

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**APOPTOSIS: BASES MOLECULARES
DE LA MUERTE CELULAR**

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL
TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA
OSCAR JAVIER PEÑA PELÁEZ

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARCÍA MACÍAS

MÉXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD LA SALLE



**SOLICITUD DE AUTORIZACION
PARA LA APROBACION E IMPRESIÓN DE TESIS
(INDIVIDUAL)**

**C. DIRECTOR GENERAL DE INCORPORACION
Y REVALIDACION DE ESTUDIOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Presente**

Peña Pelaez Oscar Javier
APELLIDO PATERNO MATERNO NOMBRE (S)

Número de Cuenta U.N.A.M. 864009609 alumno de la Carrera de: _____

Químico Farmacéutico Biólogo

Solicita la autorización de impresión de la Tesis Titulada: APOPTOSIS: Bases moleculares
de la muerte celular

FIRMA DEL SOLICITANTE

OTORGO EL VOTO APROBATORIO

Q.F.B. José Antonio García Macías

**ASESOR DE TESIS
(Nombre y Firma)**

M. en C. Raúl Alberto Hauser Luna

**DIRECTOR DE LA ESCUELA O FACULTAD
(Nombre y Firma)**

HORTENCIA NEGRETTI RODRIGUEZ
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES

México, D.F. a 22 de Abril del 2004.

A mis Padres...

Índice

Capítulo 1: Antecedentes	11
Capítulo 2: Introducción	13
Capítulo 3: Objetivos	17
Capítulo 4: Justificación	19
Capítulo 5: Generalidades	21
• El origen y la evolución en el papel de la muerte celular programada	
• Aspectos de la apoptosis	
• Apoptosis vs necrosis	
• El estudio de la muerte celular utilizando modelos celulares y de desarrollo	
• Propuesta genética de la muerte celular programada en <i>Caenorhabditis elegans</i>	
• Cuadro 1	
• Cuadro 2	
Capítulo 6: Bioquímica y señalización	41
• Cambios pre-letales en las células	
• Terminología y conceptos. Mecanismos de oncosis que inician con la muerte celular	
• Características estructurales y enzimáticas de las caspasas en los mamíferos	
• Papel de las caspasas en la enfermedad	
• Actividad de las endonucleasas en la apoptosis	
Capítulo 7: Apoptosis, inmunología y SIDA	57
• Señalización apoptótica en linfocitos	
• Regulación de la respuesta inmune por muerte celular	
• Apoptosis en autoinmunidad	
• SIDA y muerte celular	
Capítulo 8: Relevancia clínica de la apoptosis	69
• Importancia en la oncología clínica y en la terapia del cáncer	
• Muerte celular neuronal durante el desarrollo y en la enfermedad	
• Muerte celular en la enfermedad de Alzheimer	
• Aspectos genéticos y moleculares de la apoptosis en los ovarios	
• Apoptosis en tejidos del ojo durante el desarrollo y en la enfermedad	
Capítulo 9: Conclusiones y perspectivas	79
Capítulo 10: Referencias	81

Capítulo 1

Antecedentes

La palabra apoptosis fue propuesta por Kerr, Willie & Currie por sugerencia del Prof. Cormack J., del Depto. Griego de la Universidad de Aberdeen (Kerr et al., 1972) proviniendo del griego "apoptosis", esta palabra viene de la asociación de dos fonemas griegos: "apo" por encima, elevado y "ptosis", caída o deslizamiento, queriendo significar "caer fuera o caída desde lo alto"; recordando a las hojas que caen en otoño desde los árboles o a los pétalos que caen desde las flores; Kerr y sus colaboradores adoptaron esta palabra griega que distingue a esta clase de suicidio celular de la necrosis cuya pronunciación es apo-TO-sis sin pronunciar la segunda "p"; a la apoptosis también se le conoce como "Muerte Celular Programada" y a pesar de su importancia en la fisiología y fisiopatología, su estudio se retomó a inicios de la década de los '80s.

En el siglo XIX la muerte celular es reconocida como un programa integral que forma parte del desarrollo del organismo y que integra la base de la morfología de los seres vivos. En los 70's (Kerr et al., 1972) el patólogo Australiano John F. R. Kerr y sus colegas Escoceses Andrew H. Wyllie & Alastair R. Currie publicaron diferentes observaciones referidas a la muerte celular programada describiendo las características morfológicas de células desintegradas en variados tipos de tejidos. En los 80's (Ellis & Horvitz, 1986), inician con la descripción de moléculas y mecanismos de la morfología de la apoptosis al presentar sus trabajos sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* y desde entonces el conocimiento acerca del programa apoptótico se ha incrementado rápidamente y sigue incrementándose día a día, y gracias a esto se han definido los mecanismos del proceso.

Posteriormente Vaux, D.L. en 1994 describe la cascada proteolítica dirigida por las caspasas y Wyllie, A. en 1998 explica el colapso que se lleva a cabo en la mitocondria y que marca el punto del no retorno ya que la superficie celular expone entonces la fosfatidilserina mientras que en el núcleo ocurre la fragmentación del ADN. La investigación sobre la apoptosis en los últimos diez años ha adquirido un ritmo vertiginoso, escribiéndose alrededor de 12,000 artículos científicos al año sobre el tema. A pesar del poco tiempo transcurrido, se espera que en pocos años los conocimientos básicos sobre la apoptosis se puedan aplicar al diseño de fármacos que puedan activar o inhibir selectivamente la muerte de las células.

Las células pueden -y frecuentemente lo hacen- morir por ellas mismas, en un proceso conocido como apoptosis. Esta capacidad es esencial para el funcionamiento apropiado del organismo y la regulación defectuosa de ésta, puede estar atrás de muchas enfermedades. La salud y la integridad de todos los organismos multicelulares –incluidos los humanos- dependen no sólo de la habilidad del organismo de producir nuevas células, sino también de la habilidad de las células individuales de autodestruirse cuando éstas se vuelven innecesarias, superfluas o caóticas. Este proceso crítico, actualmente llamado apoptosis, o muerte celular programada ha sido observado por décadas, obteniéndose progresos y adelantos muy valiosos en la comprensión de cómo el suicidio celular es representado y controlado. Como podremos observar, el tema nos invita a continuar ya sea por curiosidad científica o también por el deseo de saber cómo se podrían combatir algunas de las enfermedades críticas presentes en el mundo tales como Cáncer, SIDA, enfermedad de Alzheimer y Artritis Reumatoide.

Capítulo 2



Introducción

Al iniciar este trabajo de tesis el objetivo era ayudar a evaluar la importancia y el impacto de la muerte celular, para lo cuál se realizó un escrutinio sobre la bibliografía existente y se escogieron los artículos que se consideraron más importantes, en cuanto al enfoque en los principales temas con el fin de comprender ampliamente y de manera global todo lo que implica el amplio campo de la muerte celular. En los diferentes capítulos se hablará de la muerte celular, de su significado evolutivo, de sus mecanismos fisiológicos, de su significado en diferentes áreas y situaciones, de sus implicaciones médicas (que nos ayudarán en el entendimiento de la regulación de la muerte celular). Lo que se pretende con esta revisión bibliográfica es que toda persona que la lea incremente sus conocimientos de los principales conceptos y evalúe lo que representa la apoptosis y la muerte celular programada.

Se dividirá esta revisión bibliográfica en **tres** apartados que contienen diez capítulos. La **primera** parte consiste en los antecedentes, la introducción, los objetivos y la justificación.

La **segunda** parte consiste en el cuerpo del trabajo que son las generalidades, la bioquímica y señalamiento, la apoptosis en inmunología y SIDA y la relevancia clínica de la apoptosis. En el capítulo de **generalidades** se revisará el fenómeno de la muerte celular y las diferencias que encontramos entre la muerte celular por necrosis y la muerte celular fisiológica enfatizando en los eventos *post mortem*. Se empezará con una consideración de la muerte celular programada la cuál nos ubicará en el origen de la muerte celular como un programa, tratando de llegar a racionales que nos enfoquen en la distinción entre muerte y sobrevivencia en la mitocondria, en la cercana relación que observamos entre el ciclo celular y la muerte celular, y en los mecanismos genéticos de la muerte celular observados en el *Caenorhabditis elegans*, el cuál ha sido de gran valía en la investigación de este campo.

En el capítulo de **bioquímica y señalamiento de la apoptosis** se iniciará con una revisión de conceptos generales para posteriormente centrarnos en un tema de vanguardia, que será el papel de las proteasas, enfatizando en cómo organismos complejos han elaborado sistemas tan sencillos y simples como los del *Caenorhabditis elegans*, generando una compleja cascada proteolítica seguida de una rápida secuencia de cambios, también se hablará del diferencial en la vulnerabilidad de las células, la importancia del citoesqueleto y los mecanismos de formación de los clásicos cuerpos apoptóticos para finalmente cerrar el capítulo con una discusión sobre las consideraciones de las promesas terapéuticas basadas en el control de las proteasas.

En el capítulo de **apoptosis, inmunología y SIDA** se hablará de un tema esencial en la muerte celular que es conocido como la reacción que se presenta ante un intruso por los miembros del sistema linfático y hematopoyético, enfocándonos en la dependencia que tienen las células de la existencia o de la ausencia de determinadas señales (las células pueden morir o dejar de hacerlo dependiendo de las señales encontradas o no encontradas en el medio), concentrándonos en el mecanismo por el cuál la interacción entre Fas y su ligando Fas pueden aniquilar las células del

sistema inmune y el papel que aquí juegan las proteasas. El tema es altamente complejo en cuanto al mecanismo de señalación usado para generar la distinción entre la respuesta al crecimiento y la respuesta a la muerte. Para finalizar con este capítulo se examinará la situación del SIDA enfatizando el interés en el virus, en la protección de las células del huésped y en cómo se destruyen las células infectadas.

El tema más importante es el cómo las diferentes células del organismo muestran una susceptibilidad diferente a la apoptosis, y esto se revisará en el capítulo de **apoptosis y enfermedad** explorando el problema de por qué solamente ciertas células mueren y por qué otras tardan bastante tiempo en hacerlo, enfatizando en la inutilidad de examinar la muerte celular en modelos *in vitro* con substratos artificiales, analizando las señales pre-apoptóticas y dando una esperanza de que podríamos ser capaces de identificar células en agonía y diferenciarlas de las células muertas; el concepto de la diferente susceptibilidad está basado en reconocer los caminos que sigue la muerte celular y el reensamble inicial de la división celular, este tema relaciona a moléculas receptoras de membrana con uno o más ligandos, generando una activación que puede ir en múltiples direcciones dependiendo de la naturaleza y del tiempo en el que aparezcan los ligandos y del estado del metabolismo de la célula, incluyendo la forma y la historia de la misma. Además se enfocará la relevancia clínica de la apoptosis, para lo cuál muchos autores hablan de acciones que tomaron o que podrían tomar en pacientes con diferentes estados patológicos, hablaremos de los mayores problemas de importancia médica como fertilidad y cáncer y el por qué debemos establecer múltiples consideraciones potenciales para examinar problemas médicos.

Y la **tercera** parte consiste en las conclusiones y perspectivas del trabajo y en las referencias utilizadas para la creación y el diseño del mismo.

A lo largo de la revisión, se tratará de crear conciencia de que los organismos implicados en la muerte celular la utilizan de una forma positiva ya que gracias a ella pueden esculpir su desarrollo arreglando rápidamente la expansión y la subsecuente contracción de la población celular en los sistemas inmune y reproductivo y en cómo defienden el ser destruidas por células que han sido infectadas o atacadas. Las células y los organismos constantemente se encuentran monitoreando señales dadas y recibidas por las diferentes células y respondiendo como lo harían los agentes del servicio secreto; una respuesta incorrecta o confusa significaría la muerte; el reconocimiento de estas señales de alta seguridad son la diferencia entre suicidarse o seguir viviendo.

Tres temas críticos serán la columna vertebral de esta revisión: El **primer** tema que se considera crítico, es la señalación utilizada por las células. Un gran número de investigaciones han hecho que nos enfoquemos en las señales de sobrevivencia y/o en las señales de muerte; dichas señales pueden provocar que agentes patológicos infecciosos o células potencialmente malignas no mueran (debido a la presencia de genes anti-apoptóticos) y dichas señales pueden provocar también que el organismo pronostique el daño invocando al suicidio celular (debido a la presencia de genes pro-apoptóticos), ocasionalmente, como en cualquier guerra, las batallas salen al territorio civil y así, tanto en el SIDA como en las enfermedades inflamatorias y autoinmunes las células que se encuentran como espectadoras podrían morir.

El **segundo** tema que se considera crítico, es la posible confusión que podría presentarse por diferencias ocasionales en la morfología derivada de la Biología Molecular, las proteasas pueden diferir pero tener los mismos objetivos; la morfología puede diferir dependiendo el caso y dichas diferencias son atribuibles a las distinciones biológicas, como por ejemplo, la estructura de la célula y la relativa urgencia de prevenir mitosis en una célula dañada. El **tercer** tema que se considera crítico, es que muchos de los eventos encontrados o muchos de los puntos identificados se presentan en el estudio de las células muertas o midiendo cambios *post mortem* en donde estamos limitando varios eventos. Es posible que la contracción celular sea una parte de la clásica morfología y que no es otra cosa, más que un resultado tangible de la energía disponible en las células cuando el calcio entra y desequilibra el metabolismo de la célula provocando cambios en ella por lo que varios autores comentan que esto produce en el citoesqueleto fragmentación y lo observamos como fragmentos englobados.

Capítulo 3



Objetivos

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Conocer las características del procesos apoptósico, con base a una revisión bibliográfica sobre la ultraestructura, bioquímica, inmunología e incidencia de la muerte celular.
2. Determinar qué oncogenes se encuentran implicados en el proceso apoptósico, y cuáles son las características y funciones de los mismos.
3. Inferir cuáles son las perspectivas y los alcances de la apoptosis y la muerte celular programada en cuanto a las alternativas terapéuticas que puede ofrecer en áreas tan diversas como el cáncer, SIDA y enfermedades crónico degenerativas.

Capítulo 4



Justificación

La muerte celular no es más que un simple evento que caracterizamos como apoptosis y no debemos perder de vista la importancia que tiene para ésta, la Biología Molecular, la Microscopía Electrónica y el comportamiento de los niveles intracelulares. La muerte celular programada y la apoptosis son aspectos muy importantes para la vida y para la salud, y nuestro acceso y manipulación en la misma puede tener consecuencias en muchos campos de la medicina y agricultura por lo que necesitamos entender a fondo y reconocer cómo es que sucede este fenómeno, además necesitamos conocer el cómo una célula puede integrar tanta multiplicidad de señales y cómo nosotros podemos desde el exterior leer e interpretar dichas señales y usar la información que se derive de las mismas para regular la salud de los organismos vivos.

Capítulo 5



Generalidades (el fenómeno de la muerte celular)

El origen y la evolución en el papel de la muerte celular programada

La pregunta inicial acerca de la posible existencia de mecanismos de muerte celular y el papel de programas fisiológicos de muerte celular emergen en el fin de este siglo, pero es hasta años recientes que dichos estudios han sido realizados en células de animales multicelulares que son programadas para autodestruirse y lo que se ha encontrado es que la sobrevivencia de las células depende de la represión del programa de autodestrucción (Ameisen, 1996). La identificación de la regulación genética de la muerte celular programada juega un papel importante no sólo en el desarrollo sino también en la homeostasis de los tejidos y esto ha iniciado con la aceptación de la idea de que las células sobrevivirían cuando existieran señales dadas por otras células que suprimieran automáticamente la inducción del proceso del suicidio celular.

Una visión más amplia de la muerte celular programada emerge cuando intentamos contestar a la pregunta ¿De dónde proviene la muerte celular programada?, en otras palabras, las preguntas son ¿cuándo? y ¿cómo? la muerte celular programada ha sido seleccionada durante el proceso de la evolución. Nos enfocaremos en el concepto evolutivo y en los paradigmas, las implicaciones y las preguntas que emergen naturalmente del origen y del papel de la muerte celular programada ofreciendo cambios en la perspectiva, que puedan favorecer la interpretación de resultados de diferentes experimentos revisados.

En cuanto al origen evolutivo de la apoptosis (Ameisen, 1996), el descubrimiento de que todas las células del organismo están programadas para su propia destrucción y de que su supervivencia depende continuamente de la represión de tal programa realizado por las señales del entorno no sólo ha modificado profundamente la concepción biológica de la salud y de la enfermedad, sino que también ha transformado las ideas sobre la evolución del mundo viviente. El determinar en el tiempo el origen de los primeros genes reguladores de la autodestrucción celular es complicado, sin embargo una posibilidad es que el origen de los programas de suicidio celular que son una forma de regulación social del destino de las células sea simultáneo al de los organismos pluricelulares, aunque existen datos que apuntan un origen mucho más antiguo de los programas de suicidio celular pues ya funcionan en las células eucariotas, especialmente en los parásitos causantes de graves enfermedades humanas. La existencia de programas de suicidio celular y de una regulación social de la supervivencia de las células parece ser así un componente esencial y ancestral de la adaptación de los seres vivos a un entorno.

Formas más primitivas de muerte programada existirían entre las bacterias, lo que les permitiría defenderse de las infecciones víricas y utilizarlas en las luchas entre colonias diferentes por la obtención de recursos. La formulación de medicamentos desencadenantes del suicidio de los agentes infecciosos constituiría un nuevo tratamiento de las enfermedades de este tipo. Es probable que la función inicial de los genes determinantes de la muerte de los organismos unicelulares fuese la lucha contra otras especies. Serían genes especificadores de toxinas y de los antídotos contra ellas. Los organismos unicelulares habrían utilizado luego estos genes para regular su propia supervivencia y para eliminar las células menos eficaces. La evolución seleccionaría al tiempo los mecanismos perturbadores del suicidio de las células para aumentar su eficacia multiplicadora, y los favorecedores del mismo, para eliminar las células que tuviesen alteraciones genéticas y optimizar la adaptación de la colonia a su medio.

