

Cómo se mueren las células: mecanismos moleculares e importancia biológica

C. Adriana Mendoza-Rodríguez, Gabriela Monroy-Mendoza, Claudia M. Zarazúa, Montserrat García-Guzmán, Alma García, Marco Cerbón*

Abstract (How cells die. Molecular mechanisms and biological importance)

Cell death is a very important process required for normal development and tissue homeostasis during life. The decision of the cell to die or to survive requires the participation of many genes and is a coordinate sequence of many steps. If the decision of the cell is to die, it initiates the apoptotic program which finally results in the destruction of the cell. In this revision we describe the main pathways that are used to activate cell death (mitochondrial and membrane receptors pathways), and some of the most important genes involved in this process (Bcl-2 gene family, p53, Fas, caspases). There are still many questions to solve about the molecular mechanism controlling cell death and consequently this area requires additional research. The understanding of the mechanism that control cellular death may have important implications in the treatment of several human diseases.

Introducción

La homeostasis de los órganos y tejidos depende de un balance fino entre la proliferación y la muerte celular, tanto durante el desarrollo como durante la vida adulta. El proceso de muerte celular en los tejidos está altamente regulado y se sabe que participa en el modelaje de los tejidos durante el desarrollo y en el equilibrio de la proliferación en los tejidos adultos. Por ejemplo, durante el desarrollo está involucrado en la involución de la cola del renacuajo, en la selección negativa de linfocitos para eliminar cé-

lulas auto-reactivas o no reactivas, la muerte neuronal durante el ensamblaje del sistema nervioso central y la formación de dígitos por la involución de los intertrigos. En animales adultos, este proceso está involucrado en la muerte de células somáticas que están en exceso o alteradas y en el recambio de tejidos, como son la sangre, los epitelios del útero, de la vagina, del intestino y la piel, entre otros.

De los tipos de muerte más estudiados podemos citar la apoptosis y la necrosis; ambas involucran eventos bioquímicos y morfológicos que provocan la muerte celular. La necrosis es producida por un daño mecánico o por la exposición a sustancias tóxicas. Se caracteriza por la ruptura de la membrana celular debido a que el daño causa una alteración en el intercambio de iones y de agua, provocando la salida de los componentes celulares. Se presenta frecuentemente con una inflamación aguda e involucra a grupos celulares adyacentes (Cruchten y Van den Broeck, 2002). En contraste, la apoptosis o muerte celular programada es una muerte que se produce de manera coordinada en células que se encuentran en exceso, que son peligrosas, que están dañadas o que se recambian.

En general, la apoptosis ocurre en dos fases. En la primera etapa o fase de activación, la célula comprometida a morir se encoge, aparecen vesículas similares a burbujas en la superficie, la cromatina se compacta y se agrega en masas típicamente circunscritas. Existe irregularidad en la membrana del núcleo y de la superficie celular, condensación del citoplasma, mientras que los organelos se mantienen íntegros. En la siguiente etapa o fase de ejecución, se observan los cambios más dramáticos de la muerte celular: el núcleo se fragmenta, el citoplasma se condensa y se forman protuberancias en la superficie celular. La separación de las protuberancias superficiales produce cuerpos apoptóticos de varios tamaños y diferente composición. La fosfatidilserina, un fosfolípido de membrana, se expone en la superficie celular y se une a los receptores de células fagocíticas como macrófagos o células dendríticas. Estas células

*Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

Correspondencia: Dr. Marco Cerbón, Facultad de Química, Edif. B. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México, DF, México.

Tel.: 52 (55) 5622 3098; fax: 52 (55) 5616 2010.

Correo electrónico: mcerbon85@hotmail.com

Recibido: 12 de junio de 2003; **aceptado:** 14 de agosto de 2003.

fagocitan los fragmentos celulares apoptóticos (Hengartner, 2000; Cruchten y Van den Broeck, 2002). Un tejido en el cual se pueden observar estos cambios celulares es el epitelio uterino, en el cual se presenta la apoptosis cíclicamente (figura 1) (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002).

