



Apoptosis

- **Lucía Roa-Peña, MD.** Department of Obstetrics and Gynecology, Yale University School of Medicine, New Haven. USA.

Apoptosis es una forma de muerte celular programada, la cual juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos. Sus características morfológicas y bioquímicas son distintas a las de la necrosis. Estas diferencias incluyen aumento en los niveles intracelulares de calcio, cambios en las proteinquinasas A y C, síntesis de RNA y proteínas y en la expresión genética. Se han involucrado varios genes oncogénicos y oncosupresores en la regulación de la apoptosis. La posibilidad de regular la apoptosis podría abrir nuevas perspectivas en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular aumentado o por muerte celular prematura.

INTRODUCCION

Durante mucho tiempo se consideró que toda muerte celular era un proceso patológico que ocurría en las células debido a factores ambientales dañinos. Sin embargo, existen dos mecanismos diferentes: necrosis y muerte celular programada (1).

La apoptosis es la forma más frecuente de muerte celular programada (2), la cual ocurre en células aisladas en medio de un tejido vital, sin producir reacción inflamatoria adyacente. La muerte celular programada es importante para el control del número de células y la organización de los tejidos, ya que elimina células que no tienen función, son producidas en exceso, se han desarrollado inapropiadamente, han terminado con su ciclo de vida, son dañinas o innecesarias para una función específica (ejemplo: queratinocitos).

Este tipo de muerte celular se conserva filogenéticamente en diversos organismos, entre otros: nemátodos, insectos, anfibios, aves y mamíferos (3-5). Durante el desarrollo embriológico y fetal un gran número de células son eliminadas mediante apoptosis (6). Por ejemplo en el sistema nervioso aproximadamente 20-80% de las neuronas mueren antes de completar su desarrollo (7). Así mismo, durante la metamorfosis de los insectos y anfibios los tejidos juveniles son eliminados por medio de la apoptosis (8). En el sistema inmune la muerte celular programada juega un papel importante en la eliminación de linfocitos B y T autoreactivos (9). En

algunos tumores se presenta apoptosis de forma espontánea o inducida por el tratamiento con algunas drogas antineoplásicas (10). Como ejemplos se incluyen cáncer de seno (11), tumor de próstata (12), cáncer pancreático (13), linfoma no Hodgkin (14) y algunos tipos de leucemias (15). También es posible inducir muerte celular programada, si la célula es expuesta a condiciones adversas leves como hipertermia (16), hipotermia (17), isquemia (18), exposición a radiaciones (19), toxinas (20) y químicos (21). Si estas mismas condiciones se presentan severamente entonces se produce necrosis celular, lo cual sugiere que las lesiones leves pueden hacer que la célula se "suicide" para quizás evitar, de esta forma, que se hereden mutaciones.

CAMBIOS MORFOLOGICOS

Necrosis. Debido a daño de la membrana celular o por deleción de energía en la célula, se produce daño en las bombas de sodio-potasio, perdiéndose la permeabilidad selectiva de la membrana. Esto permite que los cationes fluyan dependiendo del gradiente de concentración, aumentando además el volumen de líquido intracelular, lo cual va a dilatar aún más la célula.

El incremento de calcio intracelular activa las fosfolipasas unidas a la membrana, las cuales degradan los fosfolípidos de las membranas causando rompimiento en diferentes sitios (22). Con el rompimiento de los lisosomas se liberan hidrolasas, las cuales aceleran la desintegración de la célula en las etapas finales de la necrosis (23). El DNA expuesto por la digestión proteolítica de las histonas es fragmentado por una deoxiribonucleasa lisosomal (24). Usualmente la necrosis afecta a un grupo de células contiguas y desencadena un proceso inflamatorio en el tejido viable adyacente debido a los residuos celulares liberados.

Apoptosis. Los cambios morfológicos que se presentan en la apoptosis fueron descritos inicialmente por Kerr y colaboradores en 1972 (25). Durante la apoptosis, la célula disminuye su tamaño celular, por disminución del líquido

intracelular y de iones, debido a que el retículo endoplásmico se dilata y produce vesículas que vierten su contenido al exterior (26).