La muerte celular programada ha sido encontrada como una parte intrínseca del desarrollo de animales multicelulares vertebrados e invertebrados estudiados hasta el momento incluyendo nemátodos, insectos, anfibios y mamíferos (Raff MC, 1992; Steller H, 1995; Vaux DL, 1993). Esto juega un papel importante en la morfogénesis de esculpir tanto la fase embrionaria como la fase de larva y el proceso de autoorganización funcional que inicia con la maduración de dos de los sistemas regulatorios más complejos de los organismos multicelulares, el sistema inmune y el sistema nervioso (Cowan et al., 1984; Duvall E and Wyllie AH 1986; Jacobson et al., 1997; Saunders JWJ 1966). En años recientes la muerte celular programada ha mostrado que juega un papel importante en los adultos, esto es en la homeostasis de los tejidos, en la regulación del número de células, en la eliminación de células anormales (debido a algún daño) y en la defensa contra infecciones (Raff MC, 1992; Cohen JJ, 1993; Ameisen JC, 1994; Vaux DL, et al., 1994), por otra parte la muerte celular programada participa en la desregulación en la patogénesis de varias enfermedades humanas severas tales como el cáncer, enfermedades autoinmunes, SIDA y enfermedades neurodegenerativas (Ameisen JC, 1994; Williams, 1991; Nagata S, and Goldstein P 1995; Thompson CB 1995).

La concepción evolucionaria de la muerte celular programada en el reino animal involucra no solamente la existencia de un solo papel sino que se extiende a aspectos cruciales como pueden ser el control genético y la importancia de aspectos de fenotipo. La muerte celular programada es regulada por señales que son dadas por otras células, tales como la información derivada del linaje de la célula y/o los mediadores solubles y/o los contactos de célula con célula. La inducción a la muerte celular programada depende esencialmente de la información del linaje de la célula tal como es el caso del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Ellis et al., 1986) o de la mosca de la fruta *Drosophyla melanogaster*; en algunas otras situaciones la combinación del linaje de las células, la señalización intracelular, el factor de activación de transcripción y los segundos mensajeros citoplasmáticos en mamíferos pueden tener el mismo resultado (Duvall E and Wyllie AH 1986; Raff MC, 1992).

En los organismos multicelulares mencionados, la muerte celular programada es un proceso de autodestrucción que involucra las tres fases del proceso apoptótico: la fase de **inducción-activación**, la fase **efectora** y la fase de **degradación** (Vaux and Strasser, 1996).

La **fase de activación** (también llamada de inducción) es la primera fase y se caracteriza por una heterogeneidad externa de los patrones de transducción de las señales que llevarán a la

muerte celular programada a través de las enzimas proteolíticas (cistein proteasas que forman parte de la familia de las caspasas Ced-3/ CPP32/DCP) que aparecen constitutivamente expresadas en muchas -sino en todas- las células del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y en mamíferos, produciendo la ejecución de la fase efectora.

La **fase efectora** que es la segunda fase de la muerte celular programada y durante la cual, los estímulos convergen en unos pocos patrones estereotipados y las células pasan a un "punto de no retorno"; desencadenando la "cascada de la apoptosis" y llegando en forma irreversible a la muerte. Se ha acumulado evidencia de que los organelos citoplasmáticos, incluyendo a las mitocondrias, participan en esta fase crítica, y que las alteraciones nucleares son precedidas por alteraciones mitocondriales, tanto estructurales como funcionales (Chinnaiyan A, and Dixit 1997; Nagata S 1997).

Varios fenotipos de la muerte celular programada han sido descritos, y en todos los casos el suicidio celular aparece como una desintegración morfológica (Kerr JFR et al. 1972; Schwartz LM, et al. 1993).

Todos los casos de suicidio celular ocurren a través de procesos de orden de desintegración morfológica, y es aquí donde observamos la tercera fase que es la **fase de degradación**, que constituye el más frecuente paradigma de la apoptosis donde se observan los signos morfológicos característicos de la misma: la marginación y lisis de la cromatina nuclear, la retracción y fragmentación celular, la condensación del citoplasma, la vacuolización y la fragmentación (Kerr JFR et al. 1972; Duvall E, and Wyllie AH, 1986); características que son asociadas con el mantenimiento inicial de la integridad de la membrana celular extensiva a la superficie celular y a la expresión de moléculas específicas en la superficie celular seguidas de fagocitosis (una rápida ingestión por células vecinas y por fagocitos) mostrando una exagerada claridad en el microscopio electrónico y con ausencia de respuesta inflamatoria observándose la integridad de la conservación del tejido, del órgano y del organismo completo en el cuál la célula ha muerto (Duvall E, and Wyllie AH, 1986; Savill J, et al. 1993; Cohen JJ, 1993).

El concepto de suicidio celular por "de fault" –o sea la idea de que las células sobreviven solamente cuando reciben señales determinadas para prevenir la ejecución del suicidio celular- ha emergido en años recientes del estudio del programa de muerte celular en mamíferos y en el modelo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, (Raff MC, 1992; Hengartner MO, 1995; Vaux DL 1993) en ambos modelos la activación de la familia de las caspasas Ced-3/ CPP32 previenen la expresión de productos tales como Ced-9/ Bcl-2, por lo que de acuerdo con este punto de vista el suicidio automático "por de fault" es un punto básico de la regulación de la muerte celular programada y dicha regulación depende de la interacción que tengan entre los productos de dos familias de genes antagonistas; de cualquier forma el punto crítico de la muerte celular programada consiste en que su regulación aparece mucho más compleja y sofisticada en mamíferos que en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, lo que Ced-3 representa para dicho nemátodo es equivalente al menos a diez miembros de la familia de las caspasas para los mamíferos y lo que Ced-9 representa para dicho nemátodo es equivalente al menos a nueve miembros de la familia Bcl-2.

En los mamíferos el mecanismo efector de la muerte celular programada es regulado por señales que se relacionan con la diferenciación y con la proliferación celular y cada una de las células del

organismo son controladas por este refinado y complejo sistema (Williams GT, 1991). El control social y la sobrevivencia celular en la muerte celular programada han sido descritos como fenómenos "altruistas" (Ameisen 1994). La conservación de las especies en animales multicelulares data de varios millones de años y varios componentes de la muerte celular programada -tanto de la secuencia genética como de las propiedades funcionales de varios de los genes involucrados en su regulación- nos indican que los programas genéticos de suicidio celular fisiológico juegan un papel esencial en el desarrollo y sobrevivencia de muchos -si no es que de todos- los organismos multicelulares (Raff MC, 1992; Steller H, 1995; Vaux DL, 1994), ya que este programa controla la regulación y la sobrevivencia celular y por ende la muerte celular por medio del proceso "altruista" del suicidio celular, y esto ha sido considerado como una de las soluciones que la evolución ha proveído a los específicos problemas sociales de los organismos (Raff MC, 1992; Vaux et al. 1994; Steller H, 1995); esta idea de solución a los problemas sociales de los organismos que proporciona la muerte celular, emerge al mismo tiempo que otra idea que se fundamenta en que los organismos multicelulares se encuentran implicados en los programas genéticos que regulan el suicidio celular en organismos unicelulares. En contraste con las células de los organismos multicelulares; cada célula de los organismos unicelulares ha sido observada como una célula germinal llamada a transmitir la información individual de su genoma a futuras generaciones.

Los programas genéticos en algunas ocasiones favorecen que la célula por ella misma inicie con su autodestrucción en caso de ser necesario y en otras ocasiones favorece el "altruismo" sacrificando a algunas células en beneficio del organismo; por lo que cualquier mutación que se produzca puede ser memorizada y puede regular el suicidio celular de los organismos unicelulares, lo que iniciaría con la selección de las células individuales que expresarán la mutación de algún gen en específico (Vaux et al. 1994); aunado a esto, es importante ubicarnos en la idea de que el origen evolucionario de los programas genéticos y del suicidio celular ha sido concomitante con el origen evolucionario de los organismos multicelulares.

Si hablamos de toxinas, antídotos y muerte bacteriana, cuando se compite por el control de los recursos del medio ambiente, varias especies de bacterias usan estrategias basadas en aniquilar a otras especies de bacterias y esto lo hacen secretando toxinas antibióticas induciendo la muerte de otras bacterias; la razón por la cuál una bacteria puede liberar una toxina para aniquilar a otra bacteria sin la necesidad de que muera, ella misma puede ser la de sintetizar un antídoto intracelular que la proteja en contra del efecto letal de la toxina (Yarmolinsky MB, 1995). La selección de genes (asesinos) que codifican toxinas utilizadas como armamento ofensivo de sobrevivencia es un ejemplo de la carrera evolucionaria de algunas bacterias vs. otras especies de bacterias y la selección concomitante de genes (protectores) que codifiquen antídotos utilizados como armamento defensivo de sobrevivencia es un proceso que provee a la bacteria de genes ejecutores y de genes de sobrevivencia -los cuáles pueden prevenir el efecto de los genes ejecutores-.

Si ahora nos referimos a los organismos multicelulares tenemos una modulación genética que consiste en un reensamble funcional entre el programa genético y las células de organismos multicelulares en la regulación de la muerte celular programada: mientras que las caspasas Ced-3/CPP32 juegan el papel de ejecutores, las caspasas Ced-9/Bcl-2 juegan el papel de los antídotos. En otras palabras, la habilidad de regular la autodestrucción ha evolucionado, dando como

consecuencia la capacidad de aniquilar a otros sin tener que morir. Otro aspecto importante es el desarrollo de una carrera evolucionaria de sobrevivencia de la bacteria a la cual le permiten tener un potencial evolucionario originando la muerte celular programada.

En el mundo procariota, la competencia entre genomas heterogéneos por los recursos del medio ambiente no están restringidos a la competencia entre diferentes especies de bacterias. Elementos genéticos tales como plásmidos o virus bacteriófagos pueden competir con diferentes especies de bacterias; en este caso es la bacteria por ella misma un recurso y sus características evolutivas le permiten ampliar sus elementos genéticos móviles en las colonias bacterianas. Las estrategias seleccionadas por los plásmidos y los bacteriófagos en orden de propagarse en las colonias de las bacterias involucran varios mecanismos que les permiten extenderse de una bacteria a otra con facilidad.

En células de animales multicelulares, las familias de genes han sido identificadas y consideradas como ejecutoras (tal es el caso de las caspasas <familia de Cisteín Proteasas> como Ced-3/CPP32/DPC) o han sido identificadas como inhibidoras (tal es el caso de Ced-9/Familia Bcl-2 y familia IAP) de la muerte celular programada. El paradigma de que los ejecutores de la muerte celular programada funcionan solamente como ejecutores (y que los inhibidores funcionan solamente como inhibidores) ha emergido del estudio del modelo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* donde Ced-9 pierde o gana su función de mutar mientras que Ced-3 pierde su función de mutar, y esto nos muestra que no existen modificaciones que involucren la regulación del desarrollo de la muerte celular programada. El gen Bcl-2 de los mamíferos que es homólogo al gen Ced-9 puede ser un sustituto parcial de Ced-9 al prevenir el desarrollo de la muerte celular programada cuando Ced-9 pierde su función mutante en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, no obstante la prevención de la muerte celular programada ha sido reportada por la expresión de Bcl-2 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Vaux et al., 1992).

Generalmente muchos de los genes de los mamíferos están involucrados en el control del ciclo celular y de la diferenciación celular, incluyendo protooncogenes, genes supresores de tumores, ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, los cuales han mostrado una participación en el control de la muerte celular programada (Raff, 1992; Vaux DL, 1993; Ameisen, 1994).

Esto da pie a la propuesta de que en las células de organismos multicelulares -en particular células de mamíferos- la maquinaria del suicidio celular puede estar involucrada con la maquinaria del ciclo celular y esta interrelación entre la regulación del ciclo celular y la regulación de la autodestrucción, es, como quiera que sea, no específica para células de organismos multicelulares ya que puede presentarse en organismos unicelulares; tanto en levaduras como en células de mamíferos, y las catástrofes que podríamos observar durante la mitosis resultarían de una activación no coordinada de las ciclinas, quienes poseen un fenotipo similar, o idéntico, al de la apoptosis (Lundgren et al. 1991; Heald et al. 1993); por otra parte, en algunas especies de bacterias, las autolisinas son necesarias para la división celular ya que se encargan de romper con la pared bacteriana de peptidoglicano, pudiendo inducir a la autodestrucción cuando se presenten condiciones ambientales poco favorables.

Y de todo esto puede surgir la hipótesis de que los efectores de la maquinaria del ciclo celular pueden tener una capacidad intrínseca no disponible para inducir la autodestrucción de la célula

en la cuál operan; si los efectores de la maquinaria del ciclo celular pueden ser también los efectores de la autodestrucción de la célula en la cual operan entonces requieren de un acoplamiento con otras células para prevenir la autodestrucción y esto puede ser tan antiguo como el origen de la primera célula (Ameisen JC, 1996).

Se ha investigado acerca del origen evolutivo de la muerte celular programada y se ha encontrado similitudes con la evolución de la diversificación genética (Ameisen JC, 1996). La nula habilidad intrínseca de la célula de evitar alteraciones y mutaciones aleatorias y genéticas ha iniciado con la selección aparentemente antagonista y concomitante de reprimir los cambios genéticos, en un continuo de varios mecanismos de corrección y reparación de pruebas de ADN y la amplificación de la diversificación del ADN en un continuo de varios mecanismos de reacomodo y reclasificación incluyendo la recombinación, la transformación, la conjugación, la transducción, la retrotransposición y finalmente la sexualidad.

La incapacidad intrínseca de evitar la autodestrucción debido a la memoria celular es intrínseco de la célula y podría ser lo que el pecado original es para los humanos –una consecuencia inherente a la reparación del ADN, a la diferenciación celular y a la progresión continua del ciclo celular- lo que implica que la evolución ha iniciado con una aparente selección antagonista tanto para la represión como para la amplificación de la maquinaria autodestructiva. En otras palabras, la evolución ha afinado la regulación del proceso de autodestrucción, de tal modo que los inhibidores de la autodestrucción han mejorado su eficiencia en el ciclo celular y en la diferenciación celular, y al mismo tiempo la selección induce la muerte celular programada mejorando con esto la idoneidad de la colonia, provocando una rápida remoción de células una vez que éstas han sido diseñadas con algún error o alguna alteración durante el ciclo celular, suprimiendo altruistamente estas células en orden de proveer una ventaja selectiva en células mejor adaptadas en condiciones de medio ambiente adversas. Aquí encontramos dos diferentes escenarios del origen potencial de la muerte celular programada en organismos unicelulares: tanto la hipótesis de una carrera evolucionaria de sobrevivencia como la acción de la memoria celular que podría ser como el pecado original de los humanos, las cuales no son antagonistas y pueden ser complementarias y sinérgicas.

En otro orden de ideas, tenemos que diversos resultados en diferentes estudios sugieren que la mitocondria juega un papel importante en la fase efectora de la muerte celular programada (Golstein P, 1997; Kroemer et al., 1997):

1. En sistemas libres de células de inducción nuclear de apoptosis, los extractos mitocondriales han sido reportados como necesarios en orden de que los extractos citoplasmáticos inducen la fragmentación nuclear.
2. La muerte celular ha sido reportada en correlación con una pérdida del potencial de membrana de la mitocondria lo que induce una permeabilidad mitocondrial y por tanto se liberan al citosol, algunas proteínas mitocondriales.
3. Esta permeabilidad induce que las proteasas sean liberadas de la mitocondria (la cuál es un factor inductor de apoptosis) y que actúen como caspasas.

4. Y finalmente en ausencia de permeabilidad mitocondrial, se libera citocromo C (el cuál se asocia con componentes aún no conocidos en el citosol) induciendo la activación de la caspasa CPP32 (Kluck RM et al., 1997; Yang et al., 1997).

Así, estas señales intracelulares inician con la fase ejecutora de la muerte celular programada, la cuál requiere de cambios mitocondriales que provocarán la liberación de proteínas las cuáles en condiciones ideales no serían liberadas. Hallazgos recientes sugieren que este paso mitocondrial está bajo control del gen Bcl-2 y BclXL quienes son antagonistas de la muerte celular programada. La gran mayoría de la familia del gen Bcl-2 se encuentra predominantemente localizada en las membranas intracelulares: en la membrana del retículo endoplasmático, en la membrana nuclear y en la membrana mitocondrial exterior. Uno de los mecanismos importantes por el cuál el gen Bcl-2 ejerce un efecto supresivo en la muerte celular programada es por que previene la liberación del citocromo C y la del factor inductor de apoptosis, señales que favorecerían la inducción de la muerte celular programada (Golstein P, 1997; Kluck RM et al., 1997; Kroemer G et al., 1997; Yang et al., 1997). Cuando el gen Bcl-2 se encuentra unido a la membrana mitocondrial externa ayuda en la reparación de otras proteínas de esta membrana tales como la quinasa Raf-1 la cuál refuerza el efecto supresor de Bcl-2 hacia la muerte celular. Cuando la familia de genes Bcl-2/BclXL está ausente, automáticamente se activa la familia de las caspasas mientras que cuando la familia de genes Bcl-2/BclXL está presente, se inicia con la prevención ante la familia de las caspasas. Por consiguiente la parte interna de la membrana externa de la mitocondria es un locus que agrupa a los principales involucrados en la ejecución y en la regulación de la fase efectora de la muerte celular programada. Algunos de estos genes involucrados como el gen Bcl-2 y las caspasas se localizan en el citosol de la célula mientras que otros como el citocromo C, son liberados desde el interior de la mitocondria. Los productos de la familia del gen Bcl-2 pueden regular la inducción de la muerte celular programada debido a la habilidad que tienen para formar poros en la membrana exterior de la mitocondria. En otras palabras, el involucramiento de los organelos de origen bacteriano como la mitocondria en la fase efectora de la muerte celular programada es regulada por la familia de genes de origen aparentemente eucariótico (Bcl-2). Considero que la regulación de la muerte celular programada en células eucariotas sólo comienza a ser entendida cuando es reemplazada en la perspectiva de una "carrera evolutiva de sobrevivencia" entre la bacteria y los ancestros de las células eucariotas con lo cuál aparecen las células eucariotas que conocemos hoy en día.

