



EDITORIAL

La apoptosis: un tema de interés para el laboratorio clínico



Apoptosis: a topic of interest for the clinical laboratory

El término «apoptosis» se estableció en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie y define un tipo de muerte celular específico que también se ha llamado «muerte celular programada». La apoptosis se diferencia de la necrosis, que es otro tipo de muerte celular, en que no se produce la activación de células inflamatorias. Por el contrario, la necrosis se debe a procesos violentos sin necesidad de ATP y que dan lugar a procesos osmóticos desmesurados que además conducen a las células vecinas a la muerte por atracción de células inflamatorias. El resultado es una afectación del tejido donde se produce¹⁻⁹.

Pero dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis, fase de control celular G1, síntesis de ADN y fase de control G2. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese en la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la réplica del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.

La apoptosis puede aparecer tanto en procesos fisiológicos como en procesos patológicos. Entre los fisiológicos tenemos: la morfogénesis de los dedos durante el desarrollo embrionario, el refinamiento de la inervación neuronal y la selección de los linfocitos que no responden contra el propio organismo. Pero también en procesos patológicos, como son: las arritmias paroxísticas en el nodo AV, la disminución de las células colinérgicas producida en el Alzheimer, la disminución de las células dopaminérgicas en el Parkinson, la disminución de las motoneuronas en la esclerosis lateral amiotrófica, las células infectadas por virus, las células con el ADN lesionado, las células cancerosas, etc.^{5,10-15}.

La apoptosis produce una serie de cambios en la morfología celular que llevan a la muerte^{4-6,16-18}:

- Aumento de la densidad intracelular. El retículo endoplásmico forma vesículas y se fusiona con la membrana celular expulsando su contenido al exterior.

- Disminución del volumen celular mientras que la densidad aumenta debido a la formación de gránulos.
- Se mantienen los orgánulos citoplasmáticos de una forma compacta.
- Aumento de la concentración de calcio libre citoplasmática.
- Cambios en la membrana celular. La fosfatidil serina se expresa en el exterior de la célula transformándose en señal de reconocimiento para los fagocitos. Se evita la inflamación al no existir vertido del contenido celular ya que los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados y degradados.
- Cambios en el citoesqueleto.
- Aumento en la síntesis de proteínas necesarias para las rutas metabólicas de la muerte celular.
- Condensación de la cromatina y fragmentación en oligonucleosomas (cariorexis).

El conjunto de estos cambios da como resultado la destrucción de las células de forma silenciosa, por lo que se puede desarrollar de forma fisiológica sin producir alteraciones en las funciones del organismo, siempre y cuando esté programada de una forma adecuada y no se deba a defectos del equilibrio entre la inhibición y la activación del proceso¹⁹⁻²².

Las técnicas de detección de los cambios morfológicos son:

- Visualización de la cromatina mediante fluorocromos que se intercalan en el ADN: etidio, propidio, etc.
- Estudio de la cromatina por microscopía electrónica.
- Análisis del genoma por electroforesis de ADN.
- Detección de los extremos del ADN hidrolizados mediante la tinción TUNEL (derivada de uridina).

En la apoptosis se pueden distinguir 3 fases:

- *I. Fase de activación.* Puede darse tanto por una inducción negativa (debida a una pérdida de actividad supresora, falta de factores de crecimiento, disminución del contacto con las células vecinas) como por inducción positiva (unión ligando-receptor, señales internas).

Dentro de la inducción positiva hay 2 rutas:

- Vía intrínseca o mitocondrial: comienza con la activación, por parte de p53, de la proteína proapoptótica Bax que se asocia con el poro mitocondrial de permeabilidad transitoria formado por el transportador de adenin nucleótido, el canal aniónico mitocondrial dependiente de voltaje y la ciclofilina D. Con esto se produce una salida de los factores apoptóticos.
- Vía extrínseca mediada por receptor: Estos receptores tienen 2 dominios: uno, extracelular rico en cisteína y otro, intracelular responsable de la activación de segundos mensajeros encargados de producir la cascada que desembocará en la apoptosis. Existen 3 tipos de receptores de muerte:
 - El receptor para el TNF que al trimerizarse y agrupar los dominios de muerte permite la unión de TRADD o dominio de muerte asociado a TNFR el cual recluta moléculas de señalización y activa factores de transcripción (NFKB y el JNK/AP-1). También puede asociarse con FADD (factor asociado al dominio de muerte) y activar la procaspasa-8.
 - El receptor Fas (Apo-1 o CD95) que al trimerizarse permite que el dominio efector de muerte del FADD actúe activando las caspasas 8 y 10. Pero también puede unirse a DaXX activando proteínquinas y estimulando la mitosis y el ciclo celular. De esta forma la vía está inactivada hasta que se une el receptor al ligando Fas.
 - Por último los receptores que desempeñan una función fisiológica cuya sobreactivación produce la apoptosis como los receptores del glutamato.