La célula pierde contacto con las células vecinas y desaparecen especializaciones de la membrana como microvellosidades y uniones intercelulares. La cromatina se condensa y se margina contra la membrana nuclear. Debido a la activación de una endonucleasa sensible a calcio y magnesio la cromatina se rompe entre los nucleosomas de una manera específica, en fragmentos de 180-200 pares de bases dando un patrón característico en la electroforesis de gel (27).

Posteriormente, la célula se rompe en varios cuerpos apoptóticos que contienen una variedad de organelos citoplasmáticos intactos y algunos fragmentos nucleares. El tamaño y número de estos cuerpos apoptóticos varía dependiendo del tamaño original de la célula. Las células adyacentes que fagocitan estos cuerpos apoptóticos generalmente pertenecen al sistema fagocito mononuclear, pero también pueden ser fagocitadas por células epiteliales, endoteliales o tumorales (28). Debido a que estos cuerpos apoptóticos están encapsulados por membrana citoplasmática, no hay exposición de restos celulares en el espacio extracelular, por lo que no se presenta reacción inflamatoria (29).

En algunos casos estos cuerpos apoptóticos no son fagocitados sino que son expulsados a un lumen adyacente, y posteriormente se produce aún más dilatación de los organelos citoplasmáticos en un proceso denominado necrosis secundaria (30). Debido a la corta duración del proceso de muerte celular y la falta de respuesta inflamatoria adyacente, se han desarrollado métodos que permiten la identificación *in situ* de las células en apoptosis (31) y la duración del proceso en los diferentes tipos celulares (32).

Factores desencadenantes. Aún no se conocen todos los mecanismos implicados en la apoptosis celular. Sin embargo se han descrito cambios en los niveles de calcio intracelular, proteinquinasas A y C, síntesis de proteínas y de RNA y expresión genética. La mayor parte del conocimiento acerca de la muerte celular programada proviene de estudios realizados en cultivos celulares, principalmente de timocitos, en los cuales se puede inducir apoptosis experimentalmente mediante tratamiento con glucocorticoides.

Calcio. Uno de los primeros cambios que ocurren durante apoptosis en timocitos tratados con glucocorticoides, es el incremento continuo en los niveles de calcio intracelular, los cuales alcanzan los niveles máximos entre los 30-90 minutos y se mantienen durante dos horas aproximadamente. La muerte celular puede prevenirse mediante la incubación de los timocitos

en un medio libre de calcio (33), lo cual indica, que la fuente de calcio es extracelular y no intracelular. No está claro si la entrada de calcio ocurre a través de los canales de calcio ya que, por ejemplo, en células prostáticas el uso de bloqueador de los canales de calcio previene el aumento de calcio intracelular, pero en timocitos tratados con glucocorticoides, el tratamiento con verapamilo o nifedipina, no evita que las células mueran por apoptosis. Los cambios específicos que induce el calcio en la célula no se conocen totalmente. Una posibilidad es que active directamente la endonucleasa que fragmenta el DNA (34).

Proteinquinasas A y C. El AMP cíclico juega un papel importante en la apoptosis de timocitos y otras células linfoides, ya que su incremento con el uso de análogos o agentes que inducen su aumento (prostaglandina E₂, adenosina), causa muerte celular por apoptosis. Este efecto está mediado por proteinquinasa A y, aunque no se produce aumento del calcio intracelular, es un proceso dependiente de calcio, ya que la presencia de quelantes del calcio puede bloquear la apoptosis (35). Por otro lado, la activación de la proteinquinasa C tiene un efecto regulador negativo, protejiendo las células de la apoptosis (36).

Síntesis de RNA y proteínas. Una de las características importantes que distingue la apoptosis de necrosis, es el hecho de que la apoptosis requiere síntesis de RNA y proteínas, y por lo tanto la activación de genes específicos. Esto se ha demostrado por ejemplo en timocitos tratados con glucocorticoides en los cuales se puede prevenir la apoptosis cuando se inhibe la síntesis de RNA y proteínas (37). Sin embargo, esto no siempre es así, ya que se ha visto que en otros tipos celulares como queratinocitos (38), linfocitos B en leucemias crónicas (39) y macrófagos (40), la inhibición en la síntesis proteica no sólo detiene la apoptosis sino que incluso lo promueve.

