

Apoptosis, muerte celular fisiológica, reseña histórica y actualidad Apoptosis, Physiological Cell Death, Historical Review and Current Status

María Beatriz Espinosa

Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA-CONICET)

Facultad de Agronomía (UBA - Buenos Aires, Argentina).

mepinosa@agro.uba.ar

Recibido 6/03/2014 – Aceptado 02/05/2014

Resumen

El concepto de muerte celular programada, descrito a mediados del siglo XX, se definió como "apoptosis" en 1972 y se diferenció de la necrosis. La primera o "Programmed Cell Death" (PCD) ocurre en un momento específico del desarrollo embrionario y también en los tejidos adultos. Los tejidos se remodelan mediante apoptosis bajo control genético sin dañar el tejido circundante. Tanto la mitosis (proliferación) como la apoptosis, durante la formación de los tejidos, están reguladas genéticamente. El significado fisiológico de la apoptosis es completamente distinto al de la necrosis. Mientras que la necrosis es accidental y las células lesionadas se remueven provocando inflamación, la apoptosis es una vía metabólica celular, regulada genéticamente. En este trabajo revisamos el progreso del conocimiento del tema durante los últimos 42 años.

Palabras Clave: Apoptosis, Embriología, Historia.

Abstract

The concept of Programmed Cell Death (PCD) has been used since 1951, and the idea of the physiological cell death and the term apoptosis was established in 1972. Apoptosis occurs in embryonic cells at specific times and it is crucial for the embryos development. The tissues are remodeled by cell death under genetic control and without damaging the surrounding tissues. If the normal mitosis/apoptosis rate is altered during tissue formation, birth defects may appear. The physiological meaning of PCD is different from necrosis. While necrosis is accidental and damaged cells are removed from the tissues using the inflammatory process, apoptosis is a metabolic pathway and has evolved in life organisms because it is necessary for morphogenesis and differentiation in specialized and complex tissues. In this work we review the understanding of apoptosis for the past 42 years.

Keywords: Apoptosis, Embryology, History.

La autora de este artículo es Investigadora Adjunta del CONICET y trabaja en los laboratorios del Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA-CONICET). Desde su lugar como científica propone publicar este artículo ya que el tema

(Apoptosis) ha tenido un crecimiento explosivo. Al consultar la base de datos (NCBI: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) se encuentran los siguientes números: resultados totales al usar "apoptosis" como palabra clave: aparecen 3.049.440 referencias de las cuales 268.247 corresponden a citas bibliográficas en Pubmed y de ellas 254.651 están escritas en inglés. En otros idiomas hay unas 13.202 referencias y en castellano sólo 394. Por otro lado y de acuerdo a la misma base de datos, desde el año 1972 hasta el año 1981 hay unas 53 citas bibliográficas, desde 1982 hasta 1991 aparecen 512 citas, entre 1993 y 2002 se encuentran 52.704 citas bibliográficas y luego entre el año 2002 y 2011 hay 160.949 referencias (las publicaciones que figuran en Pubmed son reconocidas internacionalmente).

De acuerdo a lo referido, el objetivo de publicar esta reseña, es el de facilitar el acceso en español a un tema que es de gran importancia y del cual día a día se siguen conociendo detalles y se publican numerosos artículos (en el primer cuatrimestre del año 2014 se citan unas 10.476 publicaciones).

Introducción

A partir de los años 80 y gracias al empleo de técnicas nuevas en biología molecular, fue posible el estudio de la estructura de las proteínas, la caracterización y secuenciación de los ácidos nucleicos y la comprensión del modo en que las biomoléculas interactúan en las células conduciendo sus procesos vitales. El desarrollo tecnológico permitió que se estudiara la apoptosis en profundidad y se han llegado a comprender aspectos esenciales de su fisiología molecular. Se sabe que es un proceso activo, con intervención de energía producida en la célula, por lo cual las mitocondrias son cruciales.

