

## Progresos en Pediatría: *Medicina molecular*

# Apoptosis o la muerte celular programada

Dres. ALBERTO ROSETO\* y CATHERINE BRENNER\*\*

Arch.argent.pediatr 1999; 97(4): 253

### INTRODUCCION

Todos los seres vivos, un día u otro deben morir. A pesar de que el hombre sabe esto desde que comenzó a elaborar mecanismos superiores con su cerebro, es sólo después de 20 años que empezamos a entender que la muerte celular programada (PCD, por programmed cell death) está justamente establecida en los genes de cada genoma de todas las especies vivientes.

Como lo venimos tratando en capítulos anteriores, la apoptosis (en griego: la caída de las hojas en otoño) es un mecanismo vital y fisiológico de los seres vivos. Su participación desde la ovulación, el ciclo menstrual (la menstruación es el síntoma de un suicidio celular colectivo del epitelio uterino que esperaba albergar un óvulo fecundado por un espermatozoide), el desarrollo y modelación del embrión, la renovación constante de los epitelios en la vida adulta constituyen ejemplos claros de procesos replicativos y apoptóticos asociados. Sin embargo, hay dos tejidos únicos en los organismos animales superiores desde el punto de vista de su plasticidad, adaptabilidad, desarrollo y evolución que los hace únicos de cada organismo. Son el sistema inmunitario (SI) y el sistema nervioso (SN). Ellos son los que modulan y utilizan la apoptosis durante toda la vida para mantener todos estos atributos que los hacen exclusivos. En los capítulos de inmunología molecular hicimos varias veces referencia a este proceso; ahora trataremos de explicarlo en su conjunto, utilizando los sistemas de ejemplos diversos, pero sabiendo que existe en todas las células vivientes.

Cuando vimos el ciclo celular (CC) (*Arch.argent.pediatr* 1997; 95 [5]) dijimos que todas las células poseen esa máquina capaz de hacer dos células a partir de una y que es la base del desarro-

llo y diferenciación de todos los organismos. El CC, programado y regulado genéticamente, es finito y, según se trate de uno u otro fenotipo celular, desde el nacimiento de un niño, una célula no se divide más de 80 veces a lo largo de su vida, si ningún acontecimiento nefasto (infecciones, tóxicos) le ocurre antes. Pero las células no mueren por vejez o agresiones solamente; todo lo contrario, la gran mayoría muere en cualquier etapa de la vida, muy particularmente en el embrión, por PCD (*Gráfico 1*). En efecto, el desarrollo del embrión está caracterizado por fenómenos de crecimientos celulares de gran magnitud, migraciones celulares en masa, modelación de órganos en formación que culminan, después del huevo original, en un ser pluricelular típico de cada especie. Durante todo ese período, ninguna célula de la enorme cantidad que muere lo hace por efecto de infecciones o envejecimiento. Es porque así estaba programada en el genoma de cada especie, siempre en los mismos estadios, siempre en los mismos tiempos; el embrión es "esculpido" con la PCD, suprimiendo tejidos que tenían función en una gran cantidad de órganos en un estadio pero que la morfología final, al nacer, ya no los necesita (si bien veremos con más detalles en los capítulos de embriología molecular, podemos mencionar como ejemplos, las branquias y la cola del renacuajo, que no tiene la rana adulta; los dedos del niño al nacer, luego de la muerte de millones de células que los unían en el embrión) (*Gráfico 1*). Así, si la formación de los orificios del tubo digestivo, la remodelación del aparato urinario y la diferenciación sexual, constituyen ejemplos de la formación de órganos definitivos con una forma determinada, es en la formación del SI y el SN donde el rol de la PCD es fundamental no para la creación de una morfología sino de una función en el adulto y durante toda la vida. (Ver más abajo).

### La morfología de la PCD y la necrosis (*Gráfico 2*)

El término de muerte celular programada (PCD)

\* Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS), Francia. Area de Medicina Molecular, Hospital Posadas. Haedo, provincia de Buenos Aires, Argentina.

\*\* Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS). Université Technologie de Compiègne. Francia.

fue utilizado para aquellas células que estaban destinadas a desaparecer en el plano organizativo durante la embriogénesis. El nombre de apoptosis fue definitivamente acuñado por Kerr en 1972 quien, como otros autores, diferenció a las células que morían "naturalmente" (PCD) de las que lo hacían por infecciones, traumas, isquemia, tóxicos. En estos últimos casos, el proceso se llama necrosis. La necrosis induce la inflamación y los dos procesos siempre son patológicos. Por el contrario, la apoptosis (PCD) normalmente (y en general) nunca induce la inflamación. La necrosis es un proceso violento y catastrófico: las células atacadas por un tóxico, un germen o privadas de sangre oxigenada, se hinchan, la membrana celular se rompe y las moléculas enzimáticas intracelulares son liberadas, las quimioquinas son secretadas por las células adyacentes o por las mismas células que sufren la necrosis (recordar que normalmente no hay quimioquinas detectables, salvo en compartimentos (Microecosistemas [MES]) del SI) (*Arch. argent. pediatr* 1998; 96[5]). Todas esas moléculas en conjunto producen mayor muerte celular y atraen al mismo tiempo las células inflamatorias. El proceso puede terminar en una neoformación tisular: la cicatrización, con una deformación de la arquitectura del tejido (aunque sea mínima), o en la muerte del organismo cuando el proceso no fue natural o farmacológicamente controlado.

La PCD es muy diferente. Desde el embrión hasta el organismo adulto fisiológicamente sano, a todo lo largo de la vida millones de células mueren (en pocas horas o menos) sin dejar rastros ni células inflamatorias (en efecto, es raro observar células apoptóticas en un tejido sano); esta es, tal vez, una de las razones por las que este proceso celular sea conocido y estudiado en una época relativamente reciente. La célula que se suicida se despega de sus células vecinas (pierde sus moléculas de adhesión) y luego se desintegra de una manera ordenada: su núcleo se condensa en "mininúcleos" (en su interior los cromosomas están fragmentados y su ADN cortado en fracciones de tamaños que son múltiplos perfectos entre ellas; ésta es una marca propia de la PCD; en la necrosis el ADN se desintegra de manera anárquica). Estos mininúcleos están rodeados de citoplasma cuya membrana nunca se rompe, aunque se modifica estructuralmente (diferencia esencial con la necrosis celular). Este citoplasma contiene las organelas desestructuradas de la célula inicial. Podríamos decir, entonces, que una célula que sufre PCD se atomiza en varios cuerpos apoptóticos, compuestos de citoplasma con su

membrana modificada pero íntegra, conteniendo los mininúcleos en su interior. Esos cuerpos apoptóticos atraen los macrófagos (por las moléculas características que aparecen en las membranas de las células apoptóticas) que los fagocitan sin dejar rastros ni producir inflamación. Nunca una célula apoptótica libera moléculas de su interior porque su membrana no se rompe. Sin embargo, en recientes investigaciones, sobre todo en la muerte neuronal debida a hipoxia, isquemia o derrame cerebral, se observó otra morfología ultraestructural diferente. La célula no es necrótica, ni apoptótica completamente. El núcleo se fragmenta, pero aunque la membrana celular no se rompe, es muy fina y presenta una especie de perforaciones. Todos estos mecanismos, como veremos, están comenzando a comprenderse y en lo que concierne a la PCD neuronal su conocimiento es capital para poder mejorar el tratamiento de la hipoxia del recién nacido, del sufrimiento fetal o de las isquemias de los prematuros de menos de 1.500 g, por ejemplo.

### **El control intracelular y extracelular de la PCD**

Hay al menos cuatro características mayores de la PCD: 1) es un proceso fisiológico universal; las proteínas que participan en la PCD o sus genes correspondientes están presentes en todas las células nucleadas; 2) su ejecución implica una cascada ordenada de acontecimientos proteolíticos de esas moléculas; 3) al igual que en el ciclo celular, cada etapa está regulada y controlada por proteínas que impiden su ejecución, cuyos genes y otros que seguramente existen y que todavía no conocemos (genes ortólogos), también están en todas las especies vivientes; 4) si bien todas estas proteínas están constitutivamente en la célula, para la ejecución de la PCD en un momento determinado es necesaria su producción y la existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas entre algunas de ellas. Desarrollaremos cada una de las características de la PCD fisiológica, para entender, sobre todo, las enfermedades donde ella es patológica y juega un rol mayor.

### **Generalidades: Breve historia de lo conocido hasta ahora de la PCD**

- A) Desde hace más de 15 años se sabe que se puede frenar la PCD de una célula, inhibiendo experimentalmente su producción de ARNm, la síntesis de proteínas, o ambas. Es la prueba de que cada célula activa su maquinaria genética y regula su propia muerte,

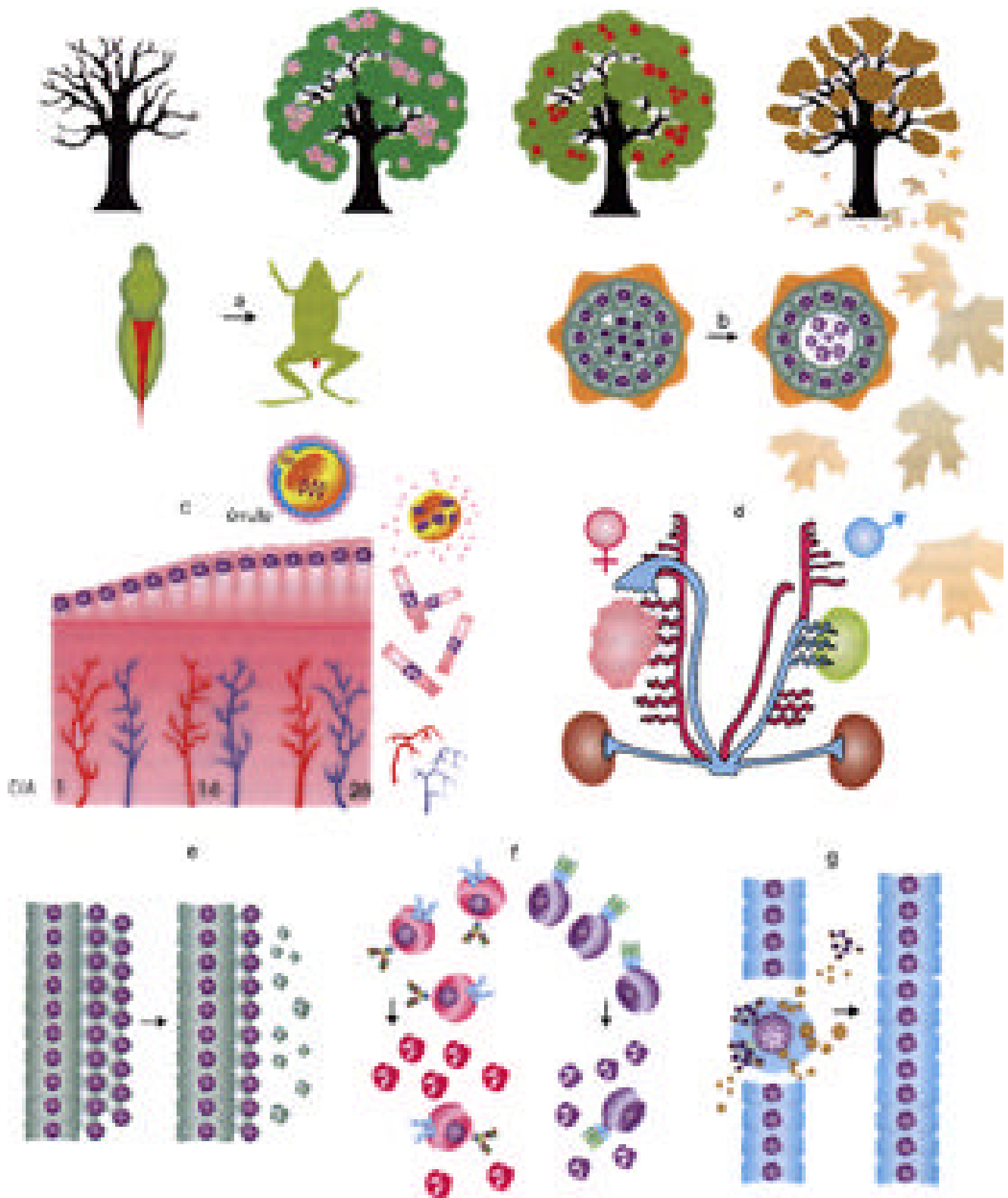


GRÁFICO 1  
Apoptosis (PCD)

según las señales que recibe del exterior o del interior. En el proceso fisiológico de la PCD en general, las señales que vienen del exterior son señales de sobrevida o de suicidio, es decir que activan los genes que impiden la PCD, de lo contrario ésta se produce. Las células tienen al menos cuatro formas de emitir y recibir esas señales externas.