El mecanismo de apoptosis es un mecanismo bastante conservado durante la evolución. En realidad los experimentos que más aportaron en el conocimiento de la apoptosis se realizaron en el nemátodo *C. elegans* (Yuang *et al.*, 1993). En la actualidad se sabe que en el proceso apoptótico participan más de 100 genes, entre los cuales los más estudiados son los de la familia de Bcl-2 (Tsujimoto y Shimizu, 2000), las caspasas (Wolf y Green, 1999) y la familia del receptor al Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (Krammer, 2000). Existen dos vías moleculares bien caracterizadas de inducción de la apoptosis; la vía mitocondrial y la vía de receptores de membrana. En la primera están involucradas las proteínas de la familia de Bcl-2 y en la segunda las proteínas de la familia de los receptores de TNF (Hengartner, 2000).

Mecanismos de muerte en la vía mitocondrial

La proteína de Bcl-2 inicialmente fue detectada en leucemias de células B, a lo cual debe su nombre. La familia de Bcl-2 se encuentra constituida, hasta el momento, por 16 proteínas homólogas, algunas de las cuales suprimen la apoptosis, mientras que otras la promueven. Estas proteínas tienen dominios altamente conservados que se llaman dominios homólogos a Bcl-2 (BH). Esta familia se ha dividido en tres grupos funcionales dependiendo del número de dominios BH que contengan (Tsujimoto y Shimizu, 2000):

Grupo I. Se caracterizan por tener cuatro dominios conservados homólogos a Bcl-2 (Dominios BH1 a BH4). Su extremo carboxilo terminal es hidrofóbico (lo cual hace que se localice en la membrana externa de la mitocondria y ocasionalmente en el retículo endoplásmico) con la mayor parte de la proteína en el citosol. Todos los miembros de este grupo tienen actividad anti-apoptótica y son: Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1) y Boo.

Grupo II. Consiste en miembros con actividad pro-apoptótica e incluye a proteínas como Bax, Bak, Bad, Mtd (Bok), Diva. Estas proteínas tienen una estructura muy similar a las proteínas del primer grupo, ya que comparten una secuencia homóloga en BH1, BH2 y BH3 pero carecen del dominio BH4.

Grupo III. En este grupo se encuentran proteí-

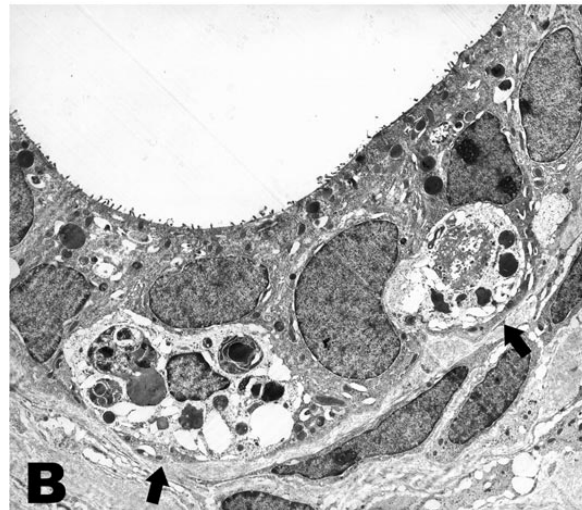


Figura 1. Características microscópicas de la apoptosis en el epitelio del útero de la rata. Entre las principales características de estas células en proceso de apoptosis se observa que presentan condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos, y son fagocitadas por células epiteliales adyacentes y/o por macrófagos. Las flechas indican las células muertas por apoptosis.

nas que sólo tienen una característica en común, la presencia del dominio BH3 que consiste de 12-16 aminoácidos. Estas proteínas tienen una actividad pro-apoptótica e incluye a Bik, Bid, Bim, Hrk (DP5), Blk y Bnip3, Bnip3L.