Durante las últimas 3 ó 4 décadas, el proceso de muerte celular programada se convirtió en uno de los temas más estudiados en ciencia. El primer ejemplo fue la publicación de un número de la Revista *Experientia* (1996 Vol.: 52/Nº 10/11) que se dedicó únicamente al tema de apoptosis. Se publicaron, en dicho número, varias revisiones escritas por diversos autores. Entre los años 2000 y 2005 se escribieron 14 artículos de revisión que se publicaron en la revista *Science*. Durante el año 2000, se publicaron 7 revisiones sobre apoptosis en un número de la Revista *Nature*. Finalmente, aparecieron cuatro artículos de revisión más en *Nature* antes del año 2005. Estos hechos editoriales reflejan el interés por dar impulso al tema que se produjo debido a la importancia de esta vía metabólica, la cual conduce a la muerte de las células en forma programada genéticamente. Las células cuyo mecanismo de proliferación y diferenciación está mal regulado genéticamente y su patrón de expresión génica está alterado, son células que crecen sin límites formando tumores. Actúan privando de nutrientes a las células normales e invaden tejidos y órganos impidiendo su funcionamiento.

La apoptosis es, al contrario, una vía metabólica que conduce a la muerte celular. El conocimiento de esta vía de muerte celular y su inducción controlada artificialmente se interpretó, desde un comienzo, como una promesa para el control de las células cancerígenas. En este sentido, los esfuerzos y recursos utilizados para estudiar las posibles

formas de manipulación de la vía apoptótica han sido cuantiosos.

Apoptosis

El concepto de Muerte Celular Programada (PCD, Programmed Cell Death) surgió a mediados del siglo XX. La muerte celular programada como proceso fisiológico fue observada por biólogos dedicados al estudio del desarrollo embrionario. En 1951, Glucksmann describió la PCD, cuando estudios histoquímicos de isquemia hepática proporcionaron las primeras evidencias directas de la existencia de dos tipos de muerte celular diferentes. En 1972 se estableció el concepto de muerte celular fisiológica y Kerr, Wyllie y Currie propusieron el término apoptosis.

Las células de los organismos multicelulares tienen un ciclo de vida más corto que el tejido al cual pertenecen. La muerte celular tendrá lugar por necrosis o por apoptosis que son dos mecanismos cuyo significado fisiológico es muy diferente. La muerte fisiológicamente programada ocurre en un momento definido durante el desarrollo y diferenciación de los tejidos del organismo (Ellis *et al.*, 1991). Si bien la vía apoptótica no es exclusiva de las células embrionarias, ha sido observada y descubierta por embriólogos, porque durante el desarrollo del embrión, la apoptosis es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis tisular. Un ejemplo entre los vertebrados son los primates, durante la embriogénesis desarrollan estructuras como las membranas interdigitales, que son comunes en los anfibios adultos. El tejido que forma las membranas interdigitales se pierde para formar los dedos. Los tejidos se remodelan y esta remodelación tiene lugar mediante la muerte de las células de forma programada genéticamente y sin ocasionar daño al tejido circundante. Al colocar un inductor de apoptosis (colchicina) en los miembros de las larvas de anfibios urodelos, se provoca el desarrollo de patas con una estructura morfológica semejante a la de los anuros (sapos). Los individuos desarrollan un patrón óseo en los miembros que corresponde a un grupo filogenéticamente muy distante. El efecto depende del grado y momento en que se provoca la perturbación (Alberch & Gale, 1983).

La PCD y la necrosis son dos mecanismos cuyo resultado es la muerte celular, pero el significado fisiológico es distinto. La necrosis es accidental, las células se mueren a causa de una injuria severa de forma pasiva y se produce inflamación para remover las células muertas y el tejido dañado.

La muerte celular programada y sus vías metabólicas han evolucionado y se han conservado en organismos multicelulares cuyo desarrollo involucra la diferenciación de tejidos especializados y complejos.

Los cambios característicos de las células apoptóticas.