La transferencia progresiva de genes esencialmente mitocondriales al núcleo están relacionados con la regulación de la muerte celular programada y pueden representar un paso importante en el uso de la mitocondria como una herramienta de auto-destrucción. En este contexto, los mecanismos por los cuáles las células inducen una aparente pérdida irreversible del potencial transmembrana mitocondrial se inicia (cuando no es prevenido por Bcl-2) con la pérdida de la permeabilidad; éste puede ser observado como un mecanismo por el cuál las células inician su auto-destrucción hasta que son suprimidas y este proceso pudo haber sido replicado por antiguas bacterias antecesoras de las interacciones de las células eucarióticas de hoy en día.

Finalmente, si pensamos en términos de toxina-antídoto, es interesante notar la habilidad que tiene el citocromo C para activar la caspasa CPP32 y disparar la muerte celular programada. Al enfocarme en la ejecución de la muerte celular programada tanto en organismos eucariotes como en organismos procariontes se tiene que observar a los principales ejecutores que son las

caspasas; quienes juegan un papel esencial en la ejecución de la muerte celular, y quienes también desempeñan funciones esenciales requeridas para la sobrevivencia celular (cuando pensamos en ejecutores nunca pensamos en que los mismos puedan tener otras funciones además de la ejecución), y un ejemplo podría ser el citocromo C de la mitocondria que es un activador en mamíferos de uno de los principales ejecutores que es la caspasa CPP32 cuando es liberado de la mitocondria al citosol, sin embargo, desempeña una función esencial que es necesaria para la sobrevivencia celular cuando se encuentra en el interior de la mitocondria (Kluck et al., 1997). Una de las razones por la cuál la muerte celular programada se ha esparcido en organismos vivientes es debido a que su regulación representa una fuerza esencial en la evolución de la vida y considero que la selección natural que consideramos hoy en día podría ser modificada si integráramos el proceso de la muerte celular <<qué hay en el interior de la muerte celular programada y qué hay mas allá de la muerte celular programada>>.

Aspectos de la Apoptosis

A lo largo de la vida, para la construcción y el funcionamiento correcto de los organismos, es imprescindible que se destruyan determinados grupos de células. Esta muerte parcial, que tiene una gran participación precisamente en las etapas iniciales del desarrollo, está también regulada por los genes. Es el proceso conocido como suicidio celular, muerte celular programada o apoptosis. El número necesario de células en diferentes etapas de la vida requiere de un balance entre mitosis y apoptosis; una interviene en regular la generación de células y la otra interviene en la regulación fisiológica de la cantidad de células. La muerte celular fisiológica consiste en un programa de eliminación de células codificado genéticamente, cuyo fin es asegurarse del equilibrio entre proliferación celular y muerte celular (Schwartz et al., 1993). El desarrollo embrionario se caracteriza por fenómenos incesantes de multiplicación, de diferenciación y de migración celulares, cuyo resultado es la transformación del huevo originario, una célula individual, en un organismo multicelular complejo, dándose la paradoja de que durante este periodo se producen también episodios de muerte celular generalizada en ausencia de enfermedad ni envejecimientos algunos.

Se comprendió que la muerte programada podía ser desencadenada por señales emitidas por el propio organismo cuando se descubrió el papel esencial que ciertas hormonas desempeñan en la metamorfosis de insectos y batracios. Pero ha sido el estudio de la formación del sistema inmunitario y del cerebro, que son los órganos reguladores más elaborados que tienen las aves y los mamíferos, el que ha puesto de manifiesto la complejidad de los fenómenos de apoptosis, pues en este caso su cometido no es modelar una forma, sino permitir que aparezca una función. La muerte celular programada permite la eliminación de las células que se han tornado anormales y constituyen por ello un peligro para el organismo, ya sean células infectadas, con anomalías genéticas o en proceso canceroso. Que una célula concreta perezca o continúe viviendo depende, pues, de una combinación de factores internos (la naturaleza de los genes expresados) y externos (las de las señales recibidas); por lo que determinadas señales aumentan la probabilidad de destrucción, mientras que otras la reducen.

En nuestra época y en nuestra sociedad, en las que suele ocultarse y rechazarse todo lo relacionado con la muerte, el estudio del suicidio celular revela que, en lo más íntimo de cada uno de los seres

vivos, los genes mantienen una relación activa, extraña y compleja con la muerte, que es parte integrante de nuestra vida. Ya se trate de la supervivencia de las células o de la ampliación de su propia vida, la capacidad humana para alejar estas fronteras dependerá de la medida en que se logre comprender los mecanismos moleculares que gobiernan la muerte y no sólo del deseo de hacerle frente. Si se confirmase que la perturbación de los programas de suicidio celular desempeña un papel esencial en muchas enfermedades, desde los cánceres hasta el SIDA, pasando por las enfermedades neurodegenerativas, la elaboración de métodos terapéuticos que pudieran modificar tales programas sería uno de los objetivos principales de la medicina del mañana.

Si bien hace varias décadas (Clarke and Clarke, 1995) que los patólogos habían descrito diferentes formas de necrosis celular (la necrosis es la muerte celular pasiva que sigue a una agresión celular con daño severo de las membranas), recién desde mediados de la década del '60 se conoce que aparte de la necrosis existía otro tipo de muerte celular. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado por el cual las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. De ahí que frecuentemente se describa el proceso apoptótico como "suicidio celular" a la hora de definirlo conceptualmente. La metaforización "suicidio celular" es doblemente significativa si consideramos que la muerte celular programada es un proceso irreversible, al menos durante sus etapas iniciales. Conceptualmente la apoptosis puede ser considerada opuesta a la muerte celular por necrosis, en la que las células son sujetos pasivos irremediablemente abocados a morir. En este sentido, lo distintivo de la apoptosis radica en el control que ejercen las células sobre su propio destino, cuando "deciden" seguir el camino apoptótico.

En varias publicaciones he encontrado que existe la posibilidad de frenar los procesos de apoptosis mediante el uso de algunas drogas y/o productos químicos, los cuales impiden a la célula expresar sus genes y sintetizar sus proteínas correspondientes (Carson and Ribeiro, 1993), y con esto se prueba que las células participan activamente en su propia destrucción activando su programa de suicidio como respuesta a una señal dada. Actualmente se sabe que las armas de la autodestrucción se encuentran inactivas en gran cantidad de células, estando preparadas para su uso en cuanto se reciba la señal adecuada. La decisión de vida o muerte depende del entorno de la célula. Son las señales de supervivencia, de naturaleza cambiante en distintos períodos, las que impiden el inicio del suicidio. El destino de todas las células y el de todos los órganos depende continuamente del tipo de diálogo que mantengan con sus vecinos, único modo de prolongar su existencia.

Al enfocarnos en la apoptosis, lo primero que queda determinado es que la apoptosis modela la forma del embrión eliminando sus tejidos. Desaparecen así partes ancestrales, que ya no tiene ninguna función para la especie, como la cola y las branquias del renacuajo, que le son útiles durante el desarrollo y desaparecen cuando sufren la metamorfosis y se transforman en rana. Asimismo la apoptosis elimina los tejidos que unen los dedos de las patas de aves y mamíferos, que surgen así en su individualidad; una atenuación del proceso origina las patas palmeadas de las aves acuáticas. La apoptosis participa también en la abertura de los orificios del tubo digestivo, en la formación de los riñones, en la remodelación de huesos y cartílagos y en la diferenciación sexual.

Se pensó durante mucho tiempo que los programas de suicidio celular únicamente ocurrían durante el período del desarrollo embrionario, resultando inoperantes posteriormente. La idea se

basaba en datos experimentales (Ameisen, 1994) puesto que los fenómenos de muerte programadas son difíciles de detectar cuando no se producen a gran escala. Pero las investigaciones sobre los mecanismos de determinadas enfermedades, como el cáncer y el SIDA, han ido descubriendo poco a poco la importante función que los programas de suicidio celular tienen en la fase adulta. Todas las células de mamífero que se han estudiado hasta ahora se destruyen a sí mismas cuando se les priva de contacto con otras, independientemente de que provengan de un embrión, de un joven o de un adulto. La supervivencia de todas las células del organismo parece depender de la recepción, continua o a intervalos regulares, de señales al efecto emitidas por otras células, señales que impiden el desencadenamiento del programa de suicidio.

Semejante modo de funcionamiento vincula muy estrechamente el destino de cada célula con el del organismo entero y permite que éste pueda ajustar con rapidez el tamaño de las poblaciones celulares según sus necesidades (Cohen, 1995). Así, cuando se produce una infección, aumenta de manera importante el número de linfocitos, pero una vez dominada, la situación vuelve a la normalidad mediante un suicidio celular en gran escala, al que no escapan más que un pequeño porcentaje de linfocitos específicos del agente infeccioso, encargados de garantizar la memoria inmunológica.

En condiciones normales la apoptosis constituye un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis del organismo; como respuesta frente a la agresión que supone la entrada de un microorganismo, las células encargadas de la defensa del organismo, las células del sistema inmune son activadas. Dicha activación supondrá, entre otras cosas, la proliferación de aquellas células del sistema inmune capaces de parar de forma específica dicha agresión. Como resultado, buena parte de estas células, que en su momento eran necesarias, dejan entonces de serlo, iniciando muchas de ellas el proceso de muerte celular programada, en este caso inducido por la ausencia del estímulo agresor. En otras palabras, cuando una infección es controlada, gran parte de las células del sistema inmune que contribuyeron a atajar dicha infección, dejan de ser necesarias, siendo eliminado el excedente celular generado por apoptosis.

Existe una gran cantidad de procesos normales en el adulto (Jacobson et al., 1997) donde es determinante el suicidio celular:

1. Por ejemplo en la remodelación periódica del útero en mamíferos, que se produce en ausencia de fecundación, es consecuencia de episodios regulares de suicidio celular ligados al descenso drástico de hormonas sexuales que lo impiden durante veintidós días
2. Otro ejemplo es en las células de la piel, que comienzan su vida en las capas más profundas y después emigran hacia la superficie, sufriendo apoptosis en el camino. Las células muertas forman la capa exterior protectora de la piel
3. Y el último ejemplo es en el intestino, en donde las células que componen las proyecciones digitiformes de la pared intestinal se producen en la base de los "dedos" y, a los pocos días, viajan hacia el extremo, donde mueren y desaparecen

Apoptosis vs Necrosis

La muerte celular se puede producir de dos maneras diferentes: por necrosis y por apoptosis. Las células pueden morir accidentalmente, como consecuencia de agresiones físicas o químicas repentinas; se trata de un tipo de destrucción al que se da el nombre de necrosis. La apoptosis es un proceso activo en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y patológicos, en el que la célula participa de su destrucción siguiendo pasos prefijados. Todas las células del organismo están programadas para destruirse por apoptosis, sea porque hubiesen realizado ya por completo sus funciones, porque hayan sufrido un daño en el material genético o en otros componentes celulares, o porque les falten las señales que las mantengan en plena actividad funcional. Las células normales "evalúan" el nivel de lesión surgida de acuerdo con sus características; si la lesión está por encima de sus posibilidades de reparación, provocan su destrucción por apoptosis.

La necrosis es una muerte por asesinato celular, hecho en pasividad de la célula afectada por endotoxinas bacterianas, inmunoagresinas parasitarias, daño traumático-tóxico, isquemia o hiperactivación enzimática focal. Ocurre necrosis en situaciones patológicas, cuando la célula es sometida a una lesión que origina daño severo de las membranas (Cohen, 1993). Cuando una célula es afectada por este proceso, se hincha hasta que se rompe la membrana y se liberan enzimas, y la activación de estas enzimas tales como las hidrolasas, fosforilasas, proteasas, RNAsas y DNAsas resulta en una degradación de las membranas, proteínas, ARN y ADN, acelerando así la desintegración nuclear y celular, afectando a su vez a las células circundantes. La lesión de una membrana plasmática altera la capacidad de mantener la homeostasis, ingresan a la célula agua e iones extracelulares, las estructuras citoplasmáticas aumentan su volumen y terminan por romperse, con liberación en el medio intra y extracelular de enzimas lisosómicas que completan la lisis de los componentes celulares, originando una respuesta inflamatoria y posterior cicatrización, que deforma el tejido y el órgano afectado (Raff, 1992).

La muerte celular programada o apoptosis, en cambio, es completamente diferente, ya que millones de células mueren en el espacio de unas cuantas horas sin que se produzcan inflamaciones ni lesiones de los tejidos en los que ocurre. Durante el desarrollo embrionario, por ejemplo, muere diariamente casi un tercio de los timocitos, que son los precursores inmaduros de los linfocitos T, sin que el timo se resienta en lo más mínimo de tal desaparición. La apoptosis se desencadena ante una gran cantidad de mecanismos, como la perturbación de moléculas de membrana (Fas, TNF, etc.), la carencia de factores de crecimiento (endócrinos, parácrinos y aún autócrinos) que le permiten comunicarse con otras células y reafirmarse en la importancia del papel que lleva a cabo, o cuando reciben órdenes contradictorias sobre si deben o no dividirse, o al recibir radiación ionizante, drogas y diversos agentes químicos (Duckett and Thompson, 1997).

El suicidio celular es una muerte fisiológica, que no produce procesos reactivos en su derredor, y genera sustancias de acción paracrina que orientan o facilitan la regeneración (en epitelios) o que inducen reemplazos reproductivos (ej.: leucocitos) y, además, no produce la agresiva desintegración mitocondrial propia de la necrosis. Apoptosis es un proceso de muerte celular

activo, controlado genéticamente, que remueve células no necesarias o dañadas. Constituye un procedimiento de autodestrucción celular que ocurre como parte del desarrollo normal y como respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y patológicos. Origina cambios estructurales estereotipados que terminan con la fragmentación celular y la fagocitosis de los restos celulares, sin ocasionar una respuesta inflamatoria (Duke et al., 1996).

Entre otras acciones, la apoptosis participa en la morfogénesis, en el crecimiento, regresión y respuesta terapéutica de neoplasias primarias y metastásicas, en la regulación hormonal de las respuestas celulares y en la medición de respuestas inmunológicas. De tal forma, la apoptosis actúa produciendo la eliminación de células que han sufrido agresiones en su material genético o mutaciones, llevando a la desaparición de aquéllas que tengan su código genético modificado, evitando así la transmisión de errores. Como a diferencia de la necrosis la apoptosis no genera respuesta inflamatoria, este tipo de eliminación celular no ocasiona respuestas tisulares significativas. Pero la muerte celular por apoptosis no es siempre un proceso normal en el sentido de ser seguro o beneficioso: depende de qué otros eventos o circunstancias puedan coincidir con la ocurrencia de apoptosis y participa en la etiopatogenia de numerosas afecciones. También la disminución o falta de respuesta apoptótica puede desencadenar diversas patologías. La regulación fisiológica de la muerte celular es esencial para la eliminación de linfocitos hiperreactivos durante el desarrollo y para la remoción del exceso celular después de completarse una respuesta inmune. Se ha descrito que la función anormal de la apoptosis permite la supervivencia de linfocitos y es la base de la patogenia de enfermedades autoinmunes.

Las principales diferencias etiológicas y morfológicas entre necrosis y apoptosis la podemos observar en el **cuadro 1**.

En el proceso apoptótico se aprecian cambios morfológicos y bioquímicos característicos (Kroemer et al., 1995). Es precisamente su carácter rápido y discreto lo que dificulta a veces la detección de la muerte celular programada. Al producirse la apoptosis, la célula que se suicida se separa de sus vecinas, el núcleo primero se condensa y luego se fragmenta, a consecuencia de la desorganización de la membrana nuclear interna, se produce una perturbación de la función mitocondrial, los cromosomas y el genoma se parten en trozos regulares (degradación del ADN internucleosomal en múltiplos de 180 pares de bases) y se forman vesículas con restos celulares denominadas cuerpos apoptóticos, por la acción de proteasas sobre proteínas citoesqueléticas, que tienen aspecto de "gotitas" que salen de la célula (de ahí que el aspecto característico de una célula apoptótica sea en forma de huella de oso), que son absorbidas rápidamente por las células vecinas (Rowe, 1994).

Desde el punto de vista morfológico (el más conocido) se observan cambios en serie y que siguen un patrón de comportamiento común:

1. El ADN del núcleo se condensa y divide en fragmentos que se unen a la membrana celular
2. Disminuye el volumen citoplasmático
3. El retículo endoplasmático se dilata mientras los otros organelos permanecen intactos
4. Se originan protuberancias en la superficie celular

5. La célula se fragmenta en múltiples vesículas rodeadas de membrana celular, conteniendo componentes citoplasmáticos y nucleares (cuerpos apoptóticos)
6. La membrana que rodea los restos celulares se mantiene intacta
7. Como no se vacía el contenido celular al espacio intersticial no se produce reacción inflamatoria
8. Los cuerpos apoptóticos son rápidamente reconocidos como anormales y fagocitados por macrófagos tisulares y por células parenquimatosas vecinas
9. El proceso es muy rápido y los cuerpos apoptóticos desaparecen en pocas horas: de 2 a 5 minutos se produce la condensación de la cromatina y la fragmentación, y la fagocitosis se completa en alrededor de 3 horas

La muerte celular programada es un mecanismo activo mediante el cual se salva la energía producida por la eliminación celular (bioenergía); las células dañadas subletales o no deseadas, son eliminadas y su preciado valor calórico es reutilizado por los macrófagos y/o por células vecinas, quienes han fagocitado los cuerpos apoptóticos.