La primera sería la que hace que en todo organismo viviente el número de células que se replican esté en un equilibrio dinámico con las que mueren por PCD. Desde que las células comenzaron a vivir en sociedades, ya no pudieron vivir fuera de ellas. Ningún ser viviente puede subsistir solo (¡qué lección de vida nos muestra la evolución!). Una célula que no recibe información o mensajes de otra, está condenada a morir. El destino de cada una depende del diálogo de señales moleculares que mantiene con sus vecinos celulares y el medio extracelular. Así pues, en todas las poblaciones celulares de un organismo, el número de ellas (hemostasia) es constante en un determinado momento de la vida, y resulta fundamentalmente del equilibrio entre los nuevos ciclos celulares y la muerte de cada una de ellas. Esto es válido en cualquier etapa de la vida: embrión, niño, adulto. Ese modo de recibir y emitir señales (que no necesariamente son factores de crecimiento) entre las células para proliferar, quedar quiescente o morir, liga el destino de cada una con los tejidos y órganos, primero, pero en última instancia al organismo en su conjunto. Por ejemplo, el número de glóbulos blancos después de su aumento tras una infección posteriormente superada disminuye a un valor equivalente al inicial (ver *Inmunología Molecular I y II*, *Arch. argent. pediatr* 1998; 96 [3 y 5]). El ciclo menstrual es otro ejemplo: el remodelaje del epitelio uterino que ocurre después de un

suicidio colectivo de todas las células que esperaban un óvulo fecundado y que se mantenían vivas por señales hormonales, que cesan precisamente cuando no se anida el huevo. De este modo, los genes que impiden el suicidio celular (ver más adelante) al no recibir señales, dejan de expresarse y la célula va a la PCD.

La segunda forma se produce cuando una célula recibe señales que, en última instancia, la inducirán a multiplicarse a través de genes llamados oncogenes (por ejemplo: c.Myc, P53). Estos llevan al suicidio de esa célula, salvo que los genes que inhiben la PCD hubieran sido activados antes (por ejemplo: Bcl-2). De esta manera, al multiplicarse toda célula debe recibir constantes señales de sobrevida, para no autodestruirse. Este es un mecanismo de control de la multiplicación celular fisiológica, que es fundamental para evitar el crecimiento tumoral (como sucede, por ejemplo, cuando el Bcl-2 está mutado y no inhibe la PCD) y sólo recientemente ha sido conocido (ver más adelante). Una tercera forma utiliza dos de las principales vías que desembocan en la vía final de la PCD: los Fas y TNF ligantes y sus respectivos receptores (Fasr y FNTr), son activados cuando en el timo fisiológicamente ocurre la selección negativa de los linfocitos Th y Tc, (ver *Arch. argent. pediatr* 1998; 96[3]) y estas mismas moléculas son reprimidas en el caso de la sobrevida de los linfocitos de memoria. En situación patológica, por ejemplo cuando ciertos virus infectan una célula, la inducen a la apoptosis (otros virus como el EB, el CMV hacen lo contrario: inhiben la PCD para persistir). El sistema inmunológico (SI), por ejemplo, utiliza las diferentes formas de sobrevida o la PCD, según las circunstancias.

La cuarta forma es precisamente la utilizada por el SI. Cuando una célula está infectada

### **Gráfico 1: La apoptosis o la muerte celular programada (PCD), los ejemplos mejor conocidos**

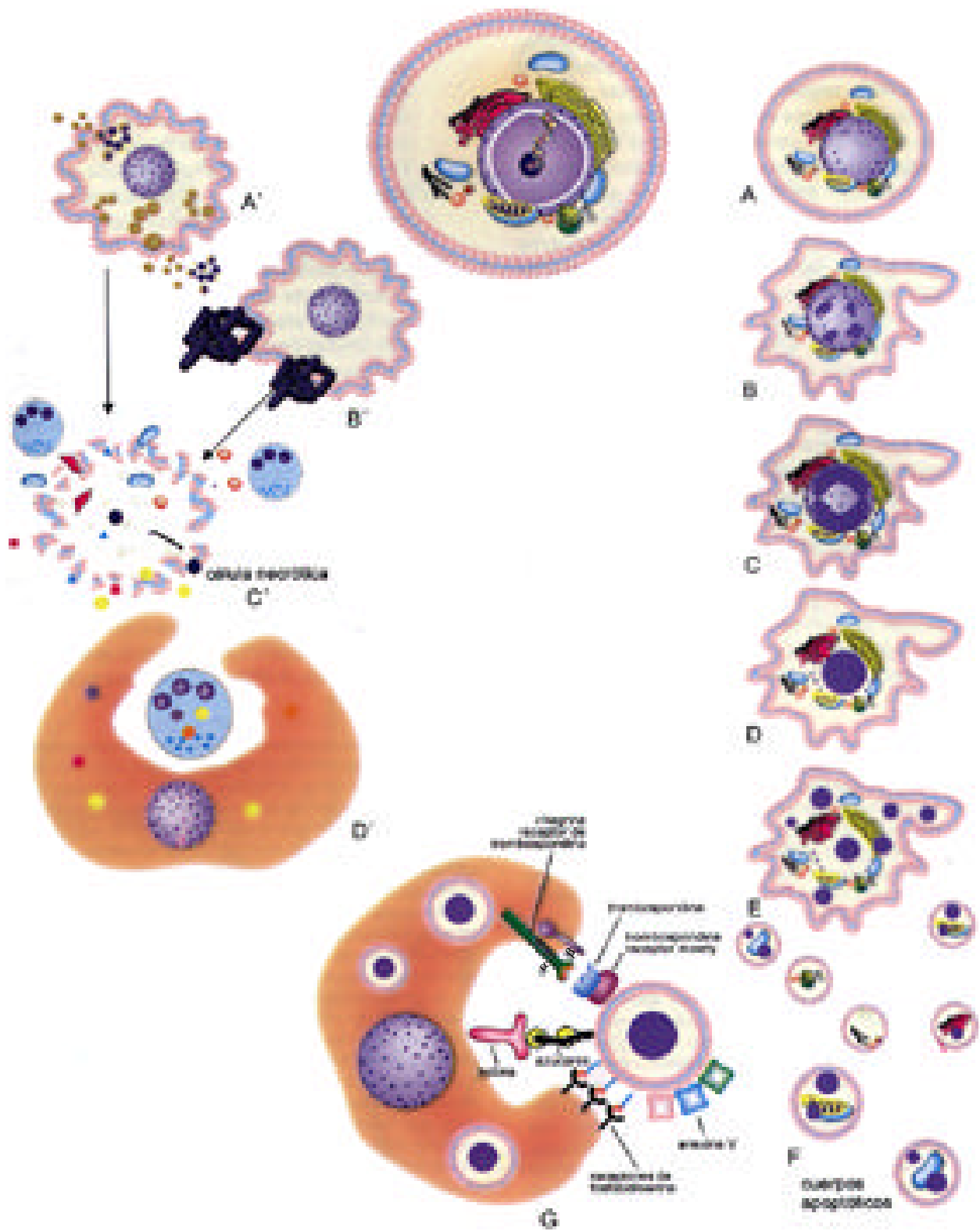
En el curso del desarrollo embrionario y posembriionario de los organismos multicelulares (metazoarios), la PCD participa en el modelaje de los tejidos: reabsorción de los tejidos interdigitales, apertura de los orificios, regresión de los canales de Muller en el embrión de sexo masculino (a, b, d).

La muerte de células de corta vida, como los neutrófilos, una vez superada una infección (g).

La eliminación con la selección positiva y negativa de los

linfocitos T y B. Es decir, que los linfocitos Tc, los NK y el número de las células de memoria también son regulados por la PCD (f).

La involución de los tejidos que funcionan creciendo por ciclos donde son estimulados con factores de crecimiento y hormonas y dejan de ser periódicamente o definitivamente estimulados: el epitelio endometrial en cada ciclo menstrual, los epitelios de las glándulas mamarias durante la lactación, las neuronas privadas de neurotrofinas (c, d).



**GRÁFICO 2**  
*Histología molecular de la apoptosis y la necrosis*

por virus, bacterias o parásitos que se reproducen en su interior o en el caso de las células cancerosas, independientemente de las señales de sobrevivencia o de muerte que hayan recibido, se produce contacto con las células patológicas del SI, en especial con los Tc, que liberan moléculas como las porfirinas y las granzimas. Estas, a su vez, activan a los participantes finales de la PCD (las enzimas caspasas), produciendo un cortocircuito en el resto de la cascada apoptótica y llevando a las células a su autodestrucción (Gráfico 3).

Las señales internas para las proteínas de la cascada apoptótica ocurren fundamentalmente en situaciones patológicas. Cuando anomalías de replicación o de transcripción del genoma de ADN en cada ciclo celular (hay un error cada  $10^6$  pb) o mutadas por agentes tóxicos químicos o físicos provenientes del exterior y moléculas como la p53 detienen un ciclo celular anómalo, otras moléculas correctoras restituyen la normalidad del genoma y si no pueden hacerlo la célula se suicida. En efecto, como veremos en oncología molecular, las anomalías de las moléculas (que inducen o inhiben la PCD) juegan un rol capital en el crecimiento anárquico de los tumores.

En conclusión, ante una célula anormal, infectada o mutada, el ancestral mecanismo de la PCD utiliza varias vías para ejecutar su programa de muerte. En definitiva, para mantener un organismo sano y vivo.

- B) El estudio de un verme hermafrodita, *Caenorhabditis elegans*, de 1 mm, que contiene 959 células y que pone hasta 300 huevos que adquieren el estado adulto en dos días y medio, permitió descubrir los primeros genes de la maquinaria de la PCD. Este verme es transparente, lo que permite observar perfectamente la desaparición de 131 células por apoptosis desde su desarrollo embrionario, cuando cuenta con 1.090 células. Este verme es el primer organismo multicelular en ser secuenciado completamente (fines de 1998) y su genoma es de 19.099 genes (una sorpresa, porque hasta hace poco se pensaba en no más de 11.000) (Arch. argent. pediatr 1997;95[6]). A diferencia de los virus, rickettsias, bacterias, hongos y unicelulares ya secuenciados, este organismo pasa del estado unicelular al multicelular, diferenciando sus células (tiene un sistema nervioso rudimentario de 302 neuronas) lo que permitirá estudiar las moléculas implicadas en la transmisión nerviosa y en las relaciones entre sus células, entre otras cosas. En este verme,

### Gráfico 2: Los estadios morfológicos de la apoptosis

Los caracteres morfológicos de la PCD son estereotipados por un determinado fenotipo celular, cualquiera sea la causa o señales de apoptosis que haya recibido. Los acontecimientos moleculares repercuten en el plano morfológico a nivel de la membrana plasmática, el citoplasma y en el núcleo y no se conoce con certeza el grado de responsabilidad que le cabe a cada uno en el plano fisiológico.