Una de las características distintivas de las proteínas de la familia de Bcl-2 es la heterodimerización entre proteínas anti y pro-apoptóticas lo cual se considera que inhibe la actividad biológica de las proteínas anti-apoptóticas. Esta heterodimerización depende de la inserción de la región BH3 de la proteína pro-apoptótica en una hendidura compuesta por los dominios del BH1 al BH3 de la proteína anti-apoptótica. El dominio BH4 es requerido para la actividad anti-apoptótica y junto con los otros dominios forman siete hélices. A excepción de algunos miembros del grupo III, todas estas proteínas tienen en el extremo carboxilo terminal un dominio trans-membranal que le permite a estas proteínas anclarse en la membrana de la mitocondria.

Las proteínas de la familia de Bcl-2 tienen como principal función el control de la estabilidad mitocondrial. Las proteínas pro-apoptóticas inducen la liberación del citocromo *c* (Cyt *c*) y del factor inductor de la apoptosis (AIF) del espacio intermembranal de la mitocondria al citoplasma, mientras que las proteínas anti-apoptóticas inhiben esta liberación (Hengartner, 2000; Tsujimoto y Shimizu, 2000; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). La acción contraria

de estas proteínas ha llevado a pensar que funcionan como un reóstato que regula la muerte celular. Es decir, si existe en las células un mayor contenido de proteínas anti-apoptóticas, hay mayor formación de homodímeros anti-apoptóticos y se promueve la supervivencia celular, mientras que cuando existe una mayor cantidad de proteínas pro-apoptóticas se favorece la heterodimerización de las proteínas anti y pro-apoptóticas y la homodimerización de las proteínas pro-apoptóticas, con lo cual se induce la muerte celular programada.

No se sabe cuál es el mecanismo exacto por el cual los miembros de la familia Bcl-2 actúan para liberar al Cyt *c*. Una hipótesis es que las proteínas que conforman la familia de Bax y Bcl-2 forman canales en la mitocondria, los cuales regulan su potencial de membrana y la homeostasis del volumen (Hengartner, 2000; Newmeyer y Ferguson-Miller, 2003). Estos canales controlan la liberación del Cyt *c*, el cual cuando es liberado al citosol forma un complejo proteico (holoenzima) junto con la caspasa 9 y Apaf-1, el cual es conocido como apoptosoma. Esta holoenzima activa a la caspasa-3, que es considerada como la caspasa central en la fase de ejecución de la apoptosis. En la caspasa-3 convergen la

vía apoptótica mitocondrial con la vía del receptor de muerte ubicado en la membrana celular (figura 2).

Otra de las proteínas involucrada en la inducción de la apoptosis por la vía de la mitocondria es la proteína de p53. Esta proteína es un factor de transcripción que aumenta la frecuencia de transcripción de diversos genes que participan en la reparación y/o muerte celular entre otros. La proteína humana de p53 contiene 393 aminoácidos y ha sido dividida estructural y funcionalmente en cuatro dominios, los cuales desempeñan un papel muy preciso. El extremo amino terminal contiene el dominio de activación de la transcripción, el dominio central participa en la unión al ADN, los residuos 324-355 son necesarios para la oligomerización de esta proteína y el extremo carboxilo terminal participa en la activación de la proteína (Mendoza-Rodríguez y Cerbón, 2001).

P53 induce apoptosis en varios tipos celulares, particularmente en las células de la línea hematopoyética. Asimismo, diversos estímulos pueden causar apoptosis dependiente de p53, incluyendo daño al ADN, expresión de oncogenes virales (i.e. E1A de adenovirus o E7 de papilomavirus), expresión de oncogenes celulares (i.e. *myc*), pérdida de factores de crecimiento, o de interleucinas, o por la pérdida de genes supresores de tumores (i.e. *Rb*). Sin embargo, la inducción de apoptosis también puede ocurrir por vías independientes de p53.

Entre los genes cuya expresión es regulada por p53 y que pueden influir en la decisión de entrar a una vía apoptótica se encuentran *IGF-BP3*, *bax*, *bcl-2*, *PIGs* (genes inducidos por p53), *Fas*, *FasL* y *DR5* (Receptor de muerte 5). Todos estos genes son inducidos por p53, a excepción de *bcl-2* que es inhibido (en algunos tipos celulares). La sobreexpresión de *bcl-2* puede bloquear la apoptosis inducida por p53. Bax se une a Bcl-2 y antagoniza su habilidad para bloquear la apoptosis. Así es que la síntesis de Bax y la inhibición de Bcl-2 dependientes de p53 induce la respuesta de la célula hacia apoptosis (figura 2) (Mendoza-Rodríguez y Cerbón, 2001).