Las células apoptóticas muestran cambios morfológicos distintivos. El primero es la degradación del ADN genómico por acción de las endonucleasas nucleares (enzimas dependientes de calcio y magnesio). El ADN se corta en sitios localizados entre los nucleosomas y, de ese modo, se generan fragmentos de tamaños múltiplos de 180

pares de bases. La degradación de la cromatina en fragmentos discretos, provocada por endonucleasas, se observó por primera vez en células apoptóticas del timo de ratas (Wyllie, 1980; Arends *et al.*, 1990). Otros cambios importantes en las células apoptóticas son la modificación de la permeabilidad de la membrana celular, la condensación de las membranas sin pérdida de la integridad, la agregación de la cromatina que se observa pegada a la membrana nuclear. Finalmente, se produce la formación de vesículas o "cuerpos apoptóticos" que ocurre porque las organelas no se desintegran y los cuerpos apoptóticos son fagocitados sin producir respuesta inflamatoria y sin daños a los tejidos circundantes.

Regulación Genética de la Apoptosis

La muerte celular programada está regulada genéticamente. En su regulación intervienen diversos estímulos y vías metabólicas que conducen a la muerte de las células sin perjuicio para los tejidos circundantes. El mecanismo es activo y requiere energía que es provista por las mitocondrias en forma de ATP. Intervienen factores genéticos, muchos de los cuales están muy estudiados y se conocen muy bien.

Se conocen tres grupos de factores muy relevantes en la vía metabólica apoptótica: la familia génica *BCL2*, el gen supresor de tumores *p53* y las proteasas específicas denominadas caspasas. Estos factores, que intervienen en la regulación genética de la apoptosis, se han conservado a través de la evolución biológica. Los genes y proteínas que forman parte de la vía metabólica apoptótica, son similares en casi todos los organismos y muchos son compartidos entre células vegetales y animales (Korthout *et al.*, 2002, Collazo *et al.*, 2006).

La familia BCL2.

BCL2 es una familia multigénica de reguladores de muerte celular y codifica una proteína que se localiza en la membrana mitocondrial. Se sabe que bloquea la apoptosis en muchas células como los linfocitos y se ha propuesto que una traslocación de *BCL2* a la cadena pesada de la inmunoglobulina es la causa del linfoma folicular. Se describieron dos variantes de transcripción producidos por "splicing" alternativo que difieren en sus extremos C-terminales. Se cree que la expresión desregulada de *BCL2* contribuye a la neoplasia mediante la supresión de apoptosis (estudiado en ratones transgénicos). *BCL2* también se expresa en forma normal e inhibe la inducción de apoptosis en algunos sistemas experimentales sin transgénesis. El grupo de genes relacionados a *BCL2* incluye miembros que aumentan la tasa de apoptosis como *BCL-Xs* y *BAX* y también otros miembros que inhiben apoptosis como *BCL2*. *BAX* es una proteína pro-apoptótica y *BCL-2* una proteína que se vincula con supervivencia.

La familia de *BCL2*, involucrada en la regulación de apoptosis, se estudia desde la década de 1990. Se sugirió que *BCL2* podría interferir con la señalización celular involucrada con la inducción de este proceso. En las células de la granulosa, por ejemplo, se observan aumentos en los niveles de ARN mensajero que codifica *BAX* (promotora de muerte celular) que se correlacionan con apoptosis tanto "in vitro" como "in vivo" mientras que el nivel

de ARN mensajero para BCL2 y BCL-x no se modifica. La variación en el nivel de BAX es importante en la regulación de la apoptosis. La proteína BAX es abundante en células de la granulosa periantral en folículos con evidencias morfológicas de degeneración. En folículos antrales saludables o atrésicos se observa muy poca proteína BAX. Durante el proceso de atresia folicular, el rol de la familia de genes *BCL2* es fundamental porque la atresia folicular se produce por apoptosis (Boumela *et al.*, 2011).