En la mayoría de las circunstancias, ante una agresión, falta de señales de sobrevivencia o aumento de señales de muerte, una célula normal va hacia la necrosis o hacia la PCD. a) La vía de la PCD comienza con disminución del volumen celular, condensación del citoplasma y de la cromatina del núcleo. Este fenómeno está ligado a una pérdida iso-osmótica de agua, de mecanismo desconocido aún. El contenido de ARN y de proteínas se reduce por disminución de su síntesis y por aumento de su degradación. b) Continúa con los cambios de la membrana celular, con una especie de dedos de guante o protrusiones, llamado zeiosis. c) Luego, la cromatina condensada forma dos medialunas en el núcleo, donde la membrana todavía aparece entera. d) Una condensación global de la cromatina con una retracción del núcleo son las características que siguen. En general, en todos los tipos celulares este fenómeno está acompañado por una fragmentación irreversible del ADN en largos fragmentos de 300.000 o de 50.000 pares de bases (pb). Esto es seguido de una segmentación aún más pequeña de 180-200

pb y múltiplos de esos fragmentos y así aparecen en un gel de agarosa donde se hizo migrar ese ADN. Cabe destacar que el ADN mitocondrial parece no ser degradado durante la PCD. e) Posteriormente, el núcleo aparece atomizado en múltiples pequeñas esferas y es el comienzo de la formación de los cuerpos apoptóticos. f) La célula queda fragmentada en cuerpos apoptóticos, con características morfológicas diferentes según encierren fragmentos nucleares o no y otros componentes celulares. Hay tres mecanismos moleculares de reconocimiento de las células o directamente de los cuerpos apoptóticos por los fagocitos: 1) la integrina  $\alpha V \beta 3$  (receptor normal de la vitronectina de los macrófagos) se asocia con una proteína membranaria (CD 36) para formar un receptor de la trombospodina (TSP). Esta TSP es sintetizada por el macrófago mismo, que la secreta al espacio intercelular para que forme un puente entre su propio receptor y un receptor desconocido del cuerpo apoptótico, al que fagocitará; 2) las alteraciones que sufre la membrana plasmática se acompañan de una exposición de ciertos azúcares en las glicoproteínas que han perdido el ácido siálico; 3) la fosfatidilserina, que se une a lectinas y receptores de la fosfatidilserina de los macrófagos, respectivamente. Ciertas citoquinas y otras señales pueden modular este sistema de reconocimiento por los fagocitos.

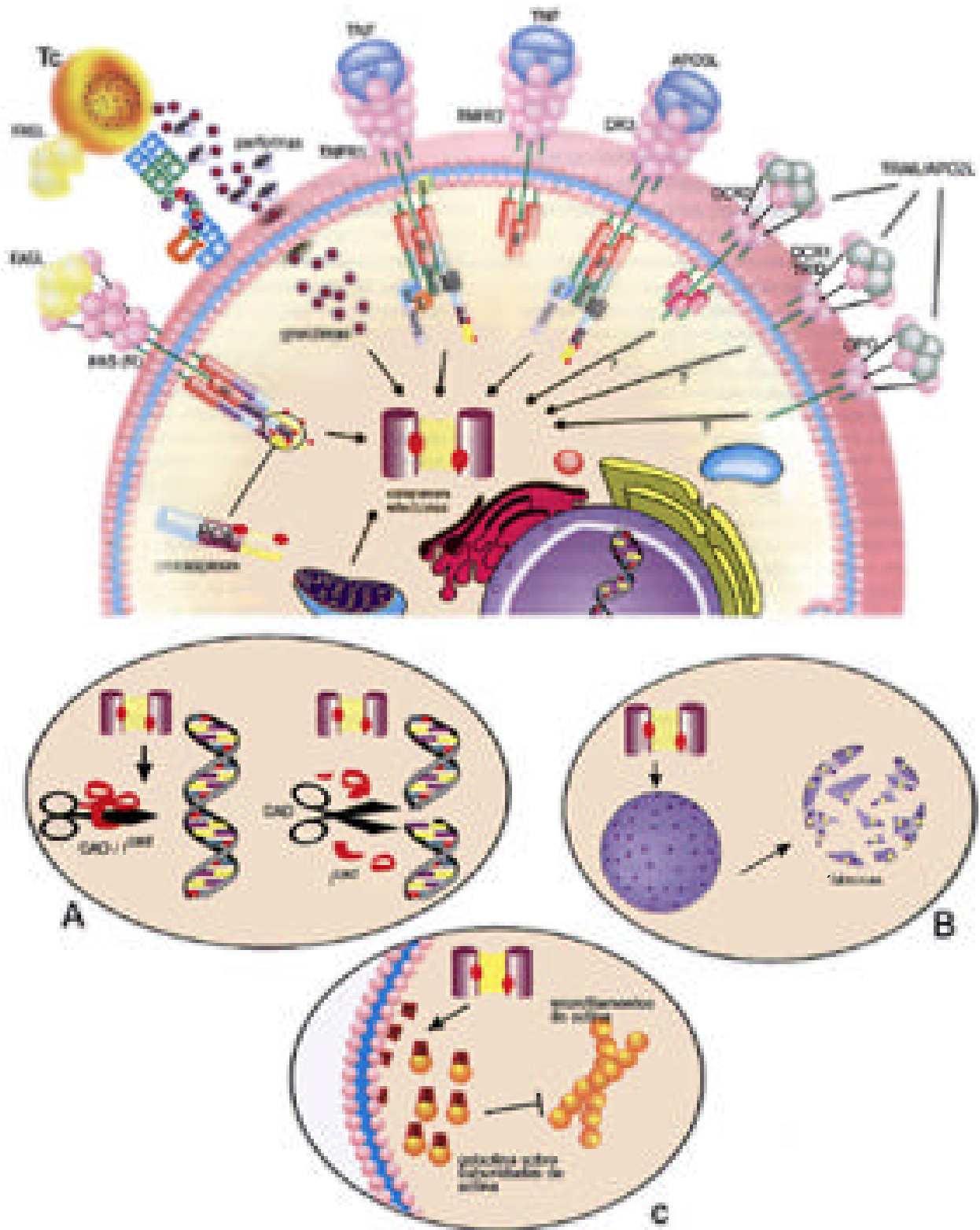


GRÁFICO 3  
Receptores de la muerte (DRs) y sus vías



unos veinte genes comandan todas las etapas de la PCD; unos interviniendo en la decisión de vivir o morir, otros participando directamente en la autodestrucción de la célula y otros permitiendo la ingestión de las células que acaban de morir. Tres son los genes principales: Ced-3, Ced-4 y Ced-9. Los genes Ced-3 y Ced-4 se expresan en las 131 células que mueren por PCD, en las que el Ced-9 no se expresa. En las 959 células restantes, la expresión de Ced-9 impide que

los otros dos actúen. Por lo tanto, los genes Ced-3 y Ced-4 inducen la muerte (proapoptóticos) y el Ced-9 sostiene la vida (antiapoptótico). El producto del gen Ced-3 es una proteasa, más precisamente llamada caspasa que, como veremos, existe en formas inactivas o preproteasas y la cascada (hay dos equivalentes conocidos: la cascada de la coagulación y el sistema de complementos) ocurre por proteólisis sucesivas que van transformando preenzimas inactivas en

### Gráfico 3: Receptores de la muerte y sus vías

A) Sobre la membrana celular (MC), se ubican miles de proteínas pertenecientes a una familia de receptores de la muerte (death receptors, DR). Los DR, llevan, clásicamente, la célula al engranaje de la PCD, pero en algunos momentos utilizan vías distintas e incluso otras que son opuestas a la ejecución de la apoptosis.

Los miembros de esta familia de receptores están compuestos por tres proteínas homólogas (homotrímeros), con una estructura extracelular, una transmembranaria y una intracelular. En esta última se encuentran los "death domain" (DD), con tendencia a contactarse, por lo que se agrupan en trímeros similares a la estructura extracelular. Cada ligante, también compuesto por moléculas triméricas, en realidad se liga con tres moléculas similares que, juntas, constituyen el DR activo. En el gráfico están señaladas, además, las proteínas FADD (por FasR-associated death domain, también llamado Mort-1) con su dominio DED (por death effector domain) que por una unión homofílica se unen a dominios DED de las propias caspasas, cuyo ejemplo más representativo es la caspasa 8 (también llamado CARD, por caspase recruitment domain). Los dominios DED se encuentran en las caspasas 2, 8, 9 y 10. Después de su incorporación a la vía a través de los FADD, estos DED de las caspasas inducen su autocatálisis, pasando así de una procaspasa a una caspasa efectora que activa a la caspasa 9, llegando finalmente a la apoptosis. Las vías del TNFR1 y del DR3 son globalmente similares en cuanto a las estructuras proteicas que las constituyen, así como por los roles biológicos que cumplen. En efecto, ambas poseen vías proapoptóticas y antiapoptóticas. Como vemos en la figura, las proteínas adaptadoras TRADD (por TNFR-associated death domain) se ligan con su propio DD al DD del TNFR-1 y actúan asociando otras proteínas señaladoras, como RIP (por receptor-interacting protein y TRAF2 (por TNFR-associated factor-2). Ambas conducen a la estimulación de la vía de las MAPs quinasas (que termina activando al gen c-Jun) y de la vía que estimula al NF- $\kappa$ B (ver Gráfico 6). Ambas vías son estimulantes de la proliferación y el crecimiento celular y, en consecuencia, son antiapoptóticas. Lo mismo ocurre con el DR3, especialmente en su estimulación de la vía del NF- $\kappa$ B. Ambos DR, el TNFR1 y el DR3, siguen la vía proapoptótica de una manera similar al FasR. Como ya se explicó en el texto, las vías y las moléculas que participan después de la activación los DR4 y DR5 así como los DcR1 (son trímeros de moléculas de glicosilfosfatidilinositol [GPI] proteínas ancladas en la MC) y DcR2, son menos conocidas.

En este gráfico, mostramos también la estructura y función de las caspasas, desde su activación y en los Gráficos 4 y 5 se muestran los acontecimientos moleculares finales de la cascada.

Desde el *C. elegans* al hombre se han identificado 13 caspasas con distintos roles en la PCD y también en la inflamación. La 11 y la 12 sólo se encontraron en los ratones. Sus funciones fueron atribuidas después de numerosos estudios de especificidad enzimática, en ratones knockout y de actividades biológicas in vitro y in vivo. La estructura fue demostrada con la cristalización de la caspasa 3. La parte activa de la enzima de una de las dos subunidades proteicas que constituyen un heterodímero, una de 20 kDa y otra de 10 kDa, se junta con otra igual, formando un tetrámero activo. Ambas subunidades contribuyen con algunos de sus amino-ácidos (AA) para el sitio catalítico (sitio activo de las enzimas). Todas las caspasas tienen una estrecha homología en esas dos subunidades, pero al igual que otras proteasas, cuando están como pre-enzima (en este caso, procaspasa) tienen un dominio muy variable (de 23 a 216 AA) en la porción NH<sub>2</sub> terminal que está involucrado en su regulación.

B) Uno de los roles mayores de las caspasas es inactivar las proteínas que protegen a la célula de la apoptosis. Rompen el complejo natural de la nucleasa CAD con su inhibidor, el Icad/DFF45; al destruir este último, la nucleasa fragmenta el ADN celular:

Vimos morfológicamente los cambios sucesivos que va sufriendo el núcleo en el camino de la PCD (Gráfico 2). Las caspasas contribuyen a ello, desensamblando la polimerización de los filamentos intermedios, láminas A, B y C, que normalmente están unidos en la forma "cabeza-cola". Las caspasas las cortan en un único sitio, produciendo el colapso de las láminas y facilitando la condensación de la cromatina (b).

La desregulación de enzimas es específica para el normal funcionamiento en la replicación o reparación del ADN, es así que las estructuras del citoesqueleto son los blancos de las caspasas en el proceso de la PCD. Se separa el dominio regulatorio del dominio activo de estas enzimas, aumentando o disminuyendo su actividad. Por ejemplo, en el caso de la gelsolina, que ordena los microfilamentos de actina, su actividad es desordenada después de la proteólisis que le produjo una caspasa. La deformación de la membrana celular, la formación de los dedos de guante o ampollas, es en parte debido a esto (c).



enzimas activas.

Pero lo importante de todos estos estudios básicos es que existen equivalentes de estos genes en toda la filogenia animal (en las plantas se van conociendo otras vías que producen PCD). En los vegetales hasta el momento se observaron autofagia y vacuolas pero no heterofagia como en la PCD animal. Aunque hay genes implicados en el control de la muerte celular, genes de resistencia a las infecciones que tienen ciertas similitudes con los implicados en la PCD animal y en el hombre, la homología con estos genes es extraordinariamente similar, aunque desde el punto de vista molecular, los mecanismos y vías que llevan a la PCD son mucho más complicados y con otros participantes, que ahora se van conociendo y que describiremos a continuación.