II. Fase de propagación. En esta fase los segundos mensajeros se encargan de propagar la señal para que tenga lugar la apoptosis. Estos son:

1. Calcio: incrementos aberrantes en la concentración pueden provocar la activación de enzimas que producen radicales libres.
2. Ceramida: aparece en la porción interna de la membrana mitocondrial pero su translocación provoca un descenso en el potencial transmembrana y la formación de un poro de permeabilidad transitoria.
3. p53: es un factor de transcripción activado en respuesta al daño en el ADN que utiliza la célula en fase G1 para reparar el ADN. Si la célula no puede reparar el daño genético induce la muerte celular. El resultado de una función anormal de este gen puede ser el desarrollo de una neoplasia maligna (más del 50% de los tumores humanos están asociados a mutaciones del gen p53).
4. Bcl-2: es una familia de oncogenes dividida en 2 tipos de proteínas, las de supervivencia celular (Bcl-X, Bcl-W y Bcl-2) y las que ayudan al suicidio celular (Bid, Bad, Bax). Forman dímeros siendo su abundancia relativa la que determina la activación de la muerte celular.

5. c myc: es un protooncogen cuya sobreexpresión desencadena el estímulo apoptótico según la disponibilidad de otros factores de crecimiento celular.

Cuando se altera la permeabilidad de la mitocondria por la formación de un poro de permeabilidad transitoria (ceramida) se liberan de su interior:

1. Citocromo C cuyo objetivo citosólico es el Apaf-1 con el que se une y favorece a su vez la unión de dATP. Esto abre la molécula de Apaf-1 que polimerizará al mismo tiempo que se recluta la procaspasa-9 por el motivo CARD del N Terminal de Apaf-1. Mediante una proteólisis autocatalítica se activará la procaspasa-9.
2. Factor inductor de la apoptosis: se localiza en el espacio intermembranal y cuando sale de la mitocondria se dirige al núcleo donde se une al ADN y desencadena su destrucción.
3. Smac/diablo: bloquea las proteínas inactivadoras de la apoptosis.
4. Caspasas.

III. Fase de ejecución. Es una fase de proteólisis irreversible debida a^{19-21,23}:

1. Caspasas: son unas cisteinproteasas de tres tipos: producción de citocinas (caspasas 1, 4, 5, 13); señalización o activación de otras caspasas (caspasas 2, 8, 9, 10); efectoras de muerte (caspasas 3, 6, 7). Algunos de sus sustratos son: elementos del citoesqueleto (actina, fodrina, proteína Tau, catenina); enzimas de reparación (PARP) o degradación (ADNasa) de ADN; factores de transcripción (retinoblastoma, HDM2); proteínas reguladoras (proteína cinasa c, fosfatasa 2.^a, cinasas de adhesión focal); Bid.
2. Calpains: son cisteina proteasa que requieren Ca²⁺ para su translocación, autólisis y activación.
3. Granzima B.
4. Proteosoma.

Uno de los efectos de esta proteólisis es la degradación del ADN por parte de la CAD, una ADNasa activada por caspasas. En su síntesis se le une ICAD permitiendo así su correcto plegamiento. Este complejo permanece de forma que se inhibe la actividad ADNasa y se enmascara la señal de localización nuclear. Tras un impulso apoptótico las caspasas romperán este complejo y se pondrá de manifiesto la actividad ADNasa.

Durante la apoptosis se puede observar la condensación de la cromatina debido a que la caspasa-6 degrada las láminas, unas proteínas intracelulares que mantienen la forma del núcleo y producen interacciones entre la cromatina y la membrana nuclear^{5,22}.

La procaspasa contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad grande y otra pequeña. La procaspasa es inactiva y una vez que sufre dos roturas proteolíticas se separan las tres subunidades. La subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero por unión de sus sitios activos. La unión de dos heterodímeros se verifica en dirección opuesta con dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las subunidades grandes^{19,20,23}.