El funcionamiento de los miembros de la familia *BCL2* es uno de los más complejos. Se acepta que está vinculada a la liberación de factores pro-apoptóticos desde la mitocondria pero muchos de los aspectos del funcionamiento de esta familia génica están siendo revisados (Häcker & Borner, 2011).

El gen supresor de tumores p53

Durante los últimos cinco años, se han publicado casi 7000 artículos de revisión sólo sobre la función génica de *p53*. *P53* codifica una proteína que activa la transcripción mediante su unión al ADN y se la considera supresora de tumores. El gen *p53* está relacionado con la apoptosis y su rol es fundamental en la protección de las células al daño del ADN. La activación de esta proteína produce que el crecimiento celular se detenga en la fase G1 del ciclo celular o que se muera por apoptosis. El gen *p53* es conocido por estar activo durante la proliferación celular. La proteína P53 se trasloca al núcleo cuando hay daño en el ADN. Durante mucho tiempo se creyó que el único rol de p53 era bloquear la progresión del ciclo celular en G1 a la fase S permitiéndole a la célula reparar el daño en el ADN antes de la iniciación de una nueva etapa de síntesis y antes de reasumir la mitosis. Pero también *p53* induce apoptosis en las células cuyo ADN es irreparable e induce la transcripción del gen *BAX* y reprime la transcripción del gen *BCL2*. Posiblemente actúa como factor regulador favoreciendo a BAX y por consecuencia es pro-apoptótica. Las mutaciones en *p53* se encuentran asociadas a una variedad de cánceres humanos, incluyendo los cánceres hereditarios tales como el síndrome de Li-Fraumeni.

Se sabe que *P53* es capaz de unirse al ADN produciendo un aumento en la transcripción de factores de crecimiento celular (puede hacerlo también estando mutado e induciendo la transcripción de factores de crecimiento tales como ERBB1). Se ha descrito que *p53* puede transformar células esofágicas primarias, inmortalizarlas y hacerlas invasivas. Se define entonces la función de *p53* como oncogénica. Se ha localizado *p53* por inmunohistoquímica, en el núcleo de células de la granulosa de ovarios de rata. La sobreexpresión de *p53* está vinculada a la apoptosis de las células de la granulosa de rata y el ARN mensajero de *p53* se observa en las células de la granulosa luteínica humana. En condiciones de estrés, las células de rata muestran la proteína p53 ya que actúa regulando los genes involucrados en la detención del ciclo celular.

Tiene un alto nivel de expresión en células transformadas (cancerígenas) y se cree que al unirse al ADN activa la transcripción de genes que inhiben la proliferación celular, por lo cual aparece con un rol protector. Su función continua siendo motivo de investigación ya que aún no se ha dilucidado completamente (Dent, 2013; Lin & Taatjes, 2013).

Las caspasas

El nombre de caspasas fue propuesto en 1996 por un conjunto de siete científicos que trabajaban en la compañía Merck, en Harvard Medical School, en La Jolla Cancer Research Foundation y en otros laboratorios. Se reunieron porque hasta ese momento se utilizaba una nomenclatura confusa y redundante para la familia de proteasas relacionadas con ICE/CED-3.

El primer gen descubierto fue *Ced-3* cuya expresión es determinante de apoptosis en el nematodo *Caenorhabditis elegans* y su homólogo en humanos es *ICE* (luego se denominó Caspasa 1).

El nombre de caspasas se basa en las propiedades catalíticas de estas enzimas, todas se caracterizan por tener cisteína (C) en su sitio activo y "aspase" porque cortan "clivan" después del ácido aspártico. El número que las identifica corresponde cronológicamente a la fecha de publicación (Alnemri *et al.*, 1996). Hasta 1997 se conocían 10 proteasas de la familia de las caspasas en humanos y se iniciaba una investigación muy activa sobre dichas proteasas.