La superficie celular, a pesar de adquirir un aspecto vesiculado, no se rompe, de modo que no se dispersan los productos tóxicos, no afectando a las células circundantes, que junto con los macrófagos pueden identificar a la célula moribunda e ingerirla gracias a la expresión de ciertas moléculas de su membrana, tanto los macrófagos como las células vecinas reconocerían a la célula apoptótica por la aparición de cambios en la superficie externa de la bicapa lipídica en la membrana (entre ellos, alteraciones en la asimetría de la membrana y exposición de fosfatidilserina) y por modificaciones en los carbohidratos y las proteínas de la superficie celular (éstos serían reconocidos por moléculas de la superficie externa de los macrófagos).

Los cambios bioquímicos son más precoces y no completamente conocidos. El primer cambio que se ha detectado hasta ahora es una modificación en el potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) que origina la liberación del citocromo C. La presencia de citocromo en el citosol activa a una familia de proteasas denominadas caspasas (*ICE: enzima convertidora-1beta de interleucina*). Estas enzimas actuarían como ejecutores iniciales de la apoptosis: su acción produce un corte de substratos celulares críticos, precipitando así los cambios morfológicos originados por el programa prediseñado de muerte (Cohen, 1996). También se activaría una endonucleasa nuclear endógena (Calcio y Magnesio dependiente) que cortaría en forma selectiva al ADN en sitios localizados entre unidades nucleosómicas, generando fragmentos de ADN mono y oligonucleosómicos (los nucleosomas son complejos de ADN e histonas, que constituyen las unidades empaquetadoras del ADN y están compuestos de una doble hélice de ADN enrollada en torno a 4 moléculas de histonas).

El estudio de la muerte celular utilizando modelos celulares y de desarrollo

La muerte celular, tanto en el desarrollo normal como en la proliferación o en la diferenciación, ha sido reconocida por la embriología durante décadas, pero recientemente gracias a la llegada al campo de la Biología Celular y Molecular ha sido posible examinar la señalización de las moléculas tanto en la célula como en la respuesta molecular a las señales de muerte. Cuando se presenta la muerte celular en el embrión, es importante para la salud del mismo que las células mueran de una forma controlada de modo tal que no produzcan efectos adversos como el resultado de la muerte. Esta muerte controlada ha sido referida con varios términos, tales como "muerte celular programada" (tanto tipo I como tipo II), "apoptosis"; y "muerte celular activa". La muerte celular programada (MCP) es comúnmente utilizada para describir cuando ocurre muerte celular en embriones en desarrollo y en metamorfosis en insectos. Esta es caracterizada por una secuencia predecible de pasos en células blanco que son activadas por estímulos hormonales o de desarrollo. El término MCP implica el control genético y la expresión diferencial de genes y ya sea uno u otro puede regular la activación y la progresión de la muerte celular o puede ser regulada por estos eventos. La morfología de la MCP puede ser descrita como tipo I –apoptósica– o como tipo II –lisosomal. Ambos tipos representan a la muerte celular controlada y no provocan ningún daño en las células vecinas. La MCP ha sido comparada con el término apoptosis o muerte celular tipo I, ya que abarca ambas morfologías (Zakeri 1995).

Muerte Celular Tipo I. La clásica apoptosis tipo I es una designación morfológica caracterizada por una rápida condensación del citoplasma y de la cromatina nuclear, resultando en la fragmentación del ADN lo que provoca que se presenten burbujas en la superficie celular. En algunos sistemas donde las células están en contacto, aparecen condensadas. La secuencia es seguida de la fragmentación de las células, fagocitosis, y una degradación lisosomal secundaria de fragmentos por células fagocíticas tales como macrófagos circulantes o células vecinas; mientras ocurre la fragmentación de las células apoptósicas se conserva la integridad de la membrana. La apoptosis es definida bioquímicamente como dependiente de la energía liberada por la doble ruptura de la cadena de ADN en las regiones de unión entre los nucleosomas (Trump BF and Berezsky IK, 1995)

Muerte Celular Tipo II. La muerte celular lisosomal o tipo II es reconocida por la formación primaria de lisosomas y posteriormente por la condensación y fragmentación del núcleo y del citoplasma; en este caso como en la muerte celular tipo I la membrana permanece intacta. La primera señal morfológica de este tipo de muerte puede ser una expansión del sistema lisosomal, mientras que el núcleo permanece imperturbado (Zakeri, 1995). Las vacuolas autofágicas pueden selectivamente remover los organelos celulares específicos tanto en tejidos en metamorfosis como en tejidos de insectos. La pérdida de la masa celular y la eventual fragmentación del citoplasma nos pueden ilustrar este caso, por ejemplo en el caso de los músculos de los insectos donde los cambios nucleares son mínimos hasta que el músculo se despolariza y se transforma en flácido o en no contráctil; otro ejemplo podría ser en la involución de la cola del renacuajo la cuál se pierde por la fragmentación de los músculos de la cola. Eventualmente el núcleo se condensa y se presenta la fragmentación pero esto no ocurre hasta que el volumen del citoplasma es disminuído.

En contraste con esta muerte celular fisiológica, la muerte celular por necrosis aparece cuando se produce un daño en la membrana celular iniciando con la pérdida de la integridad de la membrana y la célula queda fuera de control. La muerte celular por necrosis ha sido caracterizada por la desintegración de la célula, sin activar al sistema lisosomal y sin activar a las células vecinas, por lo que los fragmentos no son detectados (Zakeri, 1995). En la necrosis después de la desintegración de la membrana celular, la degradación de cromatina ocurre vía nucleasas que son enzimas similares al sistema lisosomal o a otras proteasas.

Presumiblemente la muerte celular por necrosis no es auto-regulada y no es sometida a un control genético, sino que se presenta por situaciones que provocan una exposición de las células a condiciones extremas de temperatura, pH, o concentraciones elevadas de agentes varios.

La muerte celular es lo que constituye la mayor parte del desarrollo en casi todos los órganos de los seres vivos, tanto en vertebrados como en invertebrados. La conservación evolucionario de este proceso sugiere que es tan importante la diferenciación celular como la división celular. La muerte celular durante el desarrollo es siempre aparentemente programada, en una serie de eventos que tienen lugar una vez que las señales de muerte se han iniciado. Una parte importante del programa de desarrollo es que la muerte celular ocurre durante la fase embrionaria de desarrollo y la interrupción de dicha muerte celular resulta en anomalías. Es importante contar con mecanismos de detección que identifiquen la presencia de apoptosis, especialmente al observar que se presentan diversas formas de muerte celular fisiológica. La presencia de mutaciones nos demuestra que las células tienen diferentes susceptibilidades a morir. Especialmente en la muerte celular del tipo II ocurren gran cantidad de cambios bioquímicos que preceden el colapso apoptótico, incluyendo la regulación de genes que juegan un papel crucial en la muerte celular. Finalmente, al extrapolar los mecanismos observados *in vivo* a los estudios *in vitro*, los estímulos y la cinética de las reacciones puede ser totalmente diferente a la realidad.

Propuesta genética de la Muerte Celular Programada en *Caenorhabditis elegans*

El ser humano adulto está formado por unos cien billones de células. Cada día, diez mil millones de estas células (una de cada diez mil) mueren y otras tantas nacen para reemplazarlas y mantener así la estructura y funcionamiento adecuado de los órganos y tejidos del organismo. Parece paradójico a primera vista que tan elevado número de muertes haya pasado inadvertido para la inmensa mayoría de los científicos hasta hace aproximadamente una década. La razón principal es que estas células se suicidan de forma discreta y sus cadáveres son rápidamente eliminados sin que queden rastros de la aparente masacre. La Academia Sueca ha querido premiar durante el año 2002 los estudios básicos, comenzados en el último cuarto del siglo XX, que permitieron descubrir la existencia en todas las células de los animales superiores, incluido el hombre, de un programa genético de muerte.

En el siglo XIX la muerte celular es reconocida como un programa integral que forma parte del desarrollo del organismo y que integra la base de la morfología de los seres vivos. En los 80's (Ellis and Horvitz, 1986), inician con la descripción de moléculas y mecanismos de la morfología

de la apoptosis al presentar sus trabajos sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* y desde entonces el conocimiento acerca del programa apoptótico se ha incrementado rápidamente y sigue incrementándose día a día; gracias a esto se han definido los mecanismos del proceso y a los jugadores clave; y dependiendo del tipo de célula en cuestión y del medio ambiente donde se encuentren se realiza un control sobre este programa por parte de los organismos, posteriormente emergen la cascada proteolítica (Vaux, D.L. et al., 1994) dirigida por las caspasas, luego el colapso en la mitocondria lo que marca "el punto del no retorno" y la superficie celular expone entonces la fosfatidilserina mientras que en el núcleo ocurre la fragmentación del ADN (Wyllie, A., 1998) aunque puede presentarse muerte celular sin que el núcleo se dañe y a esto se le llamaría epifenómeno en el cual podría existir una incorrecta interpretación en la muerte celular (Henkart, P., 1995).

En aquellos años nadie hubiera podido predecir que la respuesta a la pregunta **¿Por qué y cómo se mueren las células?** la proporcionará un nemátodo transparente de 1 mm de largo llamado *Caenorhabditis elegans*. La afortunada idea de utilizar a este nemátodo como modelo de experimentación se debe a Sidney Brenner, el más veterano de los galardonados y el único pionero de la biología molecular que, inexplicablemente, aún no había recibido el Nobel. John Sulston y Robert Horvitz, los otros premiados, fueron pioneros en utilizar este nemátodo para estudiar cómo a partir del óvulo fecundado se va construyendo un nemátodo completo mediante sucesivas divisiones celulares y la posterior diferenciación de las correspondientes células que formarán el sistema nervioso, el tubo digestivo, los músculos, etc.; esta investigación era factible porque el nemátodo adulto tiene tan sólo 959 células exactamente. Sin embargo, Sulston y Horvitz encontraron un hecho paradójico: durante las divisiones celulares necesarias para construir un nemátodo adulto se producían siempre 1090 células (Wu, D. et al., 1997).

¿Qué pasaba pues con las 131 células que se producían en exceso de forma reiterada? Para contestar a esta cuestión, Sulston y Horvitz inicialmente y más tarde el grupo fundado por Horvitz, comenzaron a analizar el desarrollo de nemátodos mutantes en los que el número de células que morían era superior o inferior al número de muertes en nemátodos normales. A partir de 1986, el grupo de Horvitz inició un estudio sistemático de todos los genes que aparecían alterados en estos mutantes (los llamó genes *ced*, por *C. elegans death* o genes de muerte de *C. elegans*). La búsqueda fue recompensada con la identificación de los genes *Ced-3* y *Ced-4*, que activaban el proceso de muerte celular y el gen *Ced-9*, que lo inhibía (Miura, M. and Yuan, J., 1996), y se encontró que para los mamíferos, la familia de las proteasas ICE humanas quienes cuenta por lo menos con seis miembros detectados son quienes activaban o inhibían el proceso de muerte celular: (Caspasa 9 = ICE, Caspasa 3 = CPP32, Caspasa 2 = ICH1, Caspasa 4 = ICH2, Caspasa 6 = MCH2 y Caspasa 5 = ICErel III), que parece pueden actuar individualmente, conjuntamente o sucesivamente, activarse e inhibirse (Chinnaiyan et al., 1996). No todas las células del organismo contarían con una dotación completa de caspasas (cistein proteasas) y su participación en el suicidio de las células dependería del tipo de población celular del que se trate. Todavía se ignoran sobre las proteasas gran cantidad de cosas: como por ejemplo qué proteínas segmentan, o si la destrucción de dichas proteínas forma parte directa del suicidio, o si las proteasas ICE son los instrumentos últimos de ejecución o ponen en marcha algún otro tipo desconocido de maquinaria letal, o si desempeñan alguna otra función en la célula.

En las células que han de sobrevivir, el gen *Ced-9* (que es homólogo a la familia del gen *Bcl-2*) se une al gen *Ced-4* y lo mantiene en una conformación inactiva, impidiendo por tanto la activación

de el pro gen Ced-3 mediado por el gen Ced-4 para que pueda convertirse en Ced-3. La capacidad de CED-9, CED-4 y CED-3 de formar un complejo multiproteínico ha conducido al modelo del "apoptosoma" en la regulación de la muerte celular en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Estudios genéticos han sugerido que Ced-9 controla la muerte celular programada al regular a Ced-3 y Ced-4 (Chinnaiyan et al., 1997), el mecanismo por el cual Ced-9 controla la actividad de Ced-4 y Ced-3 es pobremente entendido. Ced-4 aumenta la habilidad de Ced-3 de inducir apoptosis en células de mamíferos, y esta apoptosis inducida es inhibida por Ced-9 (Golstein, P. 1997). La actividad proapoptótica de Ced-4 requiere de la expresión de la proteasa funcional Ced-3 (Yuan, J.Y. and Horvitz, H.R. 1990). En forma significativa, cuando ocurre alguna mutación de Ced-4 y se pierde la función que tenía Ced-4, se deteriora la habilidad promotora de mediar la apoptosis por parte de Ced-3. La expresión de Ced-4 incrementa la activación proteolítica de Ced-3 mientras que Ced-9 inhibe la formación de p13 y p15 (dos productos de enlace de Ced-3 asociados con la activación proteolítica *in vivo*). Ced-9 inhibe la actividad enzimática de Ced-3 promovida por Ced-4. Así estos resultados muestran evidencia de que Ced-4 y Ced-9 regulan la actividad de Ced-3 y sus interacciones, las cuales pueden proveernos de las bases moleculares para el control de la muerte celular programada en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

La decisión de que una célula viviera o muriera estaba en manos de estos tres genes. Si una célula expresaba los tres genes sobrevivía, pero si no expresaba Ced-9 que es el gen inhibidor de la muerte, la célula se suicidaba, o como se suele decir en términos científicos entraba en apoptosis. Pero, **¿por qué no aparecían nunca los cadáveres de las células muertas?** Pues porque las células vecinas se comían rápidamente el cadáver, proceso que también está controlado genéticamente. Esta explicación la proporcionó Sulston al caracterizar otros mutantes *ced* en los que las células se morían pero los cadáveres se acumulaban.

Con toda la importancia fundamental que la apoptosis tiene para el desarrollo del nemátodo, este hallazgo probablemente no hubiera merecido un Nobel si la apoptosis hubiera sido importante sólo en los animales más sencillos. Sin embargo, en la primera mitad de la década de los noventa se descubrió que todos los mamíferos, incluido el hombre, poseen genes equivalentes a los que controlan la muerte de las células del nemátodo, por lo que la apoptosis parece ser un proceso biológico básico y universal. Por ejemplo, el homólogo del gen antiapoptótico Ced-9 se llama en el hombre Bcl-2 y es un oncogén, es decir, un gen implicado en el desarrollo del cáncer. Sabemos también ahora que en muchas enfermedades subyace un problema de mal funcionamiento de la apoptosis, o bien por defecto (cáncer, enfermedades autoinmunes), o bien por exceso (enfermedades neurodegenerativas, inmunodeficiencias, SIDA). Por ello me alegra de sobremanera del reconocimiento científico, a través de la concesión del premio Nobel a Robert Horvitz y sus colegas, de la enorme importancia que tiene la apoptosis para el desarrollo y la buena salud de los animales superiores.

Se ha descrito el parecido en la forma en que se activan al menos algunas de las caspasas de los mamíferos a como lo hacen Ced-3, Ced-4 y Ced-9 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Wang et al., 1994). La naturaleza molecular de dos de estos factores activadores de proteasas apoptótica o Apafs (*apoptotic protease activating factors*), encaja perfectamente dentro de esta idea: Apaf-3 ha resultado ser la caspasa-9, que tiene una estructura semejante a Ced-3 (estudios genéticos realizados en forma sistemática con *Caenorhabditis elegans* nos muestran evidencia directa entre los genes del nemátodo con las proteasas de los mamíferos). La caspasa 9 o ICE (enzima convertidora de interleucina-1B (IL-1B) una cistein proteasa responsable de convertir a la pro-IL-1B en una citocina activa) es identificada como el primer homólogo mamífero con Ced-3 (Yuan

et al., 1993) y Apaf-1 es el homólogo en mamíferos de la Ced-4 del nemátodo. Como cabía esperar de las semejanzas que sus secuencias tienen con la de sus homólogos vermiformes, Apaf-1 se une a Apaf-3 (caspasa-9) y promueve su activación proteolítica. Pero en este caso, a diferencia de lo que ocurre con Ced-4, Apaf-1 necesita un cofactor para unirse a la caspasa-9 y proceder a su activación. Este cofactor, el Apaf-2 ha resultado ser el citocromo C (Medema JP, 1999). El citocromo C juega un doble papel, primero como el Apaf-2 y segundo cuando la célula se suicida, ya que el citocromo C pasa de la mitocondria al citosol, y aquí ayuda a activar a las proteasas que provocan la muerte (llamadas caspasas); cómo es que el citocromo c escapa de la mitocondria al citoplasma no es aún definido con exactitud y es tema de debate, pero es claro que sin su presencia la célula cambia automáticamente su comportamiento ante el suicidio (Hengartner, 1998). La expresión de determinados genes (*ces-1* y *egl-1*, *reaper* y *hid*) suspenden la apoptosis en *Caenorhabditis elegans* y en *Drosophila melanogaster* (White et al., 1994). No sabemos aún como se da este proceso en las células de los mamíferos. En cambio se conocen varias situaciones que aumentan la probabilidad de suicidio celular. Cuando la célula pasa a recibir menos señales de supervivencia, disminuye la expresión de los genes inhibidores del suicidio, como el Bcl-2 cuyo homólogo en el nemátodo sería Ced-9 (Whyte M. and Evan, G. 1995). Los reguladores negativos del proceso son entonces Ced-9 para las células del *Caenorhabditis elegans* y Bcl-2 en la apoptosis de los mamíferos .