Recientemente se han descrito mecanismos por medio de los cuales p53 puede inducir la apoptosis independientemente de su función transactivadora. Se ha observado, en varios tipos celulares, en donde la apoptosis mediada por p53 e iniciada por daño en el ADN ocurre en ausencia de síntesis de RNA o proteínas o en presencia de p53 con deficiente función transactivadora (Mihara *et al.*, 2003).

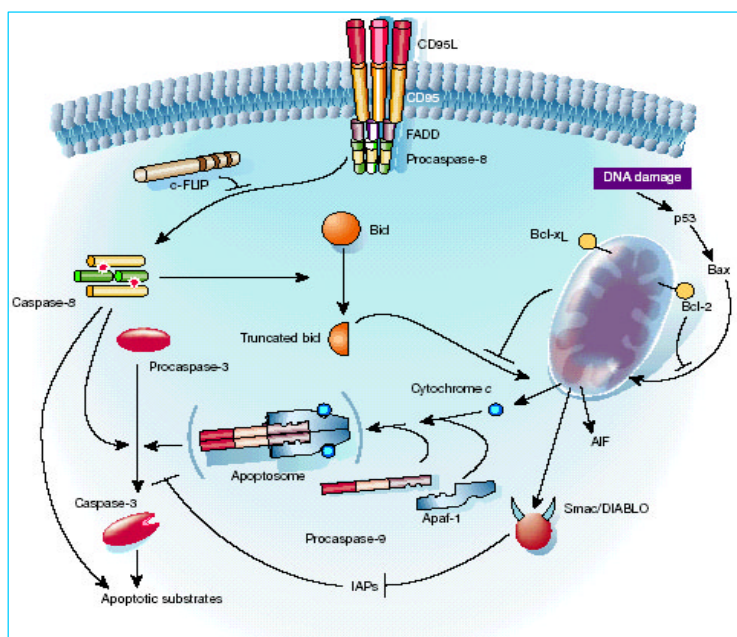


Figura 2. Esquema que simplifica las vías apoptóticas conocidas. Se muestra en la parte superior izquierda la vía controlada por el receptor de muerte (Fas). En la parte derecha del esquema se muestra la vía mitocondrial. Ambas vías controlan el balance entre los mecanismos de activación e inhibición de las caspasas, proteínas encargadas de llevar a cabo la muerte celular (ver texto) (modificado de Hengartner, 2000).

Mecanismos de muerte en la vía de receptores membranales

La vía del receptor de muerte se encuentra controlada por citocinas, una familia de proteínas que regula la proliferación y diferenciación celular por medio de su unión a receptores específicos presentes en la membrana celular de las células blanco. Estas citocinas forman la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e incluyen el TNF, Ligando de Fas (FasL), ligando de CD40, ligando de CD27, ligando de CD30 y TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF). Estas proteínas se unen a su receptor membranal: el receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR), Fas, CD40, CD27, CD30 y DR5 respectivamente (Hengartner, 2000; Krammer, 2000; Cruchten y Van den Broeck, 2002). Estos receptores se encuentran ubicados en la membrana citoplasmática y contienen un dominio intracelular que es fundamental para la transducción de la señal apoptótica. Estos receptores se activan por la unión del ligando específico. La activación del receptor induce la trimerización del mismo, lo cual induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares y con ello la activación de la cascada de las caspasas (figura 2). Por ejemplo, el factor pro-apoptótico FasL (ligando de Fas) produce su señalización al unirse a su receptor de membrana (Fas). Al llevarse a cabo esta unión se induce la trimerización de Fas, lo cual provoca un cambio conformacional que le permite interactuar con proteínas intracelulares como FADD. Esta interacción se da gracias a dominios homólogos presentes en ambas proteínas llamados dominios de muerte (DD). El complejo Fas-FADD, a su vez, recluta a la procaspasa-8. Esta unión se da gracias a los dominios efectores de muerte (DED) contenidos en FADD y la procaspasa-8. Al unirse la procaspasa-8 a FADD se activa la caspasa-8 por proximidad inducida como se mencionará más adelante. Esta caspasa puede activar la cascada de caspasas por procesamiento proteolítico de la caspasa-3, la cual es una caspasa ejecutora. Es importante mencionar que la proteína inhibitoria de ICE parecida a FADD (FLIP) inhibe las interacciones entre Fas-FADD-procaspasa-8 y de esta forma es capaz de inhibir la apoptosis (Hengartner, 2000; Krammer, 2000; Cruchten y Van den Broeck, 2002).