Cambios en la expresión genética. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se producen 1090 células, de las cuales 131 células embrionarias están programadas para ser eliminadas por apoptosis. Basados en estudios, en este nemátodo se han identificado dos genes promotores de apoptosis *ced-3* y *ced-4* y un gen protector de apoptosis *ced-9*. las mutaciones en alguno de estos genes promotores bloquean la muerte celular (41), lo que indica que su función es causar la muerte en células predestinadas a morir (2). Durante la degeneración de los músculos intersegmentales, en el gusano del tabaco *Manduca sexta*, se activan ciertos genes específicos; entre ellos el más estudiado es el gen que codifica para la proteína ubiquitina, la cual produce degradación proteolítica no lisosomal dependiente de ATP cuando se une a ciertas proteínas citoplasmáticas (42).

Otra enzima cuya expresión se aumenta durante la apoptosis es la transglutaminasa (43). Esta enzima dependiente de calcio, se une a proteínas citoplasmáticas y parece ser responsable en parte de la disminución en el tamaño celular y la distorsión en la forma de la célula. La expresión del gen que codifica para la enzima convertidora de interleuquina-1 B, o "ICE" (interleukin-1 B-converting enzyme), también está aumentada durante la apoptosis. Esta enzima es una proteasa que activa la interleuquina-1 durante los procesos inflamatorios. Si se produce sobreexpresión de este gen, se causa muerte celular debido a su actividad proteolítica (44). También se ha encontrado aumento en la expresión génica de calmodulina (45), c-jun(46), SGP-2(47) y p53 (48), entre otros.

Así mismo existen genes que al expresarse en la célula evitan que se produzca apoptosis, entre ellos el más importante en humanos es Bcl-2, el cual fue descubierto en la translocación más común de los linfomas malignos (49). A diferencia de otros proto-oncogenes, Bcl-2 protege la célula de morir, en cambio de promover su división celular. La proteína codificada por este gen se encuentra en la membrana interna de las mitocondrias, membrana nuclear y retículo endoplásmico de células postmitóticas de vida larga como las neuronas (50). Sin embargo, parece que la sola presencia de este gen no es suficiente para evitar la apoptosis. Ciertos estudios han mostrado que Bcl-2 tiene que competir con una proteína denominada Bax, la cual tiene una secuencia muy similar de aminoácidos, pero a diferencia de Bcl-2 promueve muerte celular. Dependiendo de cual proteína predomina se produce o no apoptosis. Por ejemplo si Bcl-2 se encuentra en exceso, forma parejas con las moléculas de Bax hasta agotarlas y el resto forma parejas de Bcl-2, evitando que se produzca la muerte celular (51).

Perspectivas. El papel de la apoptosis es de importancia crítica en una gran variedad de fenómenos biológicos. Los hallazgos genéticos y de biología molecular han abierto

nuevas e interesantes perspectivas en las áreas clínicas y farmacológicas. Una de las áreas que ha sido más estudiada hasta el momento es su posible aplicación en neoplasias. La mayoría de los tumores contienen zonas en las cuales se está produciendo apoptosis. Algunas neoplasias hormono-dependientes sufren apoptosis *in-vivo* con el estímulo apropiado. Por ejemplo, se induce apoptosis de las células B en la leucemia linfocítica crónica mediante el tratamiento con glucocorticoides (52) y en carcinoma de seno por el uso de análogos de LHRH y somatostatina (53). Otra forma más específica de inducir apoptosis es el uso de anticuerpos monoclonales, dirigidos contra ciertos antígenos en diferentes tipos de neoplasias. Por ejemplo, en linfoma, las células B mueren por apoptosis cuando se tratan con inmunoglobulinas contra antígenos de membrana (54).