Cuadro 1. Las principales diferencias etiológicas y morfológicas entre necrosis y apoptosis

NECROSIS			APOPTOSIS		
Situaciones Patológicas			Situaciones Patológicas y Fisiológicas		
Eventos Nucleares	Eventos en Membrana Celular	Eventos en Citoplasma	Eventos Nucleares	Eventos en Membrana Celular	Eventos en Citoplasma
Vacuolización	La membrana celular es el blanco principal	Desintegración general	ADN nuclear es el blanco inicial	Retracción de la membrana celular en la etapa inicial	Reducción del volumen del citoplasma
			Migración de la cromatina		
Seguida de desintegración	Pierde integridad y provoca edema celular en la etapa inicial	Dilatación de los organelos	Condensación de la cromatina	Se forman burbujas	Los organelos permanecen intactos
		Rompimiento de los organelos	Condensación nuclear		Se fragmentan componentes en vesículas rodeadas de membranas
			Picnosis		
Se produce reacción inflamatoria			Los cuerpos apoptóticos son reconocidos como anormales y son fagocitados por los macrófagos y por las células parenquimatosas vecinas		

Cuadro 2. Estadios de la Oncosis de la Membrana que provocan cambios en los organelos al presentarse lesión celular (Majno & Joris, 1995)

Organelo	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4	Estadio 5	Estadio 6	Estadio 7
	Estado normal de la célula					Se observan rearrregios de las membranas intracelulares lo que provoca una vesiculación en la mitocondria y numerosas envolturas de las membranas	La fragmentación de los organelos es evidente al microscopio electrónico
Membrana Celular		Burbujas	Burbujas y distorsión de microvellosidades	Grandes burbujas e inicio de desprendimiento, marcada distorsión de las microvellosidades y desprendimiento de las burbujas formadas	Interrupción en la continuidad distorsión de las microvellosidades e inician formas de mielina		
Citosol		Burbujas y la célula se hincha	Burbujas, la célula se hincha, espaciamiento de polisomas	Igual	Igual		
Citosqueleto		Irregularidades en los filamentos de actina y tubulina	Desprendimiento de actina de plasma	Desaparecen todos los filamentos de actina y los contornos de tubulina; el compartimiento interno se observa hinchado	Muchos elementos no son visibles		
Mitocondria		Pérdidas de los gránulos normales intramitocóndrios	Condensación	El compartimiento interno se hincha	El compartimiento interno se observa hinchado con densas vellosidades y/o calcificaciones		
Retículo Endoplásmico/Aparato Golgi		Se dilata el retículo endoplásmico y los elementos de Golgi	Dilatación	Dilatación e inicio de la fragmentación	Fragmentación y formación de vesículas		
Lisosomas		Normal	Normal	Se hincha; se observa una clarificación de la matriz	Interrupción en la continuidad de la membrana		
Núcleo		Condensación de la cromatina a lo largo de la envoltura nuclear	Condensación de la cromatina a lo largo de la envoltura nuclear	Condensación de la cromatina a lo largo de la envoltura nuclear	Se inicia con la disolución de la cromatina condensada		

Capítulo 6



Bioquímica y señalización (caspasas y endonucleasas)

Mucho del conocimiento del control genético en la MCP se ha obtenido del estudio del *Caenorhabditis elegans*. Durante su desarrollo hermafrodita, 131 de sus células son eliminadas selectivamente por MCP. Dos genes son esenciales en la ejecución de la muerte celular (Ced-3 y Ced-4), por lo que la pérdida de la función o la mutación de cualquiera de estos dos genes altera su programa de desarrollo por la supresión de la MCP. Ced-4 codifica una proteína de 549 aminoácidos la cuál se une y activa a Ced-3 (Chinnaiyan et al., 1997; Irmiler M et al., 1997). Recientemente un homólogo en mamíferos de Ced-4, Apaf-1 ha sido identificado (Zou H, 1997). En contraste, Ced-3 codifica una proteína de 503 aminoácidos rica en serina en su región media (Yuan et al., 1993).

Un importante indicio de la función de Ced-3 viene de la observación de una proteína homóloga que codifica en mamíferos y que es la enzima 1 β convertidora de interleucina (ICE), una cistein proteasa que rompe la pro-1 β -interleucina (pro-IL-1 β) entre los residuos Asp116 y Ala 117 generando una citocina madura (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992; Yuan et al., 1993). Por lo que ICE humana y Ced-3 son idénticas en un 29% y estas similitudes implican a la cistein proteasa en la ejecución de la MCP en organismos diversos (desde nemátodos hasta humanos) y esto sugiere que el aparato de la muerte celular ha sido notablemente conservado a lo largo de la evolución (Steller H, 1995). El rápido crecimiento de la familia de las proteasas les ha dado el nombre de "caspasas" (cistein proteasas con substratos específicos de ácido aspártico) (Alnemri et al., 1996).

A lo largo de este capítulo me enfocaré (1) en los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la oncosis y de la necrosis y (2) en homologar la terminología que utilizaré a lo largo de esta revisión; para posteriormente revisar (1) las características estructurales y enzimáticas de las proteasas en los mamíferos, (2) la evidencia de que las caspasas juegan un papel crítico en la apoptosis de los mamíferos, (3) las implicaciones clínicas relacionadas con las enfermedades más importantes de hoy en día en humanos y (4) la actividad de las endonucleasas en la apoptosis.

Cambios pre-letales en las células

Oncosis. El término oncosis se deriva de la palabra griega *oncos* que significa hinchado, y se refiere a que las células se hinchan como respuesta inmediata ante la presencia de alguna lesión. La oncosis comúnmente se presenta posterior a lesiones provocadas por toxinas e isquemia (tanto *in vivo* como *in vitro*) porque muchas de estas lesiones interfieren con la síntesis de ATP y así destruyen el control del medio ambiente interior de la célula al destruir el control de la membrana celular. Al faltar ATP y/o al perder su integridad la membrana celular el equilibrio iónico de la célula se pierde.

Apoptosis. El término apoptosis se refiere a un tipo de cambio pre-letal que involucra la contracción y la fragmentación celular (Kerr et al., 1972). *In vivo* se desprenden fragmentos que son fagocitados por células adyacentes parenquimatosas antes de que la muerte provoque la liberación de fragmentos celulares al espacio extra celular. Y estos fragmentos, en contraste con las células que experimentan oncosis, experimentan cambios necróticos sin la presencia del sistema fagolisosomal o las células encargadas de la fagocitosis.

Necrosis. El término necrosis se refiere a los cambios que ocurren después de la muerte de la célula.

Concepto de Muerte Celular Programada (MCP). El concepto de muerte celular "programada" es usado como un principio predecible de que la célula morirá durante la remodelación de tejidos durante el desarrollo o en la metamorfosis. Inicialmente se relaciona con cambios en niveles de hormonas y con el retiro del factor de crecimiento, sin embargo no se refiere a todos los tipos de cambios pre-letales o post-letales (necróticos). Desafortunadamente, en toda la literatura disponible la MCP equivale a apoptosis, sin embargo no siempre, el tipo de cambio pre-letal es observado durante la muerte celular embriológica. Cuando se presenta apoptosis, inicialmente se requiere de la síntesis de nuevas proteínas; tanto apoptosis como oncosis pueden ser inducidas por lesiones externas incluyendo toxinas del medio ambiente o agentes terapéuticos, y varios estudios han establecido claramente que las células están programadas para morir; pero esto también significa que las células poseen mecanismos enzimáticos de señalación que disparan el programa de muerte celular ante lesiones específicas y este proceso puede o no requerir de síntesis de nuevas proteínas, y en el caso de las principales enfermedades en humanos, lo más común es que no lo requieran.

Diferencias entre Oncosis y Apoptosis. Las diferencias involucran de un modo u otro, una lesión primaria o secundaria que interfiera con la síntesis de ATP y/o con la regulación del sodio celular. En el caso de oncosis es típico que no se origine ATP y que se incremente el sodio celular por lo que la célula se hincha, perdiéndose el control de la membrana celular. Por otro lado en el caso de apoptosis la célula se contrae. ¿Por qué pasa esto? ¿Por qué ambos modelos presentan diferentes características en la fase pre-letal? ¿Por qué ambos modelos son similares después de la muerte celular (durante la fase necrótica)? Adicionalmente, ¿qué genes son activados por la muerte celular en ambos modelos? y ¿cuál es su señalación respectiva? Lo que podemos definir por el momento es que (1) el metabolismo juega un papel crítico ya que regula el estado energético de la célula y (2) que el intercambio iónico de la célula juega un papel crítico y que este punto depende de la integridad de la membrana celular.

Los 7 estadios de la Oncosis. Hace algunos años, se empezó a investigar la caracterización de los cambios morfológicos observados, tanto los reversibles como los irreversibles sub-siguientes a la lesión pre-letal y/o letal en una gran variedad de sistemas celulares, y basándome en esas observaciones clasificaré los cambios en - estadios- de lesión celular, correlacionándolos con su estructura y función tratando de comparar las diferentes lesiones que se pueden presentar. Los principales estadios de la oncosis que provocan cambios en los organelos los podremos observar en el **cuadro 2**.

Terminología y Conceptos. Mecanismos de oncosis que inician con la muerte celular

Regulación del volumen celular alterado. Es característico de la oncosis que la célula pierda rápidamente su volumen celular. El incremento en las concentraciones de sodio, cloro y agua dentro de la célula acompañado del decremento de potasio inician con un hinchamiento de la célula y éste no es uniforme, por lo que algunos compartimientos como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi experimentan una temprana dilatación en el citosol, mientras que en otros organelos se observa una contracción como en el caso del compartimiento interno de la mitocondria. En paralelo con estos cambios, sobreviene un incremento en la concentración de calcio –tanto en el espacio extracelular como en los compartimientos intracelulares del retículo endoplásmico y de la mitocondria- y este incremento resulta tanto de la disminución de las concentraciones de ATP como de la disminución del intercambio iónico de sodio y potasio, lo que resulta en un incremento de las concentraciones intracelulares de sodio. Durante la fase de hinchamiento celular *apriori* al “punto del no retorno”, estas concentraciones alteradas de calcio afectan la organización de la actina y de otros elementos del citoesqueleto, por lo que se forman burbujas citoplasmáticas, las cuales se observan en el microscopio electrónico extendiendo y retrayendo continuamente la superficie celular (Negulyaev et al., 1996).

Regulación del calcio alterado. Un desequilibrio en las concentraciones de calcio intracelular aparece como un proceso crítico en los eventos que se derivan de una lesión que provoca muerte celular y esto se demuestra cuando se tratan células con ionóferos de calcio, pudiéndose replicar todos los estados de la oncosis desde la lesión hasta la muerte (Smith et al., 1992). Dependiendo de la naturaleza de la lesión inicial, el incremento en la concentración de calcio puede resultar tanto en el interior de la célula como en el espacio extracelular o en ambos, y esto provoca un daño en la integridad de la membrana celular al activarse algunos componentes del complemento (C5b-9). En la oncosis cuando hay ausencia de ATP y se daña la integridad de la membrana celular, el proceso no puede llevar el paso del incremento del volumen celular y por otro lado, cuando el ATP se encuentra presente en la apoptosis, el calcio intracelular estimula una contracción celular extrema (Zakeri et al., 1993)

Metabolismo de la energía alterada. La reducción de las concentraciones de ATP y la inhibición de la síntesis del ATP son condiciones típicas que inician con la oncosis. El mantenimiento de las concentraciones del ATP es una característica que distingue a la oncosis de la apoptosis, y se ve reflejado con la pérdida del control del volumen y la consiguiente hinchazón de la célula. Una disminución de la concentración de ATP puede resultar de una inhibición primaria de la respiración mitocondrial o fosforilación oxidativa provocada por isquemia, anoxia o inhibidores respiratorios como son cianuro, monóxido de carbono y bloqueadores de la fosforilación oxidativa como el 2,4-dinitrofenol. La inhibición de la síntesis de ATP puede resultar secundaria de la acción de toxinas y agentes que modifican la permeabilidad de la membrana celular, así como la activación del complemento o la inserción de poros como en el caso de las porinas bacterianas que actúan en la membrana celular y que en conjunto con los ionóferos de calcio provocan un rápido incremento en las concentraciones de calcio y por tanto un bloqueo a nivel

mitocondrial. La mitocondria provee uno de los marcadores más confiables de que las células han pasado por el "punto del no retorno" y este es llamado "densidad floculenta" y se observa con el microscopio electrónico en el interior del compartimiento de la matriz; esta densidad floculenta representa una aparente pérdida de la función de la membrana mitocondrial ya que se desnaturalizan las proteínas de la matriz mitocondrial y de la membrana mitocondrial.

Desnaturalización de proteínas. La desnaturalización de proteínas inicia durante el proceso de oncosis y es detectado rápidamente por la microscopía electrónica antes de presentarse el "punto del no retorno". La mayoría de las proteínas que son degradadas en el citosol son liberadas a grandes complejos denominados proteosomas y éstos, pueden estar relacionados con la remodelación de la célula durante la fase pre-letal. En algunos tipos de lesión, los proteosomas son removidos del núcleo y son acumulados en vesículas en la periferia de la célula (este fenómeno ha sido relacionado con la apoptosis y podría también jugar un papel preponderante en el proceso de la oncosis).

Activación de enzimas hidrolíticas. La activación de las enzimas hidrolíticas ha sido asociado durante décadas con la necrosis, y es obvio que involucra la conversión de células muertas en desechos necróticos. Aquí hablaré de la hipótesis de la bolsa, la cual involucra a los lisosomas, quienes liberan a las hidrolasas *a priori* a la muerte celular y éstas son las responsables de que las células mueran (esta hipótesis no tiene el suficiente soporte). El papel de las hidrolasas durante la fase pre-letal y su papel en la fase ejecutora han estimulado un gran número de estudios en este proceso de muerte (Chinnaiyan & Dixit, 1996).

Cistein proteasas y familia ICE. Estas proteasas son llamadas "caspasas" y deben su nombre al rápido crecimiento que ha tenido la familia de las proteasas (cistein proteasas con substratos específicos de ácido aspártico) (Alnemri et al., 1996). Más adelante me enfocaré en (1) las características estructurales y enzimáticas de las proteasas en los mamíferos, (2) la evidencia de que las caspasas juegan un papel crítico en la apoptosis de los mamíferos, y (3) las implicaciones clínicas relacionadas con las enfermedades más importantes de hoy en día en humanos.

Calpains. Las calpains son proteasas activadas por calcio y juegan un papel importante en una variedad de funciones celulares, incluyendo reacciones células a lesiones letales. La importancia relativa de las calpains *versus* la familia de las proteasas (ICE) se encuentra bajo rigurosos estudios en varios laboratorios (Cohen & Duke, 1984; Trump & Berezsky 1995).

Proteasas lisosomales. Posterior a la lesión, se presenta una proteólisis considerable debida a una autofagocitosis, la cuál se lleva a cabo en los compartimentos lisosomales. Los lisosomas se vuelven más frágiles durante la oncosis, y existe aquí la posibilidad de que escapen al citosol, y debido al bajo pH que se presenta en esta fase, tengan acceso a todas las membranas intracelulares y a otros substratos.

Nucleasas. Se trata de enzimas hidrolíticas que se encuentran en los lisosomas. DNAsas y RNAsas son importantes en determinados eventos tanto de la oncosis como de la apoptosis. En la oncosis, la condensación de cromatina inicia relativamente tarde y cuando llega al "punto del no retorno" la cromatina se fragmenta y se observa lisis antes que se observe el patrón visto en la apoptosis. La hidrólisis de ARN debe de llevarse a cabo aproximadamente al mismo tiempo, por lo que las hidrolasas lisosomales y las nucleasas pueden ser muy importantes en la fase que sigue al daño irreversible. Recientemente se ha estudiado el papel de las endonucleasas

en lesiones como hipoxia, la cuál es asociada normalmente con la inducción de oncosis (Ueda et al., 1995).

Fosfolipasas. Se trata de enzimas hidrolíticas que se encuentran en los lisosomas. La activación de las fosfolipasas es crítica en el desarrollo de oncosis y de necrosis. De tal forma que la lipasa C es importante en la señalización temprana de respuestas. Inmediatamente después de que se presenta la lesión, la fosfolipasa C activa la liberación de calcio del retículo endoplásmico mientras que la fosfolipasa A2 se encarga de determinar si la degradación de las membranas intracelulares será reversible o irreversible.

Caminos de señalización. Un gran número de genes que incluyen entre otros a: c-fos, c-jun, y c-myc, son rápidamente inducidos en las fases tempranas de la oncosis, una vez que se han presentado lesiones letales como estrés oxidativo y cloruro de mercurio (Maki et al., 1992) y el papel exacto que juegan estos genes en este proceso aún no es entendido con claridad.

Activación del gen p53. Cuando el ADN de una célula es dañado por alguna lesión inducida por una gran variedad de agentes o por hipoxia, el gen p53 quien es un potente efector de muerte celular se activa, actuando por mecanismos no del todo conocidos e induciendo muerte celular (Hollstein M et al., 1991; Bishop J, 1987; Matlashewsky G, et al., 1984). La sobreexpresión del gen p53 comúnmente resulta en apoptosis, mientras que la relación que guarda con la oncosis aún no está clara del todo. El gen p53 fosforilado actúa como un transactivador de otros genes como son Bax, Gadd45, Waf, p21 y otros; p53 puede interactuar directamente entre las proteínas por caminos de señalización aún desconocidos. Las mutaciones en p53 resultan en la modificación de los caminos de señalización de este efector de la muerte celular, y así, la mutación más frecuente observada en cáncer humano se relaciona con la progresión de cáncer debido a la eliminación de la la respuesta de la muerte celular programada.