Los ejecutores de muerte: las caspasas

Los primeros estudios que identificaron a las caspasas, las cuales son proteínas esenciales para la muerte celular (ejecutoras de la lisis proteica y, por lo tanto,

la destrucción celular), se obtuvieron a través de estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Yuang *et al.*, 1993). Estas proteínas se han conservado a través de la evolución. En el humano se han identificado más de una docena, y se ha sugerido que dos tercios tienen una función apoptótica. Las caspasas (**c**isteine-**a**spartic acid proteinases) tienen en el sitio activo un residuo de cisteína y digieren las proteínas después de un residuo de ácido aspártico (Asp-Xxx). La especificidad del sustrato para una caspasa está dada por los cuatro residuos amino terminal a el sitio de hidrólisis del enlace peptídico (Wolf y Green, 1999).

Las caspasas poseen una estructura común, caracterizada por un prodominio en el extremo amino terminal, un subdominio grande que contiene el sitio activo con cisteína y la secuencia conservada QACXG (dominio p20) y una subunidad pequeña en el carboxilo terminal (dominio p10). Las caspasas requieren ser digeridas para activarse. Un sitio de corte en ácido aspártico separa el predominio del subdominio grande, y a su vez existen otros sitios de corte entre el subdominio grande y el pequeño. Dos moléculas de caspasas digeridas forman un heterotetrámero, compuesto por dos subunidades grandes y dos pequeñas, el cual constituye la enzima activa. Hasta ahora se han reportado al menos tres mecanismos generales responsables de activación de caspasas (Wolf y Green, 1999; Hengartner, 2000; Cruchten y Van den Broeck, 2002), los cuales se resumen de la siguiente manera:

1. Proteólisis cascada arriba, ya sea por las mismas caspasas o por una granzima B (responsable de la actividad citotóxica de los linfocitos Tc). La proteólisis se lleva a cabo entre los dominios p20 y p10 e incluso entre el prodominio y el dominio p20 de la pro-caspasa, los cuales contienen un residuo Asp-Xxx, sugiriendo una activación autocatalítica. Esta "estrategia" para activar la cascada de caspasas se presenta en las células para activar caspasas con prodominios cortos como las caspasas 3, 6 y 7, las cuales son consideradas como las caspasas más abundantes y activas. Estas caspasas son reconocidas como ejecutoras de apoptosis.
2. Proximidad inducida. Es la forma en la que se activa la procaspasa-8 por la vía de receptores membranales. Al unirse varias moléculas de la procaspasa-8 a varias moléculas de FADD se favorece la interacción entre las procaspasas-8, activándose entre ellas por proximidad. Ésta es

la caspasa iniciadora de la vía de receptores de membrana.

3. Formación de holoenzima. Esta activación depende de la liberación de Cyt *c* por la mitocondria y la oligomerización dependiente de ATP de Apaf-1 (una proteína), que al unirse a la procaspasa 9 provocan un cambio conformacional activándola. Esta caspasa es considerada la caspasa iniciadora de la vía mitocondrial.