### Vías y moléculas que participan en la apoptosis

*Los receptores de la muerte celular (Gráfico 3)*

Como ya dijimos, para mantener la homeostasis celular, la PCD conserva el número de células normales y elimina todas aquellas que amenazan la vida del organismo. Para explicar entonces la maquinaria de la PCD y sus diferentes vías y componentes, empezaremos por las moléculas que reciben señales, en este caso las “señales de muerte”. Esas moléculas son los receptores de la muerte (*death receptors, DR*), que se expresan en forma exclusiva en algunos fenotipos celulares y en otros en forma más general y las “señales de la muerte” específicas que reciben, llamadas ligantes (*death ligands, DL*). Estos receptores inician en segundos la cascada de informaciones moleculares que activan las caspasas, para terminar con la muerte celular en aproximadamente una hora.

Los DR pertenecen a la superfamilia del receptor del *tumor necrosis factor* (TNF), la cual tiene por características principales un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio intracelular llamado *death domains* (dd). Los DR bien reconocidos hasta el presente (de los que sólo nombraremos un sinónimo en el texto, mientras que el resto será mencionado en el Glosario) son el Fas, el TNFR1, el DR3, el DR4 y el DR5. Los ligantes que activan esos receptores pertenecen a la superfamilia del TNF. Los TNF, FasL, Apo3L se ligan a los DR, TNF1, Fas y DR3, respectivamente. Mientras que el Apo2L es el ligante del DR4 y del DR5 (ver *Glosario*).

*La vía del Fas*

El Fas y el FasL participan en forma fundamental en varios tipos de PCD en situaciones fisiológicas y patológicas: a) muerte de los linfocitos T activados al final de una respuesta inmune; b) muerte de células infectadas o cancerosas por los linfocitos Tc y NK; c) muerte de células del SI que participan en una inflamación en sitios “santuarios” o “inmunoprivilegiados”, como el ojo, el testículo o el páncreas; d) muerte de los hepatocitos en la hepatitis B fulminante.

*La vía del TNFR1*

Como respuesta a una infección, los macrófagos producen TNF; éste al ligarse específicamente a su receptor, TNFR1, activa los factores de transcripción (FT) NF- $\kappa$ B y AP-1, que hacen transcribir diferentes genes que participan en la respuesta inmune, tanto de la INNE como de la IEA. La expresión de esos genes tiene una acción anti-apoptótica que contrabalancea la acción proapoptótica que tiene el TNFR1, con su dd, que se liga a las proteínas adaptadoras, llamadas TRADD (por TNFR-associated death domain), que activan a las caspasas, llevando la célula a la PCD.

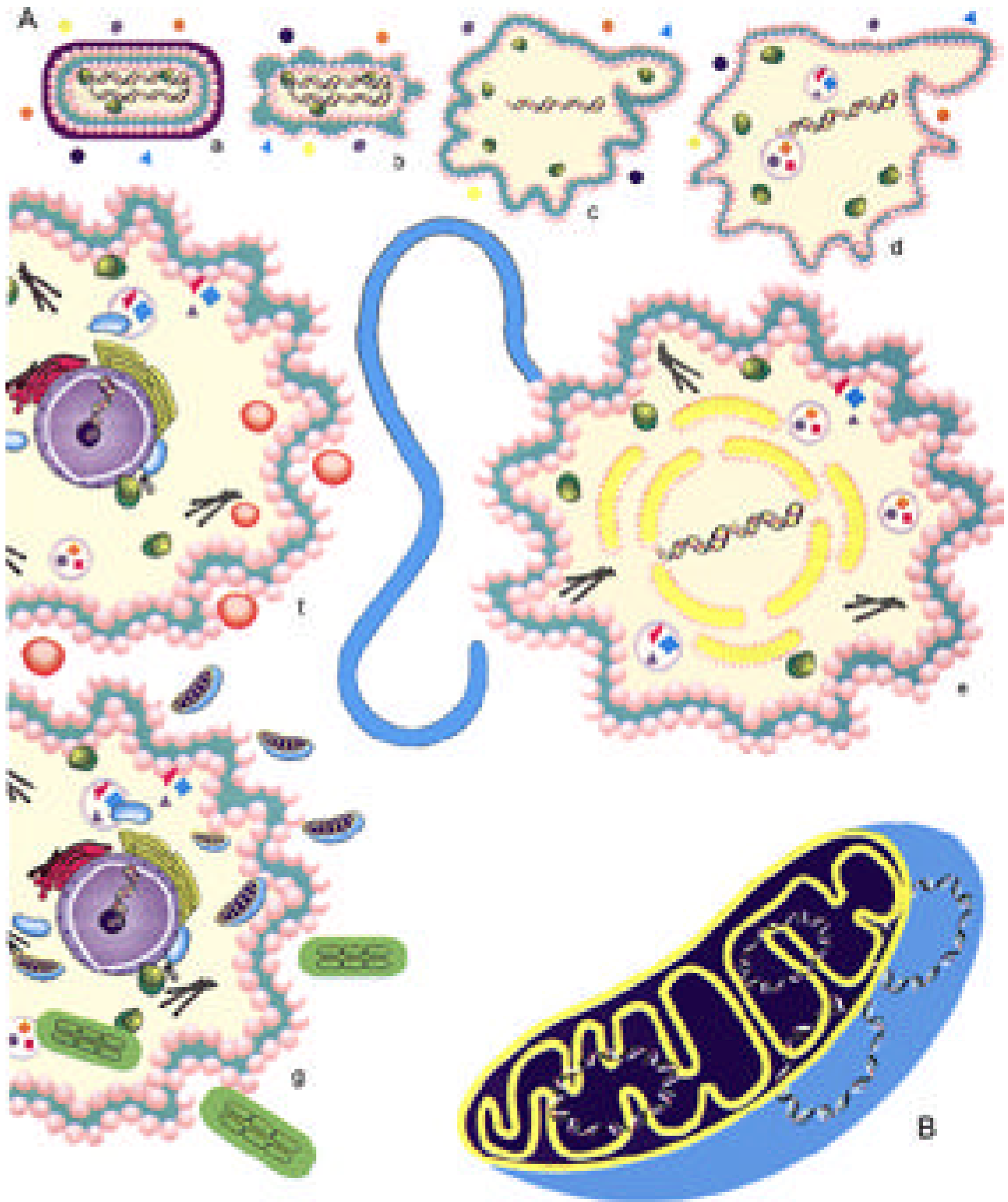
*La vía del DR3*

Esta vía muestra notables similitudes con la del TNFR1. En efecto, cuando se liga a su ligante Apo3L su estimulación induce por un lado, al FT NF- $\kappa$ B, activando éste a los genes antiapoptóticos y, por el otro, también a través de sus dd (ver texto del *Gráfico 3*), se liga a las proteínas adaptadoras FADD (por Fas-associated death domain. Ver *Glosario*), que tienen como función la activación de las caspasas.

Sin embargo, hay diferencias en la expresión de los factores TNFR1 y DR3. Mientras que el primero es expresado en casi todos los tejidos, DR3 se expresa selectivamente en bazo, timo y células hematopoyéticas en general; la expresión de sus respectivos ligantes es a la inversa: el TNF se expresa en los macrófagos y linfocitos activados y la Apo3L, en muchos tejidos. Esto hace suponer que, a pesar de tener vías similares, las diferencias cuantitativas de expresión en diferentes tejidos les haría cumplir roles biológicos diferentes.

*Vía de los DR4 y DR5 y la regulación por los receptores decoy (DecR)*

Más recientemente, se describió una cuarta vía que tiene como ligante a una molécula muy semejante al FasL, la Apo2L. Ella tiene como receptores específicos al DR4 y al DR5. Esta vía también termina en la activación de las caspasas, pero



**GRÁFICO 4**  
*Origen de la célula eucarionte y de la mitocondria*

además puede inhibir la PCD. Los adaptadores de la vía hacia las caspasas no se conocen aún. Pero, por otra parte, se conocen dos moléculas llamadas receptoras "señuelo" (DecR1 y DecR2, por decoy receptors), careciendo el DecR1 de dominio citoplasmático, mientras que el DecR2 sólo posee una pequeña secuencia de aminoácidos sin una función aparente. La función real de estos receptores señuelo, es "atraer" y ligar la Apo2L compitiendo así con los receptores DR4 y DR5, evitando la

PCD. Estos últimos son expresados en muchos tejidos, así como su ligante y los receptores señuelo, lo que sugiere un probable rol protector de la PCD de estas moléculas. Además, los receptores DR4, DR5, DecR1 y DecR2 son transcritos por genes ubicados en la misma región del cromosoma 8, lo que habla de un origen común de un gen parólogo (al menos de la especie humana).

En conclusión, de esta primera etapa de la vía de la PCD podemos decir que, a pesar de conocer-

#### Gráfico 4

##### A) El origen de las mitocondrias

Los primeros organismos unicelulares aparecieron en la Tierra hace casi 4.000 millones de años, con una forma bastante similar a ciertas bacterias actuales. Son los procariontes, no tienen núcleo (en griego *karión* significa "núcleo"). Se multiplican y diversifican en unos millones de especies adaptadas a todos los medios. Casi 1.800 millones de años después apareció una nueva variedad de células llamadas eucariotas (células con núcleo), producto de un extraordinario fenómeno evolutivo. Hoy todos los organismos pluricelulares están compuestos de células eucariotas. Si ellas no existieran no estaríamos los hombres tratando de entender cómo ocurrió todo eso. Sin duda los eucariotas derivan de los procariontes. La dificultad de la ausencia de fósiles procariontes o de organismos de transición que hayan sobrevivido entre ambos es compensada por la presencia de estructuras como las mitocondrias, los cloroplastos (ambos tienen ADN propio) y los peroxisomas que, comparándolos con los procariontes actuales, hacen posible visualizar el escenario aceptado actualmente de esa evolución. La misma se inició hace 3.000 millones de años, cuando comenzó a engendrarse esa futura célula eucariota. Esas células proeucariotas se denominaban endosimbiontes (en griego significa dos seres que viven juntos, uno dentro de otro). En efecto, después de varios años de estudio se obtuvieron pruebas irrefutables de que las mitocondrias y los cloroplastos (plástidos) son de origen bacteriano. La presencia de código genético sin intrones y otras características propias de esas organelas tal como en las bacterias, es la prueba molecular más convincente de sus orígenes. Los hechos sucedieron aproximadamente así: a) la pérdida de la pared celular de un procarionte fue, quizás, el primer acontecimiento. Ahora esa célula sólo tendría una membrana elástica, cargada de ribosomas que producían enzimas exportadas al exterior; b) la elasticidad de la membrana celular permitió crecer a esa célula y la membrana celular adoptó circunvoluciones, alternando pliegues con regiones lisas. En esos "golfos" las enzimas secretadas digerían en el exterior los elementos nutritivos que luego eran absorbidos; c) el repliegue de las membranas y su tendencia a fusionarse como "pompas de jabón" hicieron posible endocitar y por consecuencia internalizar vesículas con enzimas en su interior. Ahora el organismo era capaz de digerir en el interior de esa misma célula. El sector de membrana celular donde estaba fijado el ADN pasó a ser una vesícula internalizada que constituyó el precursor del núcleo celular; d) los elementos del citoesqueleto, microtúbulos, fibras de actina (microfilamentos) y filamentos intermedios, fueron dándole

consistencia a la célula que continuaba creciendo (esto fue una verdadera creación de las células eucariotas en su formación, puesto que no se encuentra ninguna proteína homóloga a las de los citoesqueletos en los procariontes actuales). La célula fue capaz de ingerir y digerir en su interior los alimentos dentro de membranas cada vez más extendidas y comunicadas en compartimientos o en bolsas cerradas. Algunos compartimientos terminan por encerrar definitivamente al ADN para constituir el núcleo definitivo (muchas células fagocitarias actuales conservan estas características); e) pero el verdadero fagocito primitivo se desarrolló cuando adquirió movilidad propia para propulsarse y pasar de un territorio a otro, al adquirir los flagelos; d) la última etapa en la evolución de los endosimbiontes hacia la célula eucariótica fue la adopción o "fagocitosis" de procariontes para retenerlos como "invitados permanentes" (el neutrófilo y los macrófagos actuales también fagocitan procariontes, que pueden matar, pueden sucumbir a ellas o pueden vivir mucho tiempo en una suerte de simbiosis).