Algunos estudios indican que el gen Bax es la respuesta primaria a la presencia del gen p53; Bax es parte de la familia Bcl-2 y este gen puede actuar ya sea como efector o también como supresor de la muerte celular. Según el trabajo realizado por Knudson donde expone a ratones de experimentación al contacto con Bax, exhibe aberraciones importantes en la muerte celular, involucrando tanto a linfocitos B como a timocitos, provocando una hiperplasia (Knudson et al., 1995). El mecanismo por el cual Bax participa en la mediación de la muerte celular no es del todo conocido y no se sabe cómo se relaciona con la oncosis ni tampoco cómo se opone a la apoptosis. De hecho, ya que el mecanismo de acción de Bax es opuesto al de Bcl-2, y ya que Bcl-2 protege de la oncosis y de la apoptosis, se piensa que p53 induce a Bax en ambos modos de muerte celular.

Se sabe que la hipoxia induce tanto oncosis como apoptosis, sin embargo la hipoxia también tiene relación con el p53, me he encontrado con el trabajo de Graeber el cuál se enfoca en que al presentarse hipoxia, puede incrementarse la expresión de p53 (Graeber et al., 1994). El oxígeno puede ser necesario en forma de peroxinitrito y óxido nítrico (NO), y existen evidencias que nos indican que el NO puede ser formado durante la hipoxia si citocinas particulares como es el caso de TNF α está presente. Es claro que el NO puede inducir a p53, y puede provocar la disminución de la regulación de la expresión de la enzima oxidonítrico sintasa (NOS₂) al inhibir al promotor NOS₂ (Forrester et al., 1996). Esta relación entre NO, hipoxia y la expresión de p53 invitan al análisis y a la investigación.

Estrés en genes. La rápida inducción de estrés en genes acompaña a la oncosis una vez que se ha presentado la lesión. Esta inducción es dependiente de calcio y es presumiblemente realizada por la fosforilación de un factor de transcripción.

Citoesqueleto. Es un sistema de filamentos del citoplasma de las células eucariotas que proporciona a la célula forma y capacidad de realizar movimientos dirigidos. Sus componentes más abundantes son los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Participa activamente en el proceso de oncosis y necrosis ya que juega un papel importante en los cambios de la forma celular y en los cambios del transporte iónico que ocurren durante la fase de hinchamiento de la célula, y dichos cambios pueden tener implicaciones en la señalización de genes que son inducidos en las fases tempranas de la oncosis.

Actina. Es una abundante proteína que forma filamentos en todas las células del citoesqueleto. La forma monomérica a veces se denomina globular o actina G; la forma polimérica es filamentososa o actina F. Posterior a las lesiones que derivan en oncosis tales como la isquemia química, se observan cambios en el patrón de los filamentos de actina que se mezclan con el medio, en esta fase el citoplasma forma burbujas y una banda de actina frecuentemente es encontrada en la base de estas burbujas que se relacionan con el incremento de la concentración de calcio; la regulación de la concentración del calcio está relacionada con la modificación de la actina; los cambios en la actina se demoran una vez que se ha presentado una lesión, y si realizáramos un experimento en un medio libre de calcio, esto implicaría la probabilidad de que el calcio libre y el calcio unido a proteínas se involucre en este proceso. Por otro lado la actina participa en la regulación del volumen celular a través del control de los canales de sodio, y si se mantienen abiertos se provocaría la degradación de la actina por proteasas activadas por calcio lo que podría contribuir al hinchamiento celular que ocurre en la oncosis temprana.

Tubulina. Los microtúbulos son polímeros largos y rígidos que se extienden a través del citoplasma y dirigen la localización de los orgánulos delimitados de membrana y de otros componentes celulares. Los microtúbulos son cilindros huecos formados por tubulina, y cada molécula de tubulina es un heterodímero formado por dos subunidades globulares fuertemente unidas entre sí. La desestabilización de los microtúbulos ocurre durante la oncosis mientras que la modificación química de la tubulina induce a la formación de burbujas en el citoplasma. Tanto la tubulina como la actina pueden estar involucradas en la formación de burbujas. Estos cambios también se correlacionan con el incremento de la concentración de calcio, la cuál ocurre al mismo tiempo. Un vínculo entre la integridad de los microtúbulos y la función de Bcl-2 ha sido recientemente propuesta (Haldar et al., 1997), aquí se reporta la modificación de los microtúbulos por taxol y vinblastina (ambos son tratamientos para el cáncer humano), induciendo la fosforilación de Bcl-2 y por ende la pérdida de su función.

Filamentos intermedios. El papel específico que juegan los filamentos intermedios y los cambios que provocan durante la oncosis y necrosis no han sido definidos aún. Estos polímeros persisten en las células después de que éstas han recibido severos tratamientos, y algunos estudios muestran que los neurofilamentos pueden ser un sustrato importante para algunas proteasas (calpains).

Agentes y productos de genes que protegen contra la muerte celular (Bcl-2). Ya he mencionado que al estudiar al nemátodo *C. elegans* se observó al gen Ced-9 el cuál es un gen represor de muerte celular; investigaciones realizadas en mamíferos encontraron a su homólogo que es gen Bcl-2 y cuya expresión resulta en la protección contra una gran variedad de lesiones que podrían resultar en muerte celular, incluyendo tanto la iniciación de la oncosis como la iniciación de la apoptosis. El mecanismo de acción de Bcl-2 se encuentra actualmente bajo intensa investigación; el gen Bcl-2 se encuentra localizado en la membrana exterior de la mitocondria, en las membranas del retículo endoplasmático y en el exterior de la membrana nuclear. La relación que tiene el gen Bcl-2 con la regulación del calcio ha sido enfatizada en varios estudios, en los cuales Bcl-2 puede controlar la liberación del calcio del retículo endoplasmático y puede regular la concentración de calcio en la mitocondria al proteger el potencial transmembranal de la misma. El rango de lesiones letales que protege Bcl-2 es amplio e incluye a p53, dexametasona, la apoptosis inducida en linfocitos por cianuro, oncosis inducida por estrés y oxidantes y muchas otras lesiones más.

pH bajo. La reducción del pH extracelular puede modificar el daño a la membrana y ayudar en el control de la muerte celular en conjunto con el uso de LDH (Pentilla and Trump, 1974). Esta protección ha sido observada después de lesiones provocadas por metales, anoxia, isquemia, calor y otros. Los mecanismos involucrados en este efecto, por un lado reducen el incremento en la concentración de calcio protegiendo y previniendo de la muerte celular y por otro inhiben el intercambio de sodio y calcio con lo que probablemente se inactiven las enzimas hidrolíticas que participan en la muerte celular como las fosfolipasas o las proteasas.

Hipotermia. La hipotermia es un método antiguo que ha sido utilizado para prevenir la necrosis y la subsecuente deterioración e hidrólisis de las estructuras celulares. Es conocido por todos que el mantenimiento de órganos para los trasplantes es realizado a bajas temperaturas ya que la hipotermia retarda el proceso de necrosis promoviendo el proceso de oncosis

Inhibidores de las fosfolipasas. Las fosfolipasas juegan un papel importante en el proceso de la muerte celular, especialmente la fosfolipasa A2 en la iniciación de la oncosis y de la necrosis. La activación de esta enzima conduce a un incremento de la concentración de calcio en el citosol y el calcio es utilizado de una forma incluso más general que el AMP cíclico, como mediador intracelular. Los inhibidores de la fosfolipasa pueden modificar el curso de la lesión celular al eliminar la muerte celular y dichas sustancias incluyen a la dibucaína, mepacrina, clorpromazina y algunas otras.

Inhibidores de las proteasas. Una gran variedad de inhibidores de las proteasas, tanto lisosomales como no lisosomales han sido utilizados en intentos para modificar la lesión de las células y prevenir de este modo la muerte celular; el desarrollo de inhibidores permanentes de proteasas en la célula podría resultar en el desarrollo de agentes farmacéuticos que modificarán y previnieran la progresión de la muerte celular (Cryns and Yuan, 1996). La posible utilización de inhibidores de caspasas para prevenir la muerte celular actualmente se encuentra bajo rigurosa investigación y de hecho los posibles efectos protectores de Bcl-2 contra la actividad de las caspasas podrían ser algunos de los múltiples roles de dicho gen.

Inhibidores de las nucleasas. Es interesante estudiar el efecto protector de los inhibidores de las nucleasas -como el ácido auritricarboxílico, el azul de Evans y el zinc- que previenen el rompimiento de las cadenas de ADN y por ende la muerte celular (Ueda et al., 1995); efectos similares fueron encontrados al tratar ADN dañado inducido por tratamiento con micrococcal. La activación de las endonucleasas ocurre como un evento temprano iniciando un daño al ADN lo que no requiere de síntesis de proteínas.

Aminoácidos. La glicina y algunos otros aminoácidos protegen contra una gran variedad de lesiones letales que inician con oncosis y/o necrosis en el túbulo renal proximal de los riñones y en el epitelio del hígado. La glicina puede permitir la sobrevivencia de células con altas concentraciones de calcio y con el ATP suprimido. El mecanismo de acción molecular de protección de la glicina no está completamente entendido.

Lesión celular. La lesión celular inicia con la oncosis, posteriormente con la muerte celular y por último con la necrosis, y en ella juega un papel importantísimo la desregulación del calcio. Los eventos producidos por la lesión, inician con la oncosis al interferirse la síntesis del ATP, al modificarse la permeabilidad de la membrana celular alterándose con esto el sistema de transporte e intercambio iónico y al redistribuirse calcio en los reservorios intracelulares como la mitocondria y el retículo endoplasmático. La depleción del ATP resulta en un aumento de la concentración de sodio y de calcio y en una disminución de la concentración de potasio; concomitantemente entra cloro a la célula y se incrementa la concentración de sodio lo que resulta en una disminución del intercambio entre sodio y calcio, lo que provoca se incremente la concentración de calcio al activar la bomba correspondiente; la deficiencia de ATP y el incremento en el daño de la membrana celular incrementa el volumen intracelular y se produce un hinchamiento de la célula y con esto se extiende la membrana celular y se incrementa el flujo de iones a través de ella.

Se presentan entonces consecuencias inmediatas derivadas del aumento sostenido de la concentración de calcio dentro de la célula que incluyen la activación de proteasas, fosfolipasas y nucleasas; se presentan burbujas citoplasmáticas que aparecen como resultado de la activación de las proteasas por el calcio, modificando el citoesqueleto de la célula, particularmente el vinculado con la actina. Los inhibidores de calpains disminuyen de manera importante las burbujas citoplasmáticas y retardan de forma general el proceso ya que son proteasas cuyo sustrato es el calcio (Cryns and Yuan, 1996).

Después de la lesión se incrementan los efectos del calcio, incrementando importantemente la actividad de las fosfolipasas, la mitocondria pasa de un estado condensado a una conformación hinchada (turgente), lo que provoca que se pierda el control de la fosforilación oxidativa, también que se active la permeabilidad de la membrana mitocondrial y que se libere cardiolipina de la membrana interna de la mitocondria. La desregulación de calcio también provoca la activación de una gran variedad de genes y de citocinas dentro de los que se encuentran c-fos, c-jun y c-myc con la posterior activación de las proteincinasas.

La activación de p53 también ocurre durante la oncosis, posterior a la presencia de una gran variedad de lesiones como hipoxia e irradiación; el incremento de p53 activa a otros genes que incluyen a Bax, Gadd45 y p21(waf); de estos genes sólo Bax se ve directamente involucrado en la progresión de muerte celular mientras que los otros se asocian con impedir el desarrollo del

ciclo celular. Los efectos de Bax son contrarrestados por los efectos protectores del gen Bcl-2, y dichos efectos son el de inhibir la actividad de las proteasas, modificar la permeabilidad de iones de la membrana celular especialmente de calcio. Estas acciones fundamentales de Bcl-2 pueden provocar ya sea la muerte celular o la sobrevivencia celular. Los eventos terminales involucran a procesos que destruyen la función de la célula no permitiéndole alcanzar un estado de homeostasis; esto involucra la coordinación de las fosfolipasas activas y de las proteasas, y la interferencia de éstas seguramente constituye el programa controlado de la muerte celular.

El seguimiento de los elusivos mecanismos de la muerte celular es fundamental para desarrollar una terapéutica dentro de la práctica médica con fines preventivos. Hasta el momento me he enfocado en los cambios preletales conocidos como oncosis los cuales contrastan con la apoptosis; ambos términos representan algún tipo de lesión celular *in vivo*; y frecuentemente se presentan juntos, la oncosis en la parte central de la lesión y la apoptosis en la periferia.

Características estructurales y enzimáticas de las caspasas en los mamíferos

Desde la identificación de ICE (caspasa 1) que es para los mamíferos un homólogo de Ced-3, varios miembros adicionales de la familia de las caspasas han sido subsecuentemente clonados: Nedd2/Ich-1 (caspasa 2) (Wang et al., 1994), CPP32/Yama/Apopain (caspasa 3) (Fernandes-Alnemri et al., 1994; Nicholson et al., 1995), ICH-2/TX/ICE rel-II (caspasa 4) (Faucheu et al., 1995; Kamens et al., 1995; Munday et al., 1995), ICE rel-III/TY (caspasa 5) (Munday et al., 1995), Mch2 (caspasa 6) (Fernandes-Alnemri et al., 1995), Mch3/ICE-LAP3/CMH-1 (caspasa 7) (Fernandes-Alnemri et al., 1995; Duan et al., 1996; Lippke et al., 1996), MACH/FLICE/Mch5 (caspasa 8) (Boldin et al., 1996), ICE-LAP6/Mch6 (caspasa 9) (Duan et al., 1996; Srinavasula et al., 1996), Mch4/FLICE2 (caspasa 10) (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Vincenz and Dixit, 1997), y Ich-3 (caspasa 11) (Wang et al., 1996). Basado en su secuencia de aminoácidos, las caspasas de los mamíferos pueden ser clasificadas en tres subfamilias: la subfamilia de caspasas 1 que incluye a: caspasa 1, caspasa 4, caspasa 5 y caspasa 11; la subfamilia de caspasas 2 que incluye a: caspasa 2, caspasa 9 y caspasa 10; y la subfamilia de caspasas 3 que incluye a: caspasa 3, caspasa 6, caspasa 7 y caspasa 8 (Duan et al., 1996ab; Alnemri et al., 1996).

Los miembros de la familia de las caspasas están caracterizados por tener propiedades funcionales y estructuras clave. Normalmente están presentes en las células como proenzimas inactivas que se activan por el rompimiento proteolítico en los residuos Asp, removiendo el N-terminal y activando a las proteasas, generando dos sub-unidades de heterodímeros, una grande y una pequeña que forman parte estructural de las caspasas (Walker et al., 1994, Wilson et al., 1994). Por otra parte, todas las caspasas comparten la especificidad por un sustrato inusual: cortan las cadenas polipeptídicas entre el N-terminal del residuo Asp (sitio P1) y el C-terminal del aminoácido hidrofóbico (sitio P1') (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992). Este sustrato Asp específicamente, ha sido reportado sólo en otra proteasa, la granzyma B, implicada en la actividad independiente de Fas en los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Shi et al., 1992; Berke, 1995). Todas estas características sugieren que la activación proteolítica *in vivo* de las caspasas puede ser consumada por autoproteólisis y/o por la elaboración de materias primas por otras caspasas

(y/o granzyma B); ambos mecanismos han sido demostrados *in vitro* (Fraser and Evan 1996). La comprensión del mecanismo catalítico de estas proteasas proviene del estudio estructural de la caspasa 1 mediante el uso de rayos X (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994; Nicholson, 1996). En adición a este sitio activo Cys-285, otros dos residuos son esenciales para la actividad catalítica: His-237 y Gly-238 (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994). Estos tres residuos se presentan en todas las caspasas conocidas hasta el momento, lo que indica que todas las caspasas tienen mecanismos catalíticos similares (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994). Las caspasas difieren significativamente tanto en la especificidad de los substratos como en la longitud y en la composición de los N-terminales de los pro-dominios.

Un exceso en la expresión de las caspasas induce MCP; más allá de las similitudes funcionales y estructurales existentes entre el gen Ced-3 del nemátodo *C. elegans*, varias líneas de evidencia indican que los homólogos en mamíferos de Ced-3 juegan un papel análogo en la ejecución de apoptosis en organismos complejos. Inicialmente la expresión transitoria de las caspasas en ADNc induce rasgos biológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis como por ejemplo, condensación nuclear y condensación celular y fragmentación del ADN internucleosomal tanto en mamíferos (Miura et al., 1993; Wang et al., 1994; Faucheu et al., 1995; Munday et al., 1995; Boldin et al., 1996; Duan et al., 1996ab; Lippke et al., 1996; Muzio et al., 1996; Wang et al., 1996) como en células de insectos (Fernandes-Alnemri et al., 1994, 1995ab). La inducción de apoptosis en estos sistemas requiere de que la cistein proteasa se active; ya sea construyendo puntos de mutación (en el residuo catalítico Cys o en el residuo cercano Gly), o porque no contenga las dos subunidades estructurales (una grande y una pequeña) y no sea capaz por tanto de inducir muerte celular (Miura et al., 1993; Fernandes-Alnemri et al., 1994, 1995ab; Wang et al., 1994; Faucheu et al., 1995; Kamens et al., 1995; Boldin et al., 1996; Duan et al., 1996ab; Lippke et al., 1996). Un exceso en la expresión de Ced-3 en líneas de células de mamíferos puede resultar en muerte celular programada, aunque es menos eficiente que su homólogo en mamíferos (Miura et al., 1993), por lo que es importante subrayar que el concepto de maquinaria de muerte celular ha sido conservado a través de la evolución (Ameisen JC, 1996). La apoptosis inducida por una sobre expresión de estas proteasas puede ser inhibida por Bcl-2, el homólogo en mamíferos al gen Ced-9 del nemátodo *C. elegans* (chinnaiyan et al., 1996a). La relevancia fisiológica de estos estudios se ve opacada por el descubrimiento de que la sobre expresión de una variedad de proteasas no específicas, puede inducir apoptosis (Williams and Henkart, 1994; Fraser and Evan, 1996). Más allá de la evidencia de que las caspasas juegan un papel crítico en la apoptosis se ha observado que estas proteasas son activadas y procesadas proteolíticamente durante la muerte celular (Boudreau et al., 1995; Armstrong et al., 1996).