La posibilidad de regular la apoptosis tiene muchas implicaciones terapéuticas en enfermedades con exceso de proliferación celular como cáncer, o en la prevención de muerte celular prematura como en las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Sin embargo, aún existen muchos genes y proteínas que deben estudiarse para entender completamente su función bioquímica y el mecanismo de activación de la apoptosis.

SUMMARY

Apoptosis, a form of programmed cell death, plays an important role in the development and maintenance of tissues. It's morphological and biochemical features are different from necrosis. These differences include an increase in the intracellular calcium levels, changes in protein kinases A and C, RNA and protein synthesis and gene expression. Several oncogenesis and oncosuppressor genes have been involved in the regulation of apoptosis. The ability to regulate apoptosis could present new possibilities for the treatment of diseases with unregulated cell growth or premature cell death.

REFERENCIAS

1. Wylle AH. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In Bowen ID, Lockshin RA eds Cell death in Biology and Pathology. London: Chapman & Hall, 1981: 9-34.
2. Schwartz LM, Simth SW, Jones MEE, Osborne BA. Do all programmed cell death occur via apoptosis? Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 980-984.
3. Yuan JY, Horvitz HR. The Caenorhabditis elegans genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. Dev Biol 1990; 138: 33-41.
4. Wadewitz AG, Lockshin RA. Programmed cell death: dying cells synthesize a coordinated, unique set of proteins in two different episodes of cell death. FEBS Lett 1988; 241: 19-23.
5. Budtz PE, Spies I. Epidermal tissue homeostasis: apoptosis and cell emigration as mechanisms of controlled cell deletion in the epidermis of the toad, Bufo bufo. Cell Tissue Res 1989; 256: 475-486.
6. Hurlle JM. Cell death in developing systems. Methods and achievements in experimental pathology. 1988; 13: 55-86.
7. Hamburger V, Oppenheim RW. Naturally occurring neuronal death in vertebrates. Neurosci Comm 1982; 1: 39-55.
8. Kerr JF, Harmon B, Searle J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. Cell Sci 1974; 14: 571-585.
9. Mac Donald HR, Lees RK. Programmed cell death of autoreactive thymocytes. Nature 1990; 343: 642-644.
10. Barry Ma, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs,

- toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2353-2362.
11. Mendelsohn ML. Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse. II. Growth and survival of cells labelled with triated thymidine. *J Natl Cancer Inst* 1960; 25: 485-500.
 12. Szepeshazi K, Korkut E, Szende B, Lapis K, Shally AV. Histological changes in Dunning prostate tumors and testes of rats treated with LH-RH antagonist SB-75. *Prostate* 1991; 18: 255-270.
 13. Szepeshazi K, Lapis K, Shally AV. Effect of combination treatment with analogs of leutinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) or somatostatin and 5-fluorouracil on pancreatic cancer in hamsters. *Int J Cancer* 1991; 49: 260-266.
 14. Del vecchio MT, Leoncini L, Buerki K, Kraft R, Megha T, Barbini P, Tosi P, Cottier H. Diffuse centrocytic and/or centroblastic malignant non-Hodgkin's lymphomas: comparison of mitotic and pyknotic (apoptotic) indices. *Int J Cancer* 1991; 47: 38-43.
 15. Distelhorst CW. Glucocorticosteroids induce DNA fragmentation in human lymphoid leukemia cells. *Blood* 1988; 72: 1305-1309.
 16. Harmon BV, Corder AM, Collins RJ, Gobe GC, Allen J, Allan DJ, Kerr JF. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int J Radiat Biol* 1990; 58: 845-858.
 17. Nagle WA, Soloff BL, Moss AJ Jr, Henle KJ. Cultured Chinese hamster cells undergo apoptosis after exposure to cold but nonfreezing temperatures. *Cryobiology* 1990; 27: 439-451.
 18. Gobé GC, Axelsen RA, Searke JW. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest* 1990; 63: 770-779.
 19. Yamada T, Ohyama H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed. *Inr J Radiat Biol* 1988; 53: 65-75.
 20. Chang MP, Bramhall J, Graves S, Bonavida B, Wisniewski BJ. Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis. Evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. *J Biol Chem* 1989; 264: 15261-15267.
 21. Ijiri K. Apoptosis (cell death) induced in mouse bowel by 1,2-dimethylhydrazine, methylazoxymethanol acetate and gamma rays. *Cancer Res* 1989; 49: 6342-6346.
 22. Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 1978; 253: 4809-4817.
 23. Hawkins HK, Ericsson JLE, Biberfeld P, Trump BF. Lysosome and phagosome stability in lethal cell injury. Morphologic tracer studies in cell injury. *J Biol Chem* 1978; 253: 4809-4817.
 24. Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986; 7: 115-19.
 25. Kerr JF, Wyllie AH. death and the cell. *Immunol today* 1986; 7: 115-19.
 26. Morris RG, Hargreaves AD, Duvall E, Wyllie AH. Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *AM J Pathol* 1984; 115: 426-436.
 27. Willie Ah. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.
 28. Willie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell Death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
 29. Sheridan JW, Bishop CJ, Simmon RJ. Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line. *J Cell Sci* 1981; 49: 119-137.
 30. Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JF. Electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 1975; 116: 129-138.
 31. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of programmed cell death In situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
 32. Bursh W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogen* 1991; 11: 847-853.
 33. McConkey DJ, Hartzell P, Duddy SK, Hakansson H, Orrenius S. 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca²⁺-mediated endonuclease activation. *Science* 1988; 242: 256-259.
 34. Arends MJ, Morris RJ, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.
 35. McConkey DJ, Orrenius S, Jondal M. Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J Immunol* 1990; 145: 1227-1230.
 36. McConkey DJ, Hartzell P, Jondal M, Orrenius S. Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. *J Biol Chem*, 1989; 264: 13399-13402.
 37. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 142: 67-77.
 38. McCall CA, Cohen JJ. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous nuclease. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 111-114.
 39. Collins RJ, Harmon BV, Souvlis T, Pope JH, Kerr JF. Effects of cycloheximide on Bchronic lymphocytic leukaemic and normal lymphocytes in vitro: induction of apoptosis. *Br J Cancer* 1991; 64: 518-522.
 40. Waring P. DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J Biol Chem* 1990; 265: 14476-14480.
 41. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986; 44: 817-829.
 42. Hershko A. Ubiquitin-mediated protein degradation. *J Biol Chem* 1988; 263: 15237-15240.
 43. Fesus L, Thomazy V, Autuori F, Ceru MP, Tarcsa E, Piacentini M. Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 1989; 245: 150-154.
 44. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig E, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 1993; 75: 653.
 45. Dowd DR, MacDonald PN, Komm BS, Haussler MR, Miesfeld R. Evidence for early induction of calmodulin gene expression

- in lymphocytes undergoing glucocorticoid-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1991; 266: 18423-18426.
46. Rubin E, Khabanda S, Gunji H, Kufe D. Activation of the c-jun protooncogene in human myeloid leukemia cells treated with etoposide. *Mol Pharmacol* 1991; 39: 697-701.
 47. Bettuzzi S, Troiano L, Davalli P, Tropea F, Ingletti MC, Grassilli E, Monti D, Corti A, Franceschi C. In vivo accumulation of sulfated glycoprotein 2 mRNA in rat thymocytes upon dexamethasone-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175: 810-815.
 48. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-347.
 49. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41: 889-896.
 50. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6961-6965.
 51. Oltvai Z, Millman C, Korsmeyer S. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609.
 52. McConkey DJ, Aguilar-Santelises M, Hartzell P, Eriksson I, Mellstedt H, Orrenius S, Jondal M. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991; 146: 1072-1076.
 53. Szende B, Lapis K, Redding TW, Srkalovic G, Schally AV. Growth inhibition of MXT mammary carcinoma by enhancing programmed cell death (apoptosis) with analogs of LH-RH and somatostatin. *Breast cancer Res Treat* 1989; 14: 307-314.
 54. Hasbold J, Klaus GGB. Anti-immunoglobulin antibodies induce apoptosis in immature B cell lymphomas. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1685-1690.