Los precursores de los peroxisomas actuales deben haber sido los primeros procariontes en evolucionar como organelas de los eucariotas. Los peroxisomas son capaces de transformar el oxígeno en agua oxigenada y la catalizan con la enzima catalasa. No generan energía en forma de ATP sino como calor. No tienen ADN, pero éste bien pudo haberse perdido en el curso de la evolución. En todo caso se solucionó el problema mayor de entonces: el crecimiento del porcentaje de  $O_2$  en la atmósfera producido por los abundantes procesos fotosintéticos de esa época y que era tóxico para los organismos incapaces de metabolizar el  $O_2$  que hasta entonces vivían en un ambiente anaerobio (como las bacterias anaerobias actuales). En esta organela los iones superóxido ( $O_2^-$ ) también son catalizados por las enzimas superóxido dismutasas (SOD). Los peroxisomas serían las primeras bacterias aerobias "adoptadas" por los eucariotas; g) los precursores de las mitocondrias se mostraron todavía más eficaces para proteger las células eucariotas contra el oxígeno, con la ventaja de producir ATP rico en energía a partir del mismo. Eso sucedió hace ya unos 1.500 millones de años; h) las células pudieron adquirir los plástidos (cloroplastos), un nuevo órgano con ADN genómico pero capaz de generar  $O_2$  a partir de  $CO_2$  y ATP en un proceso metabólico casi opuesto a las mitocondrias.

La adopción de todas estas organelas por los endosimbiontes generó una serie de intercambios de sus genomas, pasando sus genes al ADN central del núcleo y generando algunos exclusivos de ellos. Ninguna de estas organelas puede desprenderse de la célula eucariota que la adoptó y viceversa. Son vitales. Vale la pena señalar que organismos unicelulares

se moléculas con dominios comunes y con varias funciones similares, mucha investigación básica queda por hacer para conocer, por ejemplo, el verdadero significado biológico de cada una de ellas, el por qué de sus diferentes expresiones en los tejidos y sus defectos moleculares para explicar ciertas patologías.

### Las caspasas

En la evolutiva y conservada maquinaria de la PCD, ocupa un rol central la cascada de enzimas proteolíticas llamadas caspasas. Estas se encuentran entre las proteasas más específicas de la naturaleza. En efecto, para "cortar" una proteína lo hacen exclusivamente después de reconocer un ácido aspártico y una secuencia de 4 aminoácidos del lado  $\text{NH}_2$  terminal al corte; este dominio tetrapéptido difiere en su composición y estructura espacial para ser reconocido por las diferentes caspasas, lo que explica simultáneamente la diversidad de sus funciones biológicas y su gran especificidad. Esto también hace entender mejor que la cascada proteolítica de la PCD no es indiscriminada y anárquica, sino coordinada y específica, a veces actuando sobre un solo sitio en una proteína determinada, a la que le hace perder o modificar su función biológica inicial (Gráfico 3). Como ya diji-

mos, las caspasas son producidas a partir de proenzimas (que tienen poco o nada de función catalítica). Estas proenzimas pasan a ser enzimas por la acción proteolítica de otra enzima o por autocatálisis. Estas acciones se retroalimentan positivamente o negativamente según las señales de vida o de muerte que recibe la célula. Recordemos, que en toda la naturaleza, cuando existe una proteasa también existe su inhibidor específico. Este establece el umbral que regula la concentración de la proteasa. En el caso de las caspasas, los inhibidores previenen cualquier activación espontánea y sin sentido que podría llevar a una PCD no deseada. Finalmente, observamos que la proteólisis es siempre un fenómeno irreversible (a diferencia de cualquier otra modificación postraduccional de las proteínas, como la glicosilación, la acetilación, etc.) y que la especificidad y los controles de las proteasas son indispensables y esenciales debido a que encontramos estas enzimas en los procesos biológicos irreversibles de la vida: el desarrollo y la diferenciación de las células del embrión, el ciclo celular y el más irreversible de todos, la muerte celular.

Las precaspasas son producidas y están constitutivamente en todos los fenotipos celulares de

---

### Continuación epígrafe Gráfico 4.

#### Viene de página 263

actuales muestran estados intermedios de esas endosimbiosis. Así los *Apicomplexan*, son protozoarios que desarrollan gran parte de su ciclo de vida dentro de células eucariotas de organismos multicelulares. Los ejemplos para la infectología humana lo constituyen el *Plasmodium falciparum*, el *Toxoplasma gondii* y el *Cryptosporidium parvum*. Los aplicomplexan tienen, además del ADN nuclear con múltiples cromosomas de alrededor de 20.000 kb y mitocondrias con un ADN lineal de 6 kb, una organela llamada apicoplasto (con 4 membranas, lo que hablaría de una doble endosimbiosis) con su propio ADN de 35 kb con muchos genes similares al ADN encontrado en los cloroplastos de plantas y algas y que, al menos en el *Toxoplasma gondii*, sería necesario para el crecimiento y replicación del parásito.

Por otro lado, existen otros organismos unicelulares como las *Trichomonas vaginalis* y la *Giardia*, patógenos para el hombre, que carecen de mitocondrias. Son organismos que darán múltiples respuestas sobre la evolución y los mecanismos vitales de los seres vivos actuales en los años por venir.

Aunque mucho queda por saberse de esa larga marcha de miles de millones de años que lleva desde una célula procarionta a una más grande, fagocitaria, y finalmente a una eucariota actual más grande aún, los misterios claves de esos procesos comienzan a precisarse en la citología molecular actual.

#### B) La mitocondria

Cada célula humana contiene centenas de mitocondrias. Cada una contiene muchas copias de su propio genoma que tiene 16.569 pb y codifica por 37 genes careciendo de intrones y de genoma extragenómico, como tienen las mitocondrias de las plantas, por ejemplo. Las mitocondrias son de origen materno (sólo el óvulo las transfiere, el espermatozoide no penetra con sus mitocondrias cuando lo fecunda. Esto es lo aceptado hasta ahora, aunque recientes trabajos muestran que el ADNm del hombre podría recombinarse con el ADNm de la mujer, es decir, que las mitocondrias del espermatozoide, también podrían penetrar el óvulo). Veinticuatro de esos genes codifican para moléculas de ARN ribosomal o de ARNt que sirven para la fabricación de algunas de sus propias proteínas, producidas por los 13 genes restantes.

Las mitocondrias producen la energía transfiriendo electrones extraídos de los alimentos (glúcidos, lípidos y aminoácidos) a lo largo de la cadena respiratoria (complejo proteínas I-V) presente en la membrana interna de la membrana mitocondrial. En el complejo IV, los electrones transportados por el citocromo C, reciben el  $\text{O}_2$  y el  $\text{H}^+$  para formar  $\text{H}_2\text{O}$ . La energía liberada por la oxidación de los iones  $\text{H}^+$  permite bombear protones  $\text{H}^+$  a través de la membrana interna. La diferencia de potencial generada por la distinta concentración de estos protones permite a la enzima ATP sintetasa producir ATP a partir del ADP y fósforo, que es liberado al citoplasma (donde participa la proteína ANT) (Gráfico 5, A, a).





todos los organismos vivos (también en las neuronas que viven mucho tiempo) y como la PCD puede ser rápida su regulación debe ser precisa y efectiva. Hoy se sabe que múltiples factores intervienen en un número relativamente pequeño de vías comunes. En el control de esta cascada intervienen proteasas reguladoras de otras, cofactores e inhibidores, que establecen una intrincada red de feedbacks y umbrales de concentración que realizan una exquisita regulación para mantener una gran cantidad de procaspasas inactivas, las que en cualquier momento pueden activarse en respuesta a ínfimas cantidades de inductores apropiados. La activación de las caspasas efectoras ya puede representarse (a la luz de los conocimientos actuales) en un modelo en cascada (*Gráfico 6*).

### Gráfico 5

A) Los dominios de las SFs, Bcl-2, Bax y BH3 y sus funciones fueron explicados en el texto.

Una vez más, las experiencias básicas sugieren un modelo estructural y funcional. Los miembros de la SF Bcl-2 se encuentran en la fase citoplasmática de las membranas mitocondriales, en el RE y en la membrana nuclear. Todos estos son compartimientos claves para la vida misma de la célula. Allí, cualquier miembro de esta SF (en el gráfico se representa Bcl-2 que se deduce de la estructura de la proteína Bcl-xl, la primera de esta subfamilia [SF] que fue cristalizada y cuya estructura fue conocida) se liga a un adaptador activador de la procaspasa 9 (en este caso, el Apaf-1). El Apaf-1 tiene 4 dominios esenciales: uno se liga a la Bcl-xl proteína, otro al citocromo c (ver más adelante), un tercero al ATP y el cuarto a la procaspasa, a la que activa. Al estar ligado a Bcl-xl, Apaf-1 es inactivo. Una señal proapoptótica puede provocar su desplazamiento del sitio Bcl-xl por un dominio BH3 de las proteínas de las SFs, Bax o BH3 (A, b). Todo esto provoca la liberación del citocromo c y el ATP por las mitocondrias, que también forman complejos con Apaf-1. Este complejo ("apoptosoma") de Apaf-1, citocromo c y ATP activa a la procaspasa 9 que, por proteólisis, se convierte en caspasa 9 y posteriormente continúa los caminos finales de la PCD (B). Finalmente, la estructura molecular de Bcl-xl muestra que tiene los dominios BH1 y BH2 similares a los de las toxinas bacterianas formadoras de poros en las membranas. De allí la hipótesis que las SF Bcl-2 y Bax forman poros y canales iónicos en las membranas bilipídicas, aunque con diferentes especificidades por los iones. Por ejemplo, los miembros de la SF Bax, llevarían a la PCD independientemente de la presencia o no de caspasas (vías caspasas-independientes) por este mecanismo de permeabilización, especialmente en las mitocondrias y tal como fue bien demostrado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En efecto, este organismo unicelular carece de Bcl-2, Apaf-1 y proteínas similares a las caspasas. Las proteínas Bax y Bad matan a la célula sin activación de la caspasa ni fragmentación de ADN como ocurre en la típica PCD. En la evolución este mecanismo habría sido abandonado por las cascadas más complejas de la PCD, que necesitaron los organismos multicelulares. La AIF (apoptosis inducing factor) sería la proteína mitocondrial prototipo de la cascada PCD

### Acción de las caspasas en la PCD

(*Gráfico 3*)

Ya dijimos que las características fenotípicas de las células apoptóticas y sus cambios son predecibles en una secuencia programada de 30 a 60 minutos (*Gráficos 2 y 3*). Las caspasas son los actores principales de este proceso. Aunque se conocen unos 40 sustratos de las caspasas conocidas, el mecanismo molecular de cómo participan esas proteínas una vez "cortadas", hasta la desintegración estructural de la célula, sólo es conocido en parte. Pero ya es suficiente para decir que un grupo de caspasas efectoras son responsables de esos cambios. Es decir que las caspasas llevan a la PCD "desarmando" la célula, haciendo la proteólisis sobre un número discreto de proteí-

caspasa-independiente.

Las proteínas Bcl-2 están reguladas por citoquinas y otras señales de sobrevivencia a diferentes niveles, estimulando genes de sobrevivencia, como las señales de daño menor del ADN para que éste se corrija, y si la lesión es irreparable, estimulando la proteína pro-PCD Bax a través de la vía de la P-53. La fosforilación de ciertos dominios de la Bcl-2 podría activarla o inhibirla. Una vía de fosforilación implicada sería la de JNK (ver *Arch. argent. pediatr* 96 [5]1998). Fisiológicamente la proteína Bcl-2 protege la célula contra las agresiones, radiaciones, ausencia o disminución de citoquinas y drogas citotóxicas.

### B) Las mitocondrias y la PCD

En los procesos de muerte celular se observan dos mecanismos generales de alteración de la estructura de la mitocondria que explican la liberación de sus factores proapoptóticos, ya mencionados en el texto.