La gran cantidad de estudios que se han realizando en relación a la apoptosis se deben a que el conocimiento de esta ruta de suicidio de la célula posee un gran potencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, como por ejemplo, la interrupción de la progresión de los procesos de muerte celular por fármacos inhibidores de la síntesis de proteínas, fármacos que bloqueen los incrementos descontrolados de la concentración de Ca^{2+} , fármacos antioxidantes, fármacos moduladores de la transcripción y fármacos tetrapéptidos inhibidores de las caspasas, entre otros^{8,10,14,16,17}.

En relación con la activación de la muerte celular en el cáncer, hoy es conocido el importante papel del Apo2L (o TRAIL) como enlazante para los subtipos de receptores de TNF implicados en la apoptosis. Su diferente afinidad por los subtipos de receptores y por la expresión diferencial de receptores de muerte y señuelo hacen de él un inductor de apoptosis en células tumorales pero no en las normales.

Hace unos años, y debido a la importancia que representa, se constituyó la Red Española de Apoptosis, (<http://apored.bq.uam.es/>) y el Grupo de Apoptosis de la Sociedad Española de Bioquímica y Bioquímica Molecular (<http://sebbm.bq.ub.es/soc/grups.htm>), que tratan de integrar y fusionar todos los eventos relacionados con este área de conocimiento, coordinar la investigación sobre la misma y promover su utilización en clínica.

En la actualidad, solo las determinaciones de TNF-alfa y Bcl-2 son objeto de petición por los clínicos al laboratorio pero se espera que un conocimiento creciente sobre el tema dispere, en los próximos años, la demanda analítica de otras familias de proteínas y sus genes codificadores.

Bibliografía

- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. *Science*. 1998;281:1305-8.
- Bamji SX, Majdan M, Pozniak D, Belliveau DJ, Aloyz R, Khon J, et al. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J Cell Biol*. 1998;140:911-23.
- Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395-419.
- Cascales M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Nac Farm*. 2003;69:27-46.
- De la Rosa EJ, Díaz B, Sánchez N. Muerte celular programada: Un proceso clave en fisiología y patología. *Ciencia al Día Internacional*. 2003;3:1-19 <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero3/articulos/articulo5.html>
- Deigner HP, Kinscherf R. Modulating apoptosis: current applications and prospects for future drug development. *Curr Med Chem*. 1999;6:399-414.
- Diez J. Apoptosis en enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol*. 2000;53:267-74.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998;281:1309-12.
- Huang Z. Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene*. 2000;19:6627-31.
- Jordán J, Galindo MF, Ceña V, González-García C. Cisteína proteasas y neurodegeneración. *Rev Neurol*. 2000;3:333-40.
- Kulik G, Weber MJ. Akt-dependent and -independent survival signalling pathways utilised by insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol*. 1998;18:6711-8.
- Lockshin RA, Osborne B, Zakeri Z. Cell death in the third millennium. *Cell Death Diff*. 2000;7:2-7.
- Núñez G, del Peso L. Linking extracellular survival signals and the apoptotic machinery. *Curr Opin Neurobiol*. 1998;8:613-8.
- Paredes F, Roca JJ. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *OFFARM*. 2002;21:96-100.
- Pettmann B, Henderson CE. Neuronal cell death. *Neuron*. 1998;20:633-47.
- Raff MC. Cell suicide for beginners. *Nature*. 1998;396:119-22.
- Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1:111-21.
- Stambolic V, Mak TW, Woodgett JR. Modulation of cellular apoptotic potential: contribution to oncogenesis. *Oncogene*. 1998;18:6094-103.
- Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of caspases. *Biochem et Biophys Acta*. 1998;1387:17-31.
- Tanaka M, Sawada M, Miura M, Marunouchi T. Insulin-like growth factor-I analogue prevents apoptosis mediated through an interleukin-1 beta converting enzyme (caspase-1)-like protease of cerebellar external granular layer neurons: developmental stage-specific mechanisms of neuronal cell death. *Neuroscience*. 1998;84:89-100.
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 2002;31:214-23.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 1997;90:405-13. <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero3/articulos/articulo5.html>
- Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*. 1997;91:443-6.

Ángel San Miguel Hernández

Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid, España

Correo electrónico: asanmi@saludcastillayleon.es