Actualmente, se reconocen 14 caspasas. La 13, originalmente descrita como de origen humano parece corresponder a un gen específico de bovinos. Las caspasas 13 y 14 podrían representar 2 variantes producidas por "splicing diferencial" ("splicevariants"). La 14 se ha relacionado con una retinopatía en pacientes diabéticos. Hasta ahora no se ha aclarado definitivamente qué ocurre con las caspasas-13 y 14 (Humke *et al.*, 1998; Koenig *et al.*, 2001; Al-Shabrawey *et al.*, 2012).

En el año 2009, al consultar la base de datos del NCBI, PubMed, las referencias halladas al usar *apoptosis* y *cáncer* como palabras clave, alcanzaban alrededor de unas 62.000 referencias (Cotter, 2009). Hoy, casi 5 años después, la base de datos arroja más de 116.200 referencias para apoptosis y cáncer. Este tema cuyo impulso se inició por los años 90, continúa siendo de gran importancia para las ciencias biomédicas.

Agradecimientos

A Iván D. Stigliano, Martín Crivello y Victoria Devoto por su contribución en las búsquedas bibliográficas. A la Fundación Científica Felipe Fiorellino por su apoyo material durante la realización del trabajo. A los colegas del INBA y FAUBA por su constante apoyo en el trabajo cotidiano. Este trabajo fue realizado, en parte, como subproducto de los subsidios Proyecto Estímulo a la Investigación N°: 0106/97 y PEI N°: 6035 otorgados por el CONICET a la Dra. María Beatriz Espinosa.

Referencias Bibliográficas

Alberch, P., & Gale, E., A., (1983). Size dependence during the development of the amphibian foot. Colchicine-induced digital loss and reduction. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, 76, 177-97.

- Alnemri, E., S., Livingston, D., J., Nicholson, D., W., Salvesen, G., Thornberry, N., A., Wong, W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87: 171.
- Al-Shabrawey, M., Ahmad, S., Megyerdi, S., Othman, A., Baban, B., Palenski, T., L., Shin, E., S., Gurel, Z., Hsu, S., Sheibani, N. (2012). Caspase-14: a novel caspase in the retina with a potential role in diabetic retinopathy. *Molecular Vision*, 18: 1895-1906.
- Arends, M. J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *American Journal of Pathology*, 136(3): 593-608.
- Boumela, I., Assou, S., Aouacheria, A., Haouzi, D., Dechaud, H., De Vos, J., Handyside, A., & Hamamah, S. (2011). Involvement of *BCL2* family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond. *Reproduction*, 141 (5): 549-61.
- Collazo, C., Chacón, O., & Borrás, O. (2006). "Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals". *Biotecnología Aplicada*, 23: 1-10.
- Cotter, T., G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature Reviews I CANCER*, 9: 501-507.
- Dent, P. (2013). Non-canonical p53 signaling to promote invasion. *Cancer Biology & Therapy*, 14 (10): 879-880.
- Ellis, R., E., Yuan, J., Horvitz, H., R., (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology* 7: 663-698.
- Glucksmann, A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontology. *Biological Reviews*, 26: 59-86.
- Häcker, G., & Borner, C. (2011). Preface to Mitochondria: The deadly organelle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813 (4): 507.
- Humke, E., W., Ni, J., & Dixit, V., M., (1998). ERICE, a novel FLICE-activatable caspase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (25):15702-7.
- Kerr, J., F., R., Wyllie, A., H., & Currie, A., R., (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26 (4): 239-257.
- Koenig, U., Eckhart, L., & Tschachler, E. (2001). Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(5): 1150-4.
- Korthout, H., A., Caspers, M., P., Kottenhagen, M., J., Helmer, Q., Wang, M. (2002). A tormentor in the quest for plant p53-like proteins. *FEBS Letters*, 526 (1): 53-57.
- Lin, S-Ch., & Taatjes, D., J., (2013). Δ Np53 and aging. *Aging*, 5 (10): 717-718.
- Wyllie, A., H., (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284 (5756): 555-556.