Uno de ellos muestra la ruptura de la membrana exterior mitocondrial después de un desequilibrio osmótico y la expansión del espacio matricial de toda la organela (mitocondria roja, en vías de necrosis). El otro supone la apertura de los poros de los canales porinas en la membrana exterior, sin "edema" de la mitocondria, y la liberación del citocromo c AIF, y caspasas 2, 3 y 9 por esas porinas (mitocondria azul, en vías de PCD). En efecto, en muchos escenarios apoptóticos el colapso del potencial transmembranario interno mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), indica la apertura de un poro de conducción conocido como PT mitocondrial (por poros transición de permeabilidad). Por el momento se demostraron tres proteínas esenciales en estos canales. Una, en la membrana exterior mitocondrial es la proteína llamada porina/VDAC (por voltage dependent anion channel) y las otras dos, en la membrana interior mitocondrial: la ANT (por adenina nucleótido translocador de ATP/ADP) y la ciclofilina D (ligante de la ciclosporina) (A, c). Ambas operan en concierto. La abertura simultánea, por ejemplo, deja pasar masivamente el agua y los iones en forma no selectiva, hace desaparecer la diferencia de potencial en el citoplasma, rompe la cadena respiratoria y libera el citocromo c y AIF. Más recientemente ha sido demostrado que las proteínas de la SF Bax se ligan en un estado conformacional típico a la proteína ANT formando una unidad que facilita la permeabilidad por los PT, que dejan escapar el citocromo c y el AIF hacia el citoplasma (A, a).





nas: a) destruyen los inhibidores naturales, como el inhibidor de la ADN nucleasa llamado CAD/lcad, permitiendo a esta nucleasa fragmentar el ADN; b) destruyen las láminas, los únicos filamentos intermedios del núcleo (ver glosario) y c) desregulan los dominios regulatorios y catalíticos de las enzimas esenciales en la regulación del citoesqueleto celular, como la gelsolina, la FAK (por focal adhesion kinase) y la PAK2 (por p21-activated kinase 2). De una manera sistemática ellas hacen

que la célula en desgracia corte sus contactos moleculares con sus vecinos (ver proteínas de adhesión), reorganizando el citoesqueleto, suprimiendo la replicación del ADN y su reparación, interrumpiendo el splicing del ARN premensajero, fragmentando al ADN, desarmando la estructura nuclear y finalmente, induciendo cambios en la membrana celular que presenta moléculas (la fosfatidil serina, la anexina, un receptor de la trombospodina y ciertas glicoproteínas) que atraen

### Gráfico 6

El modelo es el siguiente: una señal proapoptótica activa una precaspasa iniciadora, que a su vez activa una precaspasa efectora que se convierte en caspasa efectora final. Las distintas caspasas iniciadoras son activadas por diferentes señales. Por ejemplo, la caspasa iniciadora 8 es activada por los DR y la caspasa 9, por los agentes citotóxicos. Como vemos, hay un detalle común a muchas proteasas; en efecto, la caspasa iniciadora se liga a un cofactor (que tiene sus dominios específicos correspondientes). En la activación de la precaspasa iniciadora 8, ésta se liga al cofactor FADD (por Fas-associated protein with death domain) a través de su "death domain", llamado DED (por death efector domain). Durante la activación, la precaspasa 9 lo hace ligándose al cofactor Apaf-1 (por apoptosis activating factor) a través de su dominio CARD (por caspase recruitment domain, que es el mismo DED que el de la caspasa 8), y también requiere otros cofactores como el citocromo c y el ATP. Aún no se sabe con exactitud cómo se producen estas uniones y cómo ellas llevan a la activación de las precaspasas. La división de las caspasas y sus cofactores dentro de la célula sería un control supraestructural en la regulación de la PCD. Para que las caspasas sean activas deben estar como dímeros. Estarían como monómeros constitutivamente y los cofactores servirían para agruparlos como dímeros. Finalmente, los inhibidores proteicos de la apoptosis (IAP), que existen naturalmente en la célula eucariota, también son producidos por ciertos virus que los utilizan como una estrategia más para persistir en la célula infectada, sin que ésta se suicide (ver *Glosario*).

Dijimos que el TNFR y el DR3 pueden llevar a una vía apoptótica clásica, como así también estimular vías anti-apoptóticas en las respuestas inmunes, por ejemplo la vía de la estimulación del NF- $\kappa$ B (por factor nuclear de los linfocitos B, donde se descubrió).

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción (FT) que estimula genes implicados en la inmunidad (tanto la INNE como IEA). Está presente en el citoplasma de la mayoría de los más de 250 fenotipos celulares humanos. Normalmente está inhibido por proteínas inhibidoras y la mejor estudiada es la I $\kappa$ Ba (por inhibidor  $\kappa$ Ba). El NF- $\kappa$ B es un heterodímero compuesto por la p50/p65. Muchas señales extracelulares pueden estimular al NF- $\kappa$ B. El TNFR a y el IL-1R (interleukine -1 receptor), a través de sus dominios intracelulares, se ligan a proteínas que son intermediarias en la activación del NF- $\kappa$ B. La TRAF2 es reclutada por el TNFR y la TRAF 6, por el IL-1R. Ambos TRAFs interactúan con la MAPKKK (MAP kinase kinase kinase conocida como NIK [NF- $\kappa$ B inhibitor kinase]). NIK lleva a la fosforilación de IKKa y IKKb (inhibitor kinase kinase) que forman parte del complejo

I $\kappa$ B quinasa, y este fosforila a su vez al I $\kappa$ Ba, que será destruido más tarde por el proteosoma, dejando libre al NF- $\kappa$ B, para entrar al núcleo.

En este mismo gráfico, vemos que a través de una proteína llamada FAN el TNFR estimula otra vía antiapoptótica y que fundamentalmente activa la proliferación y diferenciación celular: la vía de las MAPKs (mitogen-activated protein kinases), también conocidas como ERKs (extracellular signal regulated kinases). Son una familia de serina/treonina-quinasas activadas por una amplia variedad de receptores celulares diferentes (receptores de hormonas, citoquinas, factores de crecimiento, estímulos físicos y químicos, color, radiaciones UV y otros).

Estas enzimas quinasas serina/treonina, junto a las tirosina-quinasas modulan y amplifican numerosas vías metabólicas fosforilando sobre los aminoácidos serina, treonina y tirosina, respectivamente, que están fuera del sitio activo de moléculas claves, en cualquier punto de una cascada determinada. Cada fosfato-quinasa es contrabalanceada por la acción de una fosfatasa que hace el proceso inverso.

El principal concepto a recordar es que siempre hay en la célula una central reguladora de estas vías que convergen de diferentes señales y circuitos que se entrecruzan en algunos "puntos" (moléculas proteicas). Muchas vías reguladoras pueden converger sobre una proteína y a la inversa, muchas señales diferentes pueden salir de una misma proteína hacia los genes. Aquí la proteína Raf-1 está representada como la que fosforila a la proteína MEK (en serina y treonina) y es uno de esos centros reguladores celulares. MEK fosforila, a su vez, a MAPK (en la tirosina y en la treonina). MAPK tiene diversos blancos y fosforila factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, y a todas las proteínas ligadas a la proliferación y diferenciación celular.

En los mamíferos se han estudiado tres tipos de cascadas de MAPKs que responden sinérgicamente a diferentes señales:

1) La más ampliamente estudiada es la vía o cascada de las MAPKs que fosforilan las proteínas ERK1/2 y éstas terminan estimulando el factor de transcripción (FT), Elk-1.

2) La JNK/SAPK (c-JUN kinase/stress activated protein kinase), que termina en la estimulación de FTs c-Jun y ATF-2.

3) La vía de MAP2 (o P38 kinase), activada en respuesta a citoquinas inflamatorias endotoxinas y que termina en la estimulación de ATF-2, Mef y MAPKAP.

Ya veremos los receptores de membrana y sus vías con más detalle, aquí sólo mencionaremos la vía de estimulación; su centro regulador y sus FTs finales están representados por la secuencia RAS  $\rightarrow$  ERaf  $\rightarrow$  MAPKK  $\rightarrow$  MAPK  $\rightarrow$  diversos FTs.

a los macrófagos y de esta manera los cuerpos apoptóticos son fagocitados.

### Las proteínas antiapoptóticas: la familia de las proteínas Bcl-2

La superfamilia de las proteínas Bcl-2 (*Gráfico 5 y Glosario*), está constituida por proteínas citoplasmáticas claves en la regulación de la PCD. Está dividida en tres subfamilias (SF). La de la Bcl-2 tiene como función principal promover la supervivencia o, mejor dicho, impedir la muerte celular. Esto lo hace ligándose a los adaptadores (cofactores) de las procaspasas, e impidiéndoles ligarse a éstas, que de esta manera quedan no activadas. Las otras dos SF, Bax y BH3, por el contrario, tienen una función proapoptótica. Esto es, el balance de una gran parte de las señales apoptóticas sobre estas proteínas antagonistas determina la supervivencia o la muerte celular. Vemos entonces que la vida requiere la muerte. Que el mecanismo de la PCD está conservado desde los principios de la vida, con una evidente mayor complejidad en los organismos superiores más recientes, incluido el hombre. Vimos al principio que los genes y las proteínas de la PCD del *C. elegans* tienen una homología y funcionalidad muy parecida a la de sus similares (genes ortólogos) de los organismos superiores. Así, los equivalentes humanos de Ced-3 y Ced-4 son las caspasas 8 y 9 y el Apaf-1, respectivamente. Así también, el equivalente humano de Ced-9 es la proteína Bcl-2.

Actualmente se conocen unos 15 miembros de la superfamilia de la Bcl-2, si bien la gran mayoría de las señales de vida o de muerte recibidas por las células son decididas por las concentraciones correspondientes de estas moléculas, que inclinan la balanza hacia uno u otro lado. Sólo el DR Fas al recibir su señal evita al Bcl-2 y activa directamente a la caspasa 8 (*Gráfico 3*): En el *Gráfico 5* también se muestran los dominios de las SF, Bcl-2, Bax y BH. Esos dominios, llamados BH1 al BH4 (por Bcl-2 homologous domains), son secuencias conservadas y con funciones biológicas específicas. Todos los miembros poseen al menos uno de los cuatro dominios. La mayoría de los miembros de la SF Bcl-2, posee al menos los dominios BH1 y BH2, necesarios para inhibir la apoptosis. Estos dos dominios, más el BH4, estarían implicados en la actividad de supervivencia de las moléculas, en tanto que el dominio BH3 está más asociado a la actividad proapoptótica de la SF Bax (que carece de dominio BH4) y la SF BH3 (que sólo posee el dominio BH3).

### La mitocondria

Para terminar el panorama de la presentación de los actores y vías que sigue la PCD hablaremos de la mitocondria. En el interior de la célula, más precisamente en la mitocondria, ocurren procesos capitales para la vida y para la muerte celular. Debemos recordar que la hipótesis más aceptada dice que hace 2 billones de años el ancestro de la célula eucariota actual, endocitó e integró en cooperación permanente las que hoy son las bacterias purpúreas (fotosintéticas). Esta endosimbiosis dio enormes ventajas selectivas a ambos organismos: permitió obtener energía del emergente oxígeno ( $O_2$ ) de la atmósfera, producido precisamente por las bacterias fotosintéticas y que al mismo tiempo pasó a ser tóxico y mortal para todos los organismos unicelulares que eran aneróbicos hasta ese momento (*Gráfico 4*). Esta alianza llevó a un intercambio de sus genomas y desde que comenzaron a vivir en un mundo oxigenado, la vida y la muerte fueron controladas por la protomitocondria que produce energía como ATP, con la cadena oxidativa fosforilante y antioxidantes, pero también desechos peligrosos como los radicales libres (ROS, por oxígeno reactivo species). Actualmente hay muchas líneas de investigaciones que confirman que el nacimiento de la endosimbiosis estableció las bases de la evolución de la PCD actual de los metazoarios y que la apoptosis es independiente de la fosforilación oxidativa y del ADN mitocondrial. El rol central de la mitocondria en la PCD ya ha sido establecido en muchos sistemas celulares. Los acontecimientos principales que ocurren en la mitocondria incluyen: liberación del citocromo c que se asocia a otros activadores de las caspasas; cambio en el transporte de electrones, pérdida del potencial de membrana transmembranario, alteración del ciclo metabólico de óxido-reducción y participación de moléculas constitutivas pro y antiapoptóticas de la SF Bcl-2. Las diferentes señales que llegan a la mitocondria modulan esos dos efectos antagonísticos.

Ya dijimos que existe un mecanismo de muerte caspasa-independiente (una muerte celular más lenta con características no apoptóticas) y que la mitocondria podría jugar un rol mayor tanto por esta vía como en la PCD clásica (*Gráfico 5*).