La evidencia directa de la activación de la cascada proteolítica de las caspasas proviene de un estudio en el cuál utilizaron un sistema de células libres para estudiar los eventos proteolíticos durante la apoptosis mediada por Fas (Enari et al., 1996). Ellos demostraron que la caspasa 1 fue activada rápidamente, mientras que la caspasa 3 fue activada con mucho mayor lentitud, además de que requiere de la activación *a priori* de la caspasa 1. Los resultados de este experimento indican que la caspasa 1 es la responsable de activar a la caspasa 3 durante la ejecución de apoptosis inducida por Fas. Una vez que la caspasa 3 ha sido activada, la caspasa 1 ya no es necesaria para la muerte celular.

Recientemente se ha identificado el inicio de la cascada proteolítica de las caspasas; ésta comienza por el ligando Fas y por el TNF- α . Los receptores respectivos para Fas: APO-1/CD95 y

para TNFR1: p55, son miembros de la familia del receptor TNF/NGF y contienen una región citoplasmática (llamada "dominio de muerte") que es necesaria para inducir muerte celular (Nagata and Golstein, 1995). Las caspasas definitivamente activan a estos receptores dando la señal para que inicie el proceso de muerte. Los sustratos de las caspasas no son conocidos del todo y pueden incluir a una o a más miembros de la familia de las caspasas. La caspasa 10 por ejemplo puede activar a la caspasa 3 o a la caspasa 7 (Fernández-Alnemri et al., 1996), la caspasa 8 puede activar a la caspasa 3 y/o a la caspasa 7 y cualquiera de estos dos puede activar directa o indirectamente a la caspasa 6 y regular a la caspasa 3 y a la caspasa 7 (Orth et al., 1996ab). Está claro que hay muchas áreas que aún no se logran entender en los eventos relacionados con la cascada proteolítica, iniciando con la activación de la caspasa 8 o de la caspasa 10 y culminando con la activación de la caspasa 3 y otras caspasas que actúan como moduladores del efecto proteolítico en proteínas clave en el interior de la célula. De hecho no es claro el papel que juegan en el señalamiento apoptótico la caspasa 8 o la caspasa 10. Alternativamente, nuevas caspasas pueden ser reclutadas de manera similar para activar receptores de muerte por una virtual interacción entre proteína-proteína llevada a cabo en sus prodominios.

La granzima B actúa como mediadora en la apoptosis inducida en los linfocitos T citotóxicos en células blanco por activación de las caspasas. Los linfocitos T citotóxicos (CTL's), son un componente crítico en la defensa inmune celular contra tumores y células infectadas por virus. Los CTL's inducen apoptosis en células blanco por dos mecanismos: i. la interacción del Ligando Fas en CTL's activados con el receptor Fas localizado en las membranas de las células blanco (este mecanismo es mediado por Fas) y ii. y la exocitosis de los CTL's de gránulos citoplasmáticos que contienen a la serin proteasa granzima B (y otras granzimas relacionadas) y también contienen a la perforina (una proteína formadora de poros), para que posteriormente faciliten la liberación de granzima B en el interior de las células blanco (este mecanismo es mediado por granzima B y perforina) (Berke, 1995). Estos mecanismos no son redundantes, ya que en CTL's de ratón deficientes en Fas, Ligando Fas, perforina o granzima B se deteriora la habilidad de inducir apoptosis en las células blanco (Berke, 1995; Nagata and Golstein, 1995).

Como hemos observado, el señalamiento mediado por Fas resulta en la activación de la cascada de las caspasas y juega un papel fundamental en la muerte inducida por Fas, ya que la granzima B es la única proteasa que comparte la especificidad inusual que presentan las caspasas hacia el sustrato Asp (Shi et al., 1992) y esto haría posible que se liberara esta serin proteasa dentro de las células blanco y pudiera disparar la cascada proteolítica involucrando a los miembros de la familia de las caspasas; muchos trabajos pueden admitir esta hipótesis (Darmon et al., 1995; Martin et al., 1996)).

Ya que las caspasas son proteasas, es imperativo identificar y caracterizar sus sustratos celulares. La naturaleza de la muerte celular programada está estrechamente regulada por la inherente especificidad de las caspasas, y estas caspasas forman relativamente un pequeño apartado dentro de las proteínas celulares, las cuáles por proteólisis selectiva contribuyen a la ejecución de la muerte celular apoptótica. Por tanto, la identificación de estos "sustratos de muerte" son un punto clave en el orden de los procesos tanto en los eventos como en la señalización. Durante la apoptosis, los cortes proteolíticos de los sustratos pueden ser activados (por proteínas promotoras de muerte) o inactivados (por proteínas estructurales promotoras de la sobrevivencia). Finalmente los sustratos son endógenos y nos indican la actividad de las

proteasas durante la apoptosis, pudiendo ayudar a identificar cuáles caspasas estarían actuando durante la muerte celular programada.

Muchas –si no es que todas- de las proteínas conocidas que experimentan proteólisis durante la muerte celular son sustratos de una o más caspasas. Recientemente varios sustratos apoptóticos han sido identificados y clasificados en 3 amplias categorías: i. proteínas que juegan un papel en la respuesta homeostática a algún estímulo de estrés ii. proteínas estructurales y iii. proteínas con función desconocida.

Las proteínas que responden a algún estímulo de estrés degradadas durante la apoptosis incluyen a enzimas reparadoras del ADN (PARP) (Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994), también a la subunidad catalítica del ADN dependiente de proteincinasa (Casciola-Rosen et al., 1994ab, 1996), también a las ribonucleoproteínas heteronucleares C1 y C2 (Waterhouse et al., 1996), también el gen producido por el retinoblastoma que es un regulador del ciclo celular (An and Dou, 1996; Jänicke et al., 1996). El corte de estos sustratos empeora la habilidad del ADN de reparar las cadenas rotas y de unir las con el ARN mensajero, con lo cual, se favorece un potencial balance en favor de la muerte celular sobre la reparación celular (Casciola-Rosen et al., 1996).

Otros sustratos apoptóticos de las caspasas incluyen a un gran número de proteínas estructurales que mantienen la integridad del citoesqueleto o de la matriz nuclear, varios componentes como la actina del citoesqueleto, incluyendo la b-actina (Kayalar et al., 1996), la subunidad-a que une a la actina con la proteína fodrina (Greidinger et al., 1996) y Gas2 (Brancolini et al., 1995), que actúan durante cierto tipo de apoptosis. Estas proteínas del citoesqueleto aparecen como blancos selectivos para las caspasas mientras que otras proteínas relacionadas como la tubulina no experimentan proteólisis por apoptosis (Brancolini et al., 1995).

El gen producido en la enfermedad de Huntington y las presenilinas están implicadas en la enfermedad de Alzheimer y caen dentro de la tercer categoría de las proteínas con función desconocida (Kim et al., 1997).

Todos estos trabajos facilitan la identificación de blancos intracelulares de las caspasas, y de estos trabajos se desprenden conceptos trascendentales en cuanto a eventos moleculares que nos ayudan a incrementar el entendimiento de la muerte celular apoptótica.

Papel de las Caspasas en la enfermedad

Debido al crítico papel que juega la apoptosis en el desarrollo y en la respuesta a los cambios homeostáticos, no me sorprende que se relacione estrechamente con la patogénesis de muchas enfermedades. De forma general, el desequilibrio de la apoptosis puede tomar dos caminos: i. incrementar la sensibilidad a la apoptosis provocando una excesiva muerte celular y ii. presentar resistencia a la apoptosis provocando una deficiente muerte celular (Thompson, 1995). Desórdenes que caracterizan el incremento de la muerte celular incluyen enfermedades degenerativas (como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral, atropía muscular espinal y otras), enfermedades vasculares y SIDA. En

contraste con esto, enfermedades caracterizadas por la deficiente o inadecuada apoptosis incluyen cáncer (y neoplasias benignas), enfermedades autoinmunes (como lupus, artritis reumatoide y otras) e infecciones virales crónicas/latentes (Thompson, 1995). Las caspasas son efectores esenciales en la muerte celular apoptótica y juegan un papel central en la patogénesis de estos desórdenes.

En enfermedades asociadas con el aumento en la sensibilidad de la apoptosis, la activación de las caspasas juega un papel central. La apoptosis es el mayor mecanismo patogénico de muerte celular causado por insuficiencia vascular o por isquemia. La fragmentación oligonucleosomal del ADN, un punto característico de la muerte celular apoptótica, ha sido demostrado en modelos animales tanto en isquemia cerebral como en isquemia del miocardio, y en estudios *post-mortem* de infartos al miocardio humanos (Li et al., 1995). Miocitos apoptóticos pueden ser detectados dos o tres horas después de haberse presentado una isquemia (Bardales et al., 1996).

En contraste, enfermedades asociadas con apoptosis deficiente pueden estar caracterizadas por la inhibición o la disminución de la actividad de las caspasas. Desórdenes autoinmunes son caracterizados por la disminución de apoptosis (Thompson, 1995). Un gran número de virus resisten la respuesta inmune del huésped debido a la inhibición de ciertas caspasas. Defectos inherentes en Fas o en el Ligando Fas tanto en ratones como en humanos resulta en síndromes autoinmunes fatales como linfadenopatía o esplenomegalia (Nagata and Goldstein, 1995). Las células cancerosas disminuyen su sensibilidad a la apoptosis (aumentando su capacidad proliferativa) dando como resultado un daño genético acumulado. Una dramática ilustración de la importancia de la resistencia a la apoptosis en la patogénesis del cáncer surge de estudiar al gen antiapoptótico Bcl-2 que es el homólogo en mamíferos del gen de sobrevivencia Ced-9 del nemátodo *C.elegans* (Vaux et al., 1992; Hengartner and Horvitz, 1994). Es atractivo especular con la actividad de las caspasas, y pensar que el gen proapoptótico p53, puede funcionar como un gen supresor de tumores, inactivando células de tumores que podrían ser resistentes a la apoptosis.

Dado al papel que las caspasas juegan en la desregulación de apoptosis, estas proteasas son fuertes candidatas para la manipulación terapéutica (Thompson, 1995). En el futuro, enfermedades caracterizadas por una deficiente apoptosis podrían ser tratadas con terapias de genes de tal forma que las caspasas seleccionarían sus blancos específicos; es por esto que la identificación de substratos apoptóticos para las caspasas es un punto que podría generar nuevos blancos en la quimioterapia del cáncer. En contraste, enfermedades caracterizadas por el incremento de apoptosis pueden responder a tratamientos con inhibidores específicos de las caspasas, reduciendo la incidencia de enfermedades actuales como infarto cerebral o isquemia seguida de reperfusión (Hara et al., 1997). También podríamos diseñar estrategias para trabajar con desórdenes sistémicos y crónicos asociados con una excesiva muerte celular, como es el caso del SIDA, de hecho, una inhibición global de la apoptosis por administración sistémica de inhibidores de las caspasas podría presentar grandes consecuencias. El papel fundamental que las proteasas juegan en la apoptosis y en la enfermedad sugiere que la habilidad de regular la selectividad y la actividad de las mismas, podría abrir una infinita variedad de posibilidades terapéuticas.

Actividad de las endonucleasas en la apoptosis

Las enzimas que degradan el ADN desempeñan un papel significativo en todos los procesos celulares; estas enzimas se denominan nucleasas y pueden ser DNAsas (las que específicamente degradan ADN), exonucleasas (las que degradan ADN desde un extremo de la molécula) y las endonucleasas (que actúan en el interior de los ácidos nucleicos reduciéndolos a fragmentos muy pequeños).

El papel esencial de la activación de las endonucleasas en la apoptosis *in vivo* ha sido establecida y aunque no ha sido posible identificar exactamente el papel que juegan las endonucleasas en la apoptosis, más de 20 diferentes enzimas dependientes de calcio y de magnesio han sido implicadas en la apoptosis. Existe una asociación de las endonucleasas con la muerte celular; Kerr publicó en 1972 su trabajo introductorio con el término apoptosis donde describía formas específicas de muerte celular y distintas formas de necrosis en las cuales se observaban dramáticos cambios en la morfología nuclear de las células estudiadas, como un resultado de un colapso de la cromatina cuando se realizaban observaciones en el microscopio electrónico (Kerr et al., 1972). La fragmentación del ADN ocurre durante la fase temprana de muerte celular en esplenocitos; en el núcleo de estos esplenocitos se encontró una endonucleasa endógena dependiente de calcio y de magnesio, y desde entonces se relaciona a las endonucleasas con la muerte celular (Bachvaroff et al., 1977), otras endonucleasas implicadas en la apoptosis son Nuc18 y endo-exonucleasas; gracias a estas observaciones iniciales, los mecanismos de corte del ADN durante la muerte celular han sido rigurosamente estudiados. En trabajos más recientes he encontrado dos líneas frecuentes de investigación: i. la identificación de las endonucleasas dependientes de calcio y de magnesio y ii. la medición de cambios de la concentración de calcio intracelular en células que experimentan apoptosis.

En cuanto a la identificación de las endonucleasas dependientes de calcio y de magnesio tenemos que muchos de los estudios iniciales de los cationes en la activación del mecanismo de acción de las endonucleasas fue realizado en la DNAsa que fue una de las primeras de esta clase de enzimas en ser purificada, homogeneizada y cristalizada. Esta enzima está involucrada en la degradación de los ácidos nucleicos y se observa su actividad en la sangre al limpiar el ADN de la circulación sanguínea. Trabajos independientes de la muerte celular identificaron un número de endonucleasas activas dependientes tanto del calcio como del magnesio, en el núcleo de la célula (Hashida et al., 1982, Stratling et al., 1984); mientras que en algunos otros laboratorios se han identificado endonucleasas activas dependientes del calcio y del magnesio en el núcleo de células apoptóticas (Deng and Podack, 1995). En muchas de las células mencionadas, las enzimas dependientes del calcio y del magnesio siempre están presentes; de hecho algunas células que no cuentan con endonucleasas dependientes de calcio y/o magnesio o que cuentan con endonucleasas con poca actividad, se activan rápidamente al ser inducidas a la apoptosis. Al vincular a las endonucleasas con la apoptosis tenemos que las endonucleasas dependientes de calcio y de magnesio pueden degradar en varios fragmentos a la cromatina, lo que se observa en las células apoptóticas (Khodarev and Ashwell, 1996; Sokolova et al., 1995).

En cuanto a la medición de cambios de la concentración de calcio intracelular tenemos que un gran número de estudios han demostrado que los cambios en las concentraciones de calcio de las células que experimentan apoptosis, o que muestran ionóferos de calcio o algún otro modulador de la homeostasis del calcio celular pueden inducir apoptosis o cambios apoptóticos.

El ionófero de calcio, A23187, puede inducir la fragmentación del ADN en un gran número de células, incluyendo los timocitos y las células PC12 (Umansky et al., 1988); una sustancia llamada thapsigargina provoca que aumenten los niveles del calcio intracelular al liberarse de los depósitos mitocondriales y que sinergicen el efecto del calcio extracelular (Jiang et al., 1994). Al inducir Fas y apoptosis en células B, se estableció que se requería incrementar la concentración intracelular de calcio (Oshimi and Miyazaki, 1995). Estos experimentos podrían implicar que el aumento en la concentración de calcio estaría relacionado directamente con la activación directa de las endonucleasas, sin embargo existe un gran número de pasos intermedios entre ambos eventos que actualmente se encuentran en investigación, y para citar uno de ellos, el caso de Bcl-2, el cuál no previene los cambios en la homeostasis del calcio en células apoptóticas. La mejor evidencia del papel del calcio en la activación de la endonucleasa proviene del estudio de timocitos y es respaldado por datos de otros tipos de células, principalmente los linfocitos; de hecho, el calcio no es un activador/regulador universal de la degradación de ADN en las células, depende del estado en el que se encuentre la célula (por ejemplo dentro del ciclo celular o fuera de él).

Por el momento no se cuenta con suficiente evidencia de que la fase internucleosomal de la fragmentación del ADN sea un paso esencial en la apoptosis; de hecho, existen algunas células que no exhiben la fragmentación del ADN internucleosomal durante su muerte. En varios tipos de células y tejidos en los que se producen cortes en las cadenas del ADN realizados por diferentes enzimas, se observa que está involucrada la cromatina, la cuál ha sido identificada y relacionada con la apoptosis.

Si fuera posible determinar qué tipo de endonucleasa actúa en determinado sitio y qué sitio es el que recibe el ataque endonucleótico, podríamos dirigir las condiciones dentro de las células tratando de evitar o de producir catástrofes celulares dependiendo del caso; para esto tendríamos que incrementar el conocimiento del comportamiento de la cromatina y de las diferentes enzimas que participan en la matriz nuclear.