Una vez activadas las caspasas, su función no solamente es la degradación de proteínas, sino que en la mayoría de los casos inactivan o activan proteínas. La activación de éstas se realiza en forma directa por la eliminación de un dominio regulador negativo o en forma indirecta por la inactivación de la subunidad reguladora. Hasta ahora se han identificado varios sustratos importantes para las caspasas. Un ejemplo de un mecanismo de activación responsable de la famosa escalera nucleosomal es la activación de la DNasa activada por caspasa (CAD), la cual existe en la célula formando un complejo con una subunidad inhibidora (ICAD). La caspasa-3 activa a la CAD mediante la eliminación de la subunidad inhibidora, causando la liberación y activación de la subunidad catalítica. El ADN es cortado en sitios inter-nucleosomales por CAD neutras sensibles a Ca^{2+} y Mg^{2+} y pueden ser inhibidas por zinc; esta propiedad ha sido ampliamente utilizada para caracterizar apoptosis celular en muchos modelos experimentales, por la aparición de un patrón de bandeado del ADN de aproximadamente 180-200 pb, aunque su uso ha sido exagerado. Las caspasas inactivan, por digestión, proteínas fundamentales en la función celular normal. Tal es el caso de las lamininas nucleares. La degradación de esta proteína causa la desintegración del núcleo, ya que estas proteínas estructurales dan soporte a la envoltura nuclear. Otra proteína que es degradada por las caspasas es la Poly ADP ribosa polimerasa (PARP), la cual es indispensable para la reparación del ADN dañado (Cruchten y Van den Broeck, 2002).

Mecanismos de la inhibición de la apoptosis

La vía del receptor de muerte y mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa 3. La activación de la caspasa-3 y su actividad es antagonizada por proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), las cuales a su vez son antagonizadas por la proteína Smac/DIABLO liberada de la mitocondria (Hengartner, 2000).

Conclusiones y perspectivas

Como se puede observar, la apoptosis es un mecanismo importante para mantener la homeostasis de los tejidos; asimismo, la apoptosis es un fenómeno constante en el desarrollo de todos los animales. Cuando existen alteraciones en este mecanismo se producen graves enfermedades. Por ejemplo, la apoptosis insuficiente puede promover la oncogénesis al permitir la acumulación celular. Por otra parte, la actividad excesiva de caspasas puede promover el suicidio celular masivo y éste puede ser la base de enfermedades degenerativas, tales como la enfermedad de Huntington y de Alzheimer. El objetivo de futuras investigaciones será comprender la regulación de estas enzimas y cómo regular su actividad en células específicas. Esto deberá facilitar los esfuerzos por manipular la maquinaria apoptótica con fines terapéuticos.

Tomando en cuenta todos los aspectos que se desconocen sobre el mecanismo molecular de la apoptosis, éste es un campo fértil para el desarrollo de un gran número de investigaciones que podrán tener aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades, e incluso en la esperanza de vida. ■

Referencias

- Cruchten, S.V. y Van den Broeck, W., Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis, *Anat. Histol. Embryol.*, 31, 214-233, 2002.
- Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 770-776, 2000.
- Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407, 789-794, 2000.
- Mendoza-Rodríguez, C.A. y Cerbón, M., El gen supresor de tumores p53: mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular, *Rev. Invest. Clín.*, 53, 266-273, 2001.
- Mendoza-Rodríguez, C.A., Merchant-Larios, H., Segura-Valdez, M.L., Moreno-Mendoza, N., Cruz, M.E., Arteaga-López, P., Camacho-Arroyo, I., Dominguez, R. y Cerbón, M., Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle, *Mol. Reprod. Develop.*, 61, 445-452, 2002.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. y Moll, U.M., p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria, *Mol. Cell*, 11, 577-590, 2003.
- Newmeyer, D.D. y Ferguson-Miller, S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death, *Cell*, 112, 481-490, 2003.
- Tsujimoto, Y. y Shimizu, S. Bcl-2 family: Life-or-death switch, *FEBS Letters*, 466, 6-10, 2000.
- Yuang, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. y Horvitz, The *C. Elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 converting enzyme, *Cell*, 75, 641, 1993.
- Wolf, B.B. y Green, D.R. Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases, *J. Biol. Chem.*, 274, 20049-20052, 1999.