Al menos tres mecanismos generales son conocidos en la mitocondria y sus efectos podrían interrelacionarse para producir la PCD celular:

- a) La ruptura de la cadena respiratoria y el transporte de electrones en la membrana mitocondrial tendría como efecto principal la caída de la producción de ATP. Aunque esto

- por sí solo no es causa de apoptosis, es fundamental en las etapas finales de la PCD.
- b) La liberación de proteínas activadoras de las procaspasas. La principal es la liberación de citocromo c con ATP que forma parte del apoptosoma con el Apaf-1 y la procaspasa 9, la que, activada una y otra vez, pasa a ser la caspasa 9, llevando a la PCD. Esta sería la vía clásica de la apoptosis. La otra es más lenta y lleva a la necrosis celular. Esto ocurre cuando la caída de la cadena de electrones produce más ROS y decae la producción de ATP. La liberación del citocromo c podría depender del fenotipo celular. En las células donde la producción del citocromo c es abundante la activación de la caspasa después de la señal apoptótica sobre la mitocondria es rápida, pero como el citocromo c es abundante puede seguir produciendo ATP y la apoptosis se concreta. En cambio, en las células que tienen abundante cantidad de inhibidores endógenos de la PCD, como la Bcl-2, el citocromo c puede no inducir la PCD por la vía dependiente de la caspasa (la vía clásica), es entonces que la caída de la producción de ATP y el aumento del ROS llevan a una necrosis. Cabe destacar que otros factores proapoptóticos, además del citocromo c, son liberados por la mitocondria que recibió señales de muerte celular, como el AIF (por apoptosis inducing factor) que es, como el citocromo c, una molécula filogenéticamente antigua (una flavoproteína) con una doble función: la oxidorreducción y la actividad proapoptótica, y las caspasas 2, 3 y 9.
- c) La producción de ROS: durante la fosforilación oxidativa la transferencia de electrones tiene una pérdida normal de 1 a 5% de electrones que pasan a formar el anión superóxido ( $O_2^-$ ). Un aumento de estos aniones es característico cuando la apoptosis es inducida por múltiples señales.

En conclusión, aunque la participación de la mitocondria es esencial para el mecanismo de la PCD en los vertebrados, no hay todavía evidencia de que el citocromo c juegue un rol en los nematodos y los insectos. El equivalente de Apaf-1, el CED-4, no necesita del citocromo c para estimular la procaspasa en el *C. elegans*. El estudio de la filogenética molecular nos dirá si el mecanismo de liberación del citocromo c fue adquirido más recientemente en la evolución o si fue perdido por algunos géneros y especies. También el estudio

del mecanismo de la PCD de los géneros que no tienen ni mitocondrias ni plástidos (como *Trichomonas vaginalis*) va a elucidar muchas preguntas. Todavía más intrigante es la presencia de las proteínas Bcl-2 y sus estructuras capaces de hacer poros en la membrana, tal como lo hacen las toxinas diftéricas y las colicinas bacterianas. Esto último es un sistema antiguo que usan las bacterias como arma para matar a otras competidoras por un espacio vital. Es también destacable la similitud del escenario molecular que ocurre en las células de los mamíferos cuando las señales apoptóticas inducen la translocación del complejo de Bax con ANT que, como dijimos, cooperan a favor de la muerte de la célula (Gráfico 5, A, a).

### LA APOPTOSIS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS

Al principio de este capítulo dijimos que la PCD encontraba buenos ejemplos en los sistemas inmunitarios y nerviosos. Ya vimos en los capítulos sobre inmunología molecular I y II (*Arch. argent. pediatr* 1998; 96 [3 y 5]), que la extraordinaria diversidad de anticuerpos de receptores T que el SI fabrica al azar para quedarse sólo con aquellos que serán capaces de reconocer a todo organismo o sustancia exterior que penetre las barreras naturales son seleccionados a través de una cuidadosa y sistemática PCD de todos aquellos que no sean capaces de cumplir esas funciones. En efecto, vimos que durante la vida embrionaria los linfocitos que reconocen muy bien las propias estructuras de su embrión podrían ser peligrosos en una autorreacción y en consecuencia, mueren por apoptosis. Los que no reconocen nada de sus propias células (en este caso, el HLA) también mueren, porque mal podrían reconocer una célula infectada si ni siquiera reconocen algo propio. Sólo quedan pues los linfocitos naives. Esta selección negativa masiva deja viva una proporción minoritaria (linfocitos naives) que reúne las condiciones inversas a las antes señaladas, es decir, que no tienen alta afinidad por las moléculas de su propio organismo pero reconocen muy bien su propio HLA (esto se llama selección positiva). Los mecanismos de PCD continúan en la vida adulta y así hasta la muerte del individuo, tanto para los linfocitos T como para los B.

El sistema nervioso también es un hermoso ejemplo fisiológico de una historia de vida y de muerte. En efecto, la más compleja organización del cerebro humano (la mayor de la naturaleza), se origina en un diálogo que establecen sus células desde el embrión, donde las células nerviosas se

multiplican, se desplazan y establecen miles de conexiones (sinapsis) entre ellas y con otras células, como las musculares. Así, cada vez que establecen un contacto con otras células reciben de éstas mensajes de sobrevivencia o de muerte según esta sea la unión más adecuada o no. De esta manera, muere una neurona de cada dos y quedan constituidos los miles de circuitos útiles en todo el sistema nervioso. Los circuitos poco rendidores son transitorios y mueren por PCD.

Como ya dijimos, el sistema inmunitario y el sistema nervioso son los que llegan a crear nuevos genes para nuevas proteínas (los anticuerpos y los TCR) que no traen en el genoma de origen de las células germinales, el primero o haciendo interconexiones a la base de la memoria, de la inteligencia, de la conciencia del cerebro humano, no programado en el genoma original, el segundo. Esa plasticidad a nivel molecular, en última instancia, es una escultura permanente y desde el embrión hasta la muerte de un individuo adulto estos dos sistemas tienen sus células destinadas a replicarse, a quedar quiecentes o a morir por apoptosis. Si bien los linfocitos se replican muy fácilmente, era hasta ahora casi un dogma admitido que la neurogénesis neuronal no existía en la vida adulta (salvo en las neuronas receptoras olfativas). Hoy se sabe (después de demostrarse en las aves y ciertos roedores) que la replicación neuronal existe al menos en ciertas regiones del hipotálamo humano. No sólo las neuronas viven mucho tiempo y tienen constitutivamente las proteínas pro y antiapoptóticas en un equilibrio permanente, sino que también se replican. En los capítulos de neurología molecular veremos esto con más detalles.

### Apoptosis y patología

Como en la mayoría de los procesos patológicos donde se van conociendo los primeros mecanismos moleculares, la regla de un disfuncionamiento (en este caso la PCD) ocurre cuando un proceso está hiperactivado o excesivamente inhibido. Por ejemplo, una molécula ligante o receptora mutada o directamente ausente puede trabajar en más o en menos volcando una cascada de moléculas hacia una activación o inhibición, en este caso, de la PCD.

Día a día la lista se alarga y el rol de la PCD está bien demostrado en muchas enfermedades que señalamos a continuación:

- a) cuando la PCD está hiperactivada: enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral

amiotrófica, la enfermedad de Parkinson; enfermedades inmunitarias e infecciosas: diabetes, tiroiditis de Hashimoto, SIDA, hepatitis virales; en déficits circulatorios e hipóxicos como el accidente cerebrovascular (ACV), infarto de miocardio, sufrimiento fetal.

- b) cuando la PCD está inhibida o bloqueada: en los tumores como linfomas, astrocitomas, hepatomas, melanomas y otros.

Estos ejemplos son más evidentes que los experimentales y constataciones clínicas lo han establecido bien. Por ejemplo, en los accidentes cerebrovasculares y en el sufrimiento fetal o en los recién nacidos de bajo peso (menos de 1.500 g), quienes pueden desarrollar alguna forma de isquemia y daño neuronal debido a la inmadurez de sus pulmones y cerebro, la PCD juega un rol mayor. Si bien en esas lesiones, especialmente en el ACV, la fenotipia celular no es exactamente la que describimos en la apoptosis y la necrosis (*Gráfico 2*) sino que estaría entre ambas, las moléculas que participan son las que hemos señalado para la PCD. La esperanza de revertir esas patologías con inhibidores de las caspasas se está investigando.

En el infarto de miocardio, confirmando resultados en animales, durante la isquemia coronaria y la reperfusión, la producción intracelular de radicales libres (ROS) que como vimos son inductores de necrosis y de PCD, es la responsable de las lesiones clásicas de necrosis en el centro de la lesión más anóxica y de apoptosis en la periferia de la misma.

En lo que concierne al rol de la PCD en las enfermedades infecciosas, ya mencionamos que los linfocitos Tc destruyen por PCD una célula infectada por un virus, una célula transformada por un proceso oncogénico o células xenogénicas (en los trasplantes, por ejemplo) y utilizan dos grandes vías para producir la PCD. La del sistema perforina/granzimas y la del DR Fas/FasL (*Gráfico 3*). La primera significa que la célula atacada produce perforina, con formación de microporos, por los que entran las granzimas que inducen la activación de las caspasas, en especial la caspasa 3. La segunda vía fue vista en detalle, pero sólo recordaremos que la interacción de Fas con su FasL expresado por las células Tc y las NK (natural killers) está hiperactivada en el SIDA y en las hepatitis virales, principalmente en las formas fulminantes. Se sabe, en efecto, que los virus hepáticos en general son poco citolíticos y que las lesiones son producidas por los mecanismos apoptóticos aportados por el SI, tanto el IEA (el Tc),



como el INNE (el NK). También se están desarrollando inhibidores farmacológicos de cualquiera de estos sistemas y en distintos puntos de la cascada apoptótica.

La PCD normalmente elimina las células que no hacen un correcto ciclo celular (CC) o tienen un grosero daño a nivel de su ADN (*Arch. argent. pediatr.* 1997; 95 [5]). El descubrimiento de la función antiapoptótica de la proteína Bcl-2 (ahora considerado un oncogene) dio origen a dos conceptos: uno que la vía de la PCD es regulada genéticamente por genes independientes de los que regulan el CC, aunque se interrelacionan; el otro es que los niveles de las proteínas antiapoptóticas mutados y/o aumentados son un paso mayor en el proceso de la transformación celular. En efecto, el efecto oncogénico de la Bcl-2, debido a una translocación de este gen, hace que la proteína anómala tenga mayor actividad en la mayoría de los linfomas foliculares, en algunos casos de linfomas difusos y en leucemias linfocíticas crónicas. El gen de Bcl-2, como cualquier otro, también puede mutar y tener una actividad mayor, menor o nula. En el caso de la proteína Bcl-2, es mayor. Es así que aumenta su actividad antiapoptótica, haciendo salir la célula del CC, donde ésta debía ser reparada o enviada al suicidio y favoreciendo la supervivencia de una célula mutada. La progenie de esa célula llevará la misma anomalía y en ese sentido esas células son monoclonales.

Los miembros de la SF Bax podrían actuar como genes antioncogénicos o supresores de tumores en la célula normal, puesto que cuando están mutados trabajan menos o no tienen ninguna función y, por lo tanto, al no cumplir con su función proapoptótica, la célula que debería morir por PCD, no muere y sigue con su ADN anormal (translocado, mutado, truncado, mal replicado) y genera una progenie con iguales anomalías y otras más que se van agregando. La proteína P53 en muchos casos usa la proteína Bax como efectora para destruir la célula anómala (veremos todo esto en los capítulos de oncología molecular con más detalles); este fenómeno se observa en los humanos en una gran parte de los cánceres de

estómago y en algunas leucemias.

Finalmente, debemos señalar que no sólo quedan por descubrir anomalías en las proteínas que actúan en los momentos finales de la cascada apoptótica sino en las que participan desde el inicio. Por ejemplo, algunas mutaciones detectadas en el DR Fas y en su FasL, en un síndrome que se caracteriza por acumulación de células linfocíticas, con masivo crecimiento de los ganglios y una reactividad autoinmune mortal. Cuando esas mismas moléculas están expresadas en cantidad, como en algunos tumores que expresan FasL, suprimen la inmunovigilancia al eliminar los linfocitos Tc por apoptosis al contactar las moléculas de FAS que éstos portan sobre sus membranas.

## CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

El descubrimiento de la PCD y la continua expansión de nuevos conocimientos de sus mecanismos en todos los reinos vivos, hace de la apoptosis un sujeto fascinante de investigación biológica universal. Saber que el mecanismo de la PCD está constantemente en equilibrio sutil con los mecanismos de la supervivencia, nos hizo comprender también que la vida y la muerte mantienen, desde los organismos unicelulares a los pluricelulares, un diálogo y una relación tan fantástica como compleja a través de los productos de los genes que traemos desde los orígenes de la vida.

Pudimos volar, viajar bajo el agua, vencer a la gravedad terrestre cuando comprendimos las leyes que las controlaban, y así salir de nuestra "frontera oxigenada". Es muy probable que comprendamos mejor desde la fecundación del óvulo hasta la longevidad de nuestras células, así como el precio que pagamos con las enfermedades propias de los organismos multicelulares más complejos, si entendemos el equilibrio y las alteraciones de esos extraordinarios engranajes de la vida y la muerte. De esta manera, en vez de resistir a la muerte empezamos a comprender cómo funciona. Muchas terapéuticas futuras dependen de estos conocimientos.



## GLOSARIO

**Filamentos intermediarios:** La trama de filamentos proteicos que poseen todas las células de los metazoarios constituye el citoesqueleto. El análisis morfológico de estos filamentos mostró que están constituidos por tres estructuras elementales que difieren por su diámetro: los microtúbulos (los más grandes, de más de 20 micrones), los microfilamentos (de menos de 10 micrones) y los filamentos intermediarios (entre 10 y 15 micrones). Estos últimos se llaman así por tener un tamaño intermedio entre los otros dos. Las proteínas fibrosas que se polimerizan para constituir un filamento intermediario son muy diversas, pero con rasgos comunes en su estructura. Se pueden distinguir 6 tipos diferentes de proteínas de estos filamentos: I) queratinas ácidas, en las células epiteliales; II) queratinas básicas neutras, en las células de la epidermis; III) la vimentina, en las células de origen mesodérmico; la desmina, en las células musculares; la GFA (por proteína ácido glio-fibrillare) en los astrocitos y la periferina en ciertas neuronas; IV) las proteínas de los neurofilamentos en las neuronas; la a internexina en las neuronas y la nestina en las células musculares y nerviosas; V) las láminas A, B y C en los núcleos de todas las células; VI) otros filamentos intermediarios no clasificados: la filesina en el cristalino; la fakina en el cristalino y la tanabina en los conos de crecimiento de las neuronas.

**CAD:** (por caspase-activada deoxyribonucleasa) es una nucleasa que fragmenta el ADN celular en la PCD. En las células no apoptóticas está constitutivamente ligada a una proteína inhibidora de su acción, la Icad/DFF45 (por inhibidor CAD, o por ADN fragmentation factor).

**FAK:** por focal adhesion kinase.

**Gelsolina:** Es una proteína que se adhiere a los extremos (como un "sombbrero") de las subunidades de los microfilamentos de actina, impidiendo la asociación entre éstas para constituir los filamentos de actina. Las proteínas de la familia de la gelsolina se ligan por medio de los iones Ca a los fragmentos y subunidades de la actina y por otro, a los fosfoinositósidos (los fosfolípidos que constituyen las dobles membranas celulares). Los fosfoinositósidos actúan de dos formas sobre la gelsolina: la liberan del

extremo de la actina e inhiben su capacidad de mantenerla fragmentada. Cuando veamos el citoesqueleto y el desplazamiento celular hablaremos más detalladamente de este tema.

**Death receptor 1 (DRs):** Receptores de la muerte (con sus sinónimos) y sus moléculas:

DR	Sinónimos
CD 95:	Fas; Apo 1
TNFR:	p 55; CD 120a
DR 3:	Apo 3; WSL-1; TRAMP; LARD
DR 4:	-
DR 5:	Apo 2; TRAIL-R2; TRICK 2; KILLER
CAR 1:	Es un DR en células de aves

Otras moléculas que poseen dominios de la muerte (DD) son:

NGFR: (New growth factor receptor p 75), su ligante es el NGF, BDNF, NT-3 o NI 4/5.

TRANCER: su ligante es el TRANCE.

CD 27: su ligante es el CD 70.

CD 134/0 x 40: su ligante no se conoce.

CD 137/4-TBB: su ligante no se conoce.

CD 40: su ligante es el CD 154.

MAPK: (mitogen-activated protein kinase).

ERK: (extracellular signal regulated kinase).

JUN: (jun N-terminal kinase).

SAPK: (stress-activated protein kinase).

MEK1 y MEK2: (MAPK / ERK kinase) o MEKK1 o MEKK2 o MAPKK.

JNKK: (JNK kinase).

MAPK/APK: (MAPK activated protein kinase).

### Las caspasas:

Familia Caspasa	Origen Source	Sinónimos	Función
Caspasa 1	Mamíferos	ICE	Inflamación
Caspasa 2	Mamíferos	ICH-1, NEDD2	Apoptosis iniciadora/efector
Caspasa 3	Mamíferos	Apopain, Cpp32 Yama	Efector
Caspasa 4	Mamíferos	TX, ICH-2 ICEreLII	Efector/iniciadora?
Caspasa 5	Mamíferos	ICEreLIII, TY	Efector/iniciadora?
Caspasa 6	Mamíferos	Mch2	Efector
Caspasa 7	Mamíferos	Mch3 ICE-LAP3	Efector
Caspasa 8	Mamíferos	CMH-1 MACH, FLICE, Mch5	Iniciadora
Caspasa 9	Mamíferos	ICE-LAP6, Mch6	Iniciadora
Caspasa 10	Mamíferos	Mch4	Iniciadora?
Caspasa 11	Mamíferos (sólo ratón)		Inflamación?
Caspasa 12	Mamíferos (sólo ratón)		Inflamación?
Caspasa 13	Mamíferos	ERICE	Efector?

Moléculas sobre las que actúan:

- en el citoplasma;
- en el núcleo.

a. Ejemplos de moléculas sustratos de las caspasas en el citoplasma

Citoplasma blanco	Función	Secuencia de corte
Bcl-2	Homeostasis	-
Gelsolina	Estructural	-
Pre-caspasas	Apoptosis iniciadora/efectora	
Growth arrest Gen 2 (Gas-2)	Estructural	SRVD-G
Fodrina	Estructural	-
G-actina	Estructural	LVVD-N,
ELVD-G		
Inhibidor D4 de la disociación de GDP (D4-GDI)	Homeostasis	DELD-S
Quinasa 2 activada por P21 (PAK2)	Estructural	-
Quinasa de adhesión focal (FAK)	Estructural	-

b. Ejemplos de moléculas sustratos de las caspasas en el núcleo

Núcleo blanco	Función	Secuencia de corte
Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP)	Homeostasis	DEV D-G
Pequeña ribonucleo-proteína U1 de 70 kDa (U1-70kDa)	Homeostasis	DGPD-G
Proteínquinasa dependiente del ADN (DNA-PKcs)	Homeostasis	DEV D-N
Proteína 1,2 de unión del elemento regulador del esteroil (SREBP1,2)	Homeostasis	DEPD-S
Factor de fragmentación del ADN (DFF-45)	Homeostasis	-
PKC-	Homeostasis	DMQD-N
PKC-	Homeostasis	-
Lámina	Estructural	VEID-N
Inhibidor de desoxirribonucleasa activado por caspasa (Icad)	Homeostasis	-
Proteína del aparato mitótico nuclear (NuMa)	Estructural	-
Rb	Homeostasis	-
Map/ER quinasa	Homeostasis	-
kinasa 1 (MEKK1)	Homeostasis	-
Proteínquinasa relacionada con P34Cdc2 (PITSLRE)	Homeostasis	-
Factor C de replicación	Homeostasis	-
Doble minuto murino 2 (MDM-2)	Homeostasis	-

## La superfamilia Bcl-2

Nombre	Origen	Efectos en Dominio apoptosis conservado
<i>Subfamilia Bcl-2</i>		
Bcl-2	Mamífero	Inhibidor BH4, BH3, BH1, BH2, TM
Bcl-xl	Mamífero	Inhibidor BH4, BH3, BH1, BH2, TM
Bcl-W	Mamífero	Inhibidor BH4, BH3, BH1, BH2, TM
Mcl-1		Inhibidor BH3, BH1, BH2, TM
A1		Inhibidor BH1, BH2
NR-13	Pollo	BH3, BH1, BH2, TM
CED-9	<i>C. elegans</i>	Inhibidor BH4, BH1, BH2
E1B 19k	Viral	Inhibidor BH1
BHRF1	Viral	Inhibidor BH1, BH2, TM
KSHV ORF 16	Viral	Inhibidor BH1, BH2, TM
LMW5-HL	Viral	Inhibidor BH1, BH2
KS-Bcl-2	Viral	Inhibidor BH1, BH2, TM
Bcl-x <sub>s</sub>	Mamífero	Promotor BH4, BH3, TM
<i>Subfamilia Bax</i>		
Bax	Mamífero	Promotor BH3, BH1, BH2, TM
Bak	Mamífero	Promotor BH3, BH1, BH2, TM
Bak	Mamífero	Promotor BH3, BH1, BH2, TM
<i>Subfamilia BH3</i>		
Bad	Mamífero	Promotor BH3
Bik	Mamífero	Promotor BH3, TM
Bid	Mamífero	Promotor BH3
Blk	Mamífero	Promotor BH3, TM
Hrk	Mamífero	Promotor BH3, TM
BNIP3	Mamífero	Promotor BH3, TM
BimL	Mamífero	Promotor BH3, TM
EGL-1	<i>C. elegans</i>	Promotor BH3

## Inhibidores celulares de apoptosis

Familia IAP	Origen	Dominio formado
IAP	Baculovirus	BIR, RING finger
DIAP1	Drosophila	BIR(2), RING finger
DIAP2	Drosophila	BIR(3), RING finger
	c-IAP1	Human BIR(3),
RING finger		
c-IAP2	Human	BIR(3), RING finger
X-IAP	Human	BIR(3), RING finger
NIAP	Human	BIR(3), RING finger
Survivin	Human	BIR(2)

IAP: inhibidor de apoptosis

DIAP: *Drosophila* IAP

- neuronal IAP

BIR: *Baculovirus* IAP dominio repetido

## Inhibidores virales de apoptosis

Virus	Proteínas virales	Función
Adenovirus	E1B 19K	Bcl-2 homólogo
EBV	BHRF1	Bcl-2 homólogo
ASFV	LMW5-HL	Bcl-2 homólogo
HHV-8	?	Bcl-2 homólogo
Adenovirus	E1B55K	Inactiva la p53
SV40	Antígeno T grande	Inactiva la p53
HPV	E6	Inactiva la p53
Cowpox virus	crmA	Inhibidor de caspasa 1
<i>Baculovirus</i>	p35	Inhibidor de caspasa 1
<i>Baculovirus</i>	lap	Inhibidor de caspasa 1
		Se liga a TRAFs
EBV	LMP1	Induce Bcl-2
		Se liga a TRAFs

**BIBLIOGRAFIA**

- Ashkenazi A, Dixit M. Death receptor 1: signalization and modulation. Science 1998;281:1305-1308.
- Jacobson M, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. Cell 1997;88:347-354.
- Brenner C, Marzo I, Zamzami N et al. Cooperation mortuose entre la proteine pro-apoptotique Bax et le translocateur à adenine nucleotide pour le controle mitochondrial de l'apoptose. Medicine/Sciences 1998; 14:1399-1401.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. Science 1998;281:2027-2031.
- De Duve C. Poussière de vie. Une histoire du vivant. Paris: Fayard, 1996.
- Ameisen NC. The origin of programmed cell death. Science 1996;272:1278-1279.
- Susin S, Lorenzo H, Zamzami N et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999;397:441-446.
- Gray M. Mitochondrial evolution. Science 1999;283:1476-1481.

*Los más grandes adelantos útiles para la medicina, son la consecuencia de investigaciones desinteresadas que no tenían en vista posibles aplicaciones. La preocupación excesiva por lo aplicado acorta la visión y disminuye la fertilidad y el alcance de las investigaciones y los conocimientos. No hay en realidad ciencias puras y ciencias aplicadas, sino ciencias y aplicaciones de las ciencias; estas aplicaciones son inmediatas o llegan más tarde.*

BERNARDO A. HOUSSAY y col.  
*Fisiología Humana*, Bs. As., El Ateneo, 1964.