Capítulo 7

Apoptosis, Inmunología y SIDA

Señalización apoptótica en linfocitos

Ya hemos revisado que la muerte celular es un evento crítico para una gran variedad de organismos, plantas y especies multicelulares complejas como es el caso de los mamíferos. Al entender que algunos eventos implicados en la muerte celular son genéticamente programados, varios laboratorios de investigación han usado una gran variedad de sistemas para demostrar la regulación genética de la apoptosis, y uno de los sistemas de investigación utilizados con mayor frecuencia es "el sistema inmune" el cuál, ofrece la oportunidad de aislar a un gran número de células que mueren relativamente en su forma pura. La habilidad de los ratones transgénicos con un receptor específico definido para células T proveen una herramienta adicional invaluable para los estudios de la muerte celular, por ejemplo en el timo es posible inducir una selección negativa con lo cual las células T autoreactivas serían eliminadas por la introducción de antígenos específicos. Al establecer un receptor de antígenos de células T (TCR) en un ratón transgénico, todos los timocitos tendrán el mismo receptor de antígenos de células T (TCR), esencialmente todas las células que pueden ser inducidas a morir.

Durante la maduración, tanto las células B como las células T, se encuentran expuestas a señales que son reconocidas y generadas por sus receptores de membrana y algunas de estas señales dan inicio a la apoptosis. En particular está bien establecida la reacción que sufren los timocitos CD4⁺ y CD8⁺ los cuáles pueden estar sujetos tanto a una selección positiva como a una selección negativa.

La selección positiva es necesaria para asegurar la presencia de células T maduras con la habilidad de reconocer el MHC (complejo principal de histocompatibilidad) (Bohmer, 1994). Esto es seguido de una selección negativa, un mecanismo que se asegura que las células T con potencial de provocar auto reactividad y por tanto un daño, sean eliminadas (Nossal, 1994) y datos encontrados recientemente demuestran que la selección negativa es acompañada por la inducción de apoptosis (Smith et al., 1989; MacDonald and Lees, 1990; Murphy et al., 1990). El mecanismo molecular preciso de la selección negativa aún no se comprende en su totalidad, lo que se sabe es que involucra una gran afinidad en la interacción entre el receptor de la célula T y el antígeno (Ashton-Rickart et al., 1994; Hogquist et al., 1994; Sebzda et al., 1994) y moléculas ayudadoras que asisten en este proceso.

Además de eliminar a las células autoreactivas del timo, manifiesta una necesidad crítica de regular la proliferación de los linfocitos. Una de las cualidades de los linfocitos es la habilidad de proliferar en respuesta a un antígeno, la cuál es seguida de una rápida expansión de células específicas en contrarrestar al antígeno en cuestión y que proveen al organismo con un

mecanismo de eliminación rápida de los patógenos, de hecho, es claro que el crecimiento continuo de la población de linfocitos genera en sí un riesgo. Estas células secretan una gran cantidad de citocinas inflamatorias empleadas para combatir a los patógenos, sin embargo es potencialmente nocivo para el hospedero si se producen en gran cantidad.

Cualquier división celular que se realiza en forma rápida está expuesta a que se presenten mutaciones y por ende podrían presentarse linfocitos perjudiciales; así la ventaja de los linfocitos de responder rápidamente a la presencia de un antígeno por expansión clonal, debe soportarse en la existencia de un control adecuado que revise los puntos críticos de la división celular y en los linfocitos, este control consiste en la activación del programa de la muerte celular (Thompson, 1995). Las señales que inducen a la apoptosis y los mecanismos involucrados en la muerte celular de células maduras e inmaduras es un punto crítico, ya que se relaciona directamente con los caminos de señalamiento que inducen apoptosis en las células del sistema inmune relacionando a los genes con los eventos intracelulares que median el proceso en células linfoides, específicamente en los linfocitos T.

Un evento central que es crítico en el desarrollo de los linfocitos, es cuando la población de linfocitos inmaduros aprende a distinguir, qué es lo que debe discriminar entre lo propio (lo que forma parte del organismo y lo extraño (lo que no forma parte del organismo). En el caso del linaje de las células T, los linfocitos inmaduros potencialmente autoreactivos son eliminados del timo por selección negativa (Nossal, 1994); hace varios años se aclaró que la selección negativa y la supresión clonal ocurrían a través de la inducción de apoptosis y que este proceso requería de la síntesis de genes y de proteínas (Smith et al., 1989; MacDonald and Lees, 1990; Murphy et al., 1990).

Un gran número de células precursoras migran hacia el timo diariamente y son sujetas a selección, de hecho la mayoría de ellas muere por que no sufre ningún tipo de selección (ni positiva, ni negativa) (Surch and Sprent, 1994), estas células esperan pacientemente que sus receptores TCR reconozcan proteínas del MHC y sean seleccionadas, y de hecho, un grupo de estas células reconoce el MHC con alta afinidad y es señalada para que experimente apoptosis por selección negativa (Allen, 1994).

¿Y qué pasa con las células que no sufren ningún tipo de selección (ni positiva, ni negativa)? pues sufren apoptosis, ya que se muestra una indiferencia por ellas (Surch and Sprent, 1994) y evidencias recientes sugieren que este tipo de muerte celular ocurre vía exposición de glucocorticoides endógenos. El primer indicio de que los glucocorticoides y la señalización mostrada por el TCR tienen interacción entre ellos proviene de experimentos realizados en líneas de células T. Hace algunos años se obtuvieron datos que indicaban que mientras que el señalamiento del TCR y la exposición de glucocorticoides inducían apoptosis en líneas de células T, la expresión simultánea de ambas señales era antagonista y resultaba en la sobrevivencia celular (Zacharchuk et al., 1990), los timocitos en adición a las líneas de células T, eran altamente sensitivos a inducir apoptosis por glucocorticoides y este proceso involucraba la expresión de nuevos genes (Wyllie, 1980).

¿Los timocitos requieren más de una señal para que el receptor de las células T los lleve a experimentar apoptosis? Señales de coestimulación son necesarias para la activación de células T periféricas, sin embargo evidencias recientes sugieren que la coestimulación es importante en la selección negativa en el timo; los timocitos muestran que no mueren en respuesta al re-

ceptor de membrana TCR y se observa que la apoptosis es inducida por células presentadoras de antígenos (APC) (Page et al., 1993), lo que podría indicar que las señales del TCR en conjunto con las señales coestimuladoras juegan un importante papel en la señalación del camino que tomarán los timocitos; la consecuencia de las señales coestimuladoras es la selección negativa de los timocitos, sin embargo, los caminos de señalización que son enlazados por las señales estimuladoras aún no han sido determinados con exactitud.

La síntesis de nuevos genes es necesaria para que se realice la selección negativa, y esto hace sentido si se plantea la pregunta de ¿cuáles genes son los encargados de mediar la apoptosis en los timocitos? El gen supresor de tumores p53 es necesario para la inducción de muerte celular inducida por radiación y por agentes quimioterapéuticos que provocan daño al ADN (Lowe et al., 1993; Clarke et al., 1993), el gen p53 no juega ningún papel en la apoptosis mediada por TCR o por glucocorticoides y por lo tanto no juega ningún papel en la selección negativa (Lowe et al., 1993; Clarke et al., 1993). Al buscar genes que induzcan a los timocitos a experimentar la selección negativa me encuentro con el gen *nur77* el cuál forma parte de una superfamilia de hormonas receptoras nucleares (Liu et al., 1994). Estudios *in vitro* con el antisuero de *nur77* (llamado también dominio negativo de *nur77*) sugieren que este gen es necesario para regular la muerte celular por TCR; de esto podemos derivar que los timocitos son capaces de morir por una gran variedad de diferentes estrategias; cada señal inicia con una transducción específica para esa señal y provoca una cascada de reacción que involucra a determinados genes, por ejemplo, los glucocorticoides inducen apoptosis para lo cual requieren al receptor de glucocorticoides (Dieken and Miesfeld, 1992), un segundo ejemplo es la inducción de *nur77* vía TCR, y un tercer ejemplo es la inducción de p53 vía radiación. Estos tres ejemplos convergen en un camino común que activa a la familia ICE de las proteasas y caspasas.

Dos diferentes grupos proveen la suficiente evidencia de que en la ausencia de Fas, TNF se encarga de mediar la apoptosis en poblaciones maduras de células T (Zheng et al., 1995). Los mismos grupos también proveen información que indican que el TNF *in vivo* es un modulador de apoptosis en células T maduras; lo que indica que TNF y Fas se encargan de mediar la apoptosis en todas las células T maduras, mientras que en las células B quizá otra familia de receptores podría participar en la muerte celular. Por otro lado, TRAMP que es una proteína de superficie relacionada con TNFR1, la cuál ha sido clonada recientemente y se han encontrado altas concentraciones de dicha proteína expresados en tejido linfático, además de que TRAMP puede expresar una potente señal de muerte *in vitro* después de una transfección en cultivos celulares (Bodmer et al., 1997).

En cuanto a señales de sobrevivencia mostradas en los linfocitos, los factores de crecimiento como IL-3 e IL-4 proveen señales para que la población de linfocitos sobreviva sin embargo el factor de sobrevivencia más importante es Bcl-2, el cuál fue descrito como un translocador 14:18 en células B neoplásicas (Tsujiimoto et al., 1984) y posteriormente fue considerado como un regulador negativo de la muerte celular (Vaux et al., 1988). El papel de Bcl-2 en la sobrevivencia de las células linfoides ha sido revisado con frecuencia (Strasser, 1995; Cory, 1995), y tanto en células B como en células T inmaduras, se expresa Bcl-2 durante el proceso de maduración en la médula espinal y en el timo; Bcl-2 regula el estado CD4⁺ y CD8⁺, por lo que probablemente proteja a estas células de experimentar selección positiva por lo que la expresión de Bcl-2 en el timo puede promover la diferenciación de los timocitos. De hecho, Bcl-2 no protege a las células T del

timo de la selección negativa (Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1991) por lo que no regula a las células que experimentan la selección negativa. La expresión de Bcl-2 en células CD4 y/o CD8 es alta. La expresión de Bcl-2 sugiere que Bcl-2 actúa extendiendo la longevidad de la población de las células linfoides; este racional es respaldado por la observación de los linfocitos maduros de un ratón experimental que carece de Bcl-2 en el cuál se observa que su vida media es corta y además son altamente susceptibles a experimentar apoptosis (Veis et al., 1993).

La regulación de apoptosis en los linfocitos T es realizada por Fas y por el Ligando de Fas (FasL); Fas pertenece a una familia de receptores de membrana conocida como factor necrosante de tumores (TNF) (Nagata and Golstein, 1995) y en los mamíferos existen al menos diez miembros de esta importante familia incluyendo al receptor 1 de necrosis tumoral (TNFR1) receptor 2 (TNFR2), NGFR, CD40, LtbR, CD30, CD27, 4-1BB, OX40, y Fas que también es conocido como CD95. Estos receptores interactúan con ocho diferentes ligandos que se comportan de una manera muy similar al TNF, por ejemplo, TNFR1 y TNFR2 interactúan con el ligando TNF mientras que Fas interactúa con el ligando FasL. Esta familia de ligandos/receptores ha sido implicada en un gran número de respuestas celulares, incluyendo la proliferación celular, la muerte celular y la diferenciación celular. Aunque no se ha entendido por completo cómo las interacciones entre ligando y receptor regulan las múltiples respuestas, el papel de esta familia en la apoptosis ha sido extensamente investigada (Nagata and Golstein, 1995). Tanto TNFR1 como Fas contienen un dominio citoplasmático conocido como el "dominio de la muerte" la cuál habitualmente transmite señales de muerte a través de la interacción que tiene con dos proteínas que también están contenidas en el dominio de la muerte y que son requeridas en el dominio efector llamadas FADD y TRADD. La interacción entre Fas y FADD, y la interacción entre TNFR1 y TRADD requiere de trimerización de Fas y/o TNFR1 por sus respectivos ligandos. Esta trimerización del receptor induce la asociación de Fas con FADD y de TNFR1 con TRADD; estos complejos activan directamente a las caspasas por medio de la asociación de Fas-FADD y TNFR1-TRADD con un híbrido molecular conocido como FLICE o MACH. FLICE/MACH posee un dominio efector de muerte el cuál es responsable de mediar la asociación con FADD o con TRADD (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Y en adición al dominio efector de muerte, esta proteína multifuncional tiene una actividad proteasa que activa directamente a las caspasas, en particular a CPP32; así al unirse en la superficie celular activa a las caspasas se involucra al menos a tres proteínas Fas, FADD y FLICE.

¿Y dónde es usado Fas-FasL en la muerte celular de linfocitos? El entendimiento en los defectos de Fas han incrementado gracias al uso de ratones *lpr/lpr* y *gld/gld* los cuáles han ayudado a definir que estas moléculas son críticas en la regulación de homeostasis celular, ya que evidencias recientes han demostrado que la inducción de la activación de muerte en células T maduras ocurre por medio de la interacción entre Fas y FasL, lo cuál ha sido demostrado al usar células T de línea o células T híbridas que mueren en respuesta al ligando TCR *in vitro* (Dhein et al., 1995; Brunner et al., 1995; Ju et al., 1995) tanto como *in vivo* (Russell et al., 1993) al utilizar ratones experimentales *lpr/lpr* que presentan defectos en Fas y al utilizar ratones experimentales *gld/gld* que presentan defectos en FasL. Las interacciones entre Fas y FasL no son la única señal apoptótica que se presenta en células T maduras; el papel del TNF también es crítico en la mediación de la muerte. En los ratones *lpr* la muerte de las células T periféricas puede seguir ocurriendo, lo que indica que las moléculas como Fas son mediadas por la muerte de las células T.

Bcl-2 es un miembro de la familia de genes caracterizada por tener los dominios BH1 y BH2, y varios miembros de esta familia afectan ya sea la vida o la muerte de los linfocitos. Por ejemplo Bax, que es una proteína que heterodimeriza con Bcl-2, puede contrarrestar los efectos de Bcl-2 y promover la apoptosis (Oltavi et al., 1993). Los ratones experimentales deficientes de Bax muestran niveles significativos de hiperplasia linfóide (Knudson et al., 1995). Otro importante miembro de la familia es Bcl-x_L el cuál actúa de una forma similar a Bcl-2 promoviendo la sobrevivencia celular (Boise et al., 1993) y los ratones experimentales deficientes de Bcl-x mueren al día 13 de gestación y muestran una muerte celular masiva tanto en tejido hematopoyético como en tejido neuronal de la médula espinal y cerebro (Motoyama et al., 1995). El mecanismo por el cuál Bcl-2 o cualquier miembro de la familia de este gen actúa para perturbar la muerte celular aún es desconocido, sin embargo estas proteínas ejercen sus efectos a través de la interacción de los diferentes miembros de la familia de genes (Yang et al., 1995; Sedlak et al., 1995).

Regulación de la respuesta inmune por muerte celular

La función primaria de la respuesta inmune es responder en forma global y coordinada tras la detección de la presencia de sustancias extrañas (por ejemplo la presencia de infecciones ya sea por virus y/o bacterias, así como también la presencia de daños) lo que implica una ventaja evolutiva que es la de sobrevivir a invasiones de patógenos, igualmente importante es la habilidad de reconocer los cambios que ha sufrido el organismo una vez que han ocurrido los daños o que se ha presentado la infección; para que de esta forma sólo se remuevan del organismo tanto a los patógenos como a los tejidos que han sido afectados. El sistema inmune ha sido comparado con un órgano sensorial el cuál no responde ni al sabor, ni a la luz o al sonido, sin embargo detecta el más mínimo cambio en el medio ambiente celular y molecular. La muerte celular dirigida por la inmunidad puede proveer un mecanismo que sea la base para destruir las células propias que así lo requieran sin discriminar a ninguna con el consecuente potencial de inmuno reconocimiento de las células dañadas que hay que remover.

Es necesario iniciar con una revisión del funcionamiento del sistema inmune. Por ejemplo los vertebrados que nacen sin un sistema inmune competente rápidamente mueren a menos que los factores que les provocarían la muerte fueran rápidamente aislados de su medio ambiente. Los invertebrados cuentan con estrategias para evitar la acción de los patógenos las cuales incluyen a las células fagocíticas que fagocitan rápidamente cualquier sustancia extraña o cualquier célula muerta. Estos fagocitos también juegan un papel importante en la protección de las infecciones. De hecho, dos tipos de células son la más importantes y en las que debemos poner toda la atención: tanto los fagocitos como los linfocitos.

Los linfocitos proveen el reconocimiento específico en la respuesta inmune (los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea y los linfocitos T se desarrollan en el timo principalmente), y de ahí, salen a los compartimentos periféricos como los nodos linfáticos, el bazo y el intestino. Los linfocitos periféricos expresan receptores específicos para reconocer a ciertos antígenos. Los linfocitos poseen una gran diversidad ya que reconocen a un gran número de antígenos que se pueden presentar (10⁹). Los linfocitos pueden ser agrupados en dos categorías por la manera en

la cuál las células reconocen a sus antígenos: los linfocitos B los cuáles son precursores de células secretoras de anticuerpos y los linfocitos T los cuáles reconocen cambios a nivel celular.

Las células B reconocen antígenos que no son necesariamente asociados con las células; el receptor del antígeno de la célula B es una versión de la inmunoglobulina o del anticuerpo que eventualmente la célula B secretará; los anticuerpos son productos solubles que específicamente pueden neutralizar a toxinas, virus y bacterias, al prepararlas para ser fagocitados por células fagocíticas. La unión del antígeno de la célula B provoca que la célula B se active, prolifere y expanda su número de células las cuales eventualmente secretarán anticuerpos. El receptor del antígeno de las células T reconoce a los antígenos solamente cuando el antígeno es asociado con proteínas codificadas por genes del MHC (complejo principal de histocompatibilidad) y que se expresan en la superficie de otras células, no respondiendo a antígenos solubles.

Los datos colectivos de muerte celular en el sistema inmune soportan la noción de que la muerte celular modela la forma de los tejidos o el desarrollo de los mismos y nos marca la forma y el curso que tendrá la respuesta inmune; todo esto conforma la evidencia de que la preponderancia de los defectos inmunes