokine Res.*, 1998. 18:439.
9. GREEN, D.R.: «Apoptotic pathways. The roads to ruin», *Science*, 1998. 281:1:309.
10. THORNBERRY, N.; LAZEBNIK, Y.: «Caspases: Enemies within», *Science*, 1998. 281:1:312.
11. JU, S.T.; PANKA, D.J.; CUI, H., et al.: «Fas (CD95)/FasL, interactions required for programmed cell death after cell activation», *Nature*, 1995. 373:444.
12. CHINNAIYAN, A.M.; O'ROURKE, K.; TEWATI, M.; DIXIT, V.M.: «FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with death domain of Fas and initiates apoptosis», *Cell.*, 1995. 81:505-512.
13. MUZIO, M.; CHINNAIYAN, A.M.; KISCHKEL, E., et al.: «FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death inducing signaling complex», *Cell.*, 1996. 85:817.
14. KISCHKEL, E.; HELBARDT, S.; BEHRMANN, I., et al.: «Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor», *EMBO J.*, 1995. 14:5:579.
15. SCHULTZE-OSTHOFF, K.; FERRARI, D.; LOS, M., et al.: «Apoptosis signaling by death receptors», *Eur. J. Biochem.*, 1998. 254:439.
16. HSU, H.; XIANG, X.; GOEDEL, D.V., et al.: «The TNF receptor-1 associated protein (TRADD) signals death and NF-kappa B activation», *Cell.*, 1995. 81:495.
17. CECCONI, E.; ÁLVAREZ-BOLADO, G.; MEYER, B.I., et al.: «Apaf-1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development», *Cell.*, 1998. 94:727.
18. RUDIN, C.M.; THOMPSON, C.B.: «Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death», *Annu. Rev. Med.*, 1997. 48:267-281.
19. BERTIN, J.; ARMSTRONG, R.C.; OTTILE, S., et al.: «Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus protein inhibit both Fas- and TNFR1-mediated induces apoptosis», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. 94:1:172.
20. LISTON, P.; ROY, N.; TOMAI, K., et al.: «Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and related family of IAP genes», *Nature*, 1996. 379:349.
21. PAN, G.; NI, J.; WEI, Y.F., et al.: «An antagonist decoy factor and a death domain-containing receptor for TRAIL», *Science*, 1997. 277:815.
22. NEWTON, K.; STRASSER, A.: «The Bcl-2 family and cell death regulation», *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1998. 8:68.
23. ADAMS, J.; CORY, S.: «The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival», *Science*, 1998. 281:1:322.
24. KLUCK, R.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D., et al.: «The release of cytochrome c from the mitochondria: A primary site of Bcl-2 regulation of apoptosis», *Science*, 1997. 275:1:132.
25. HENDERSON, S.; ROWE, M.; GREGORY, C., et al.: «Induction of Bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cell from programmed cell death», *Cell*, 1991. 65:1:107-1.115.
26. WU, J.; WILSON, J.; HE, J., et al.: «Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease», *J. Clin. Invest.*, 1996. 98:1:107.
27. GIORDANO, C.; STASSI, G.; DE MARÍA, R., et al.: «Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto thyroiditis», *Science*, 1997. 275:960.
28. SYMONDS, H.; KRALL, L.; REMINGTON, L., et al.: «P53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo», 1994. 78: 703-711.
29. RILEY, D.J.; LEE, E.Y.-H.P.; LEE, W.H.: «The retinoblastoma protein: more than a tumor

- upressor», *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1994. 10: 1-29.
30. LOWE, S.N.; BODIS, S.; MCCLATCHEY, A., et al.: «P53 status and efficacy of cancer therapy in vivo», *Science*, 1994. 266:807-810.
31. DOLE, M.; NÚÑEZ, G.; MERCANT, A.K., et al.: «Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma», *Cáncer Res.*, 1994. 54:3.253-3.259.
32. WEBB, A.; CUNNINGHAM, D.; COTTER, F., et al.: *Phase-1 bcl-antisense trial; proliminary results*, 1996. 7(3):32 (abstract).
33. HOPPENER, J.W.M.; AHRÉN, B.; LIPS, C.J.M.: «Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus», *N. Engl. J. Med.*, 2000. 343:411-419.
34. CHERVANSKY, A.; WANG, Y.; WONG, F., et al.: «The role of Fas in autoimmune diabetes», *Cell*, 1997. 89:17.
35. MARGOLIS, R.L.; CHUANG, D.-M.; POST, R.M.: «Programmed cell death: implications for neuropsychiatric disorders», *Biol. Psychiatry*, 1994. 35:946-956.
36. SEARLE: *J. Gastroenterol.*, 1987. 2:77.
37. FONTAINE, G.; FONTALIRAN, F.; HÉBERT, D., et al.: «Arrhythmogenic right ventricular dysplasia», *Annu. Rev. Med.*, 1999. 50:17-35.
38. GOUCEON, M.-L.; MONTAGNER, L.: «Apoptosis in AIDS», *Science*, 1993. 260:1.269-1.270.
39. COHEN, J.I.: «Epstein-Barr virus infection», *N. Engl. J. Med.*, 2000. 343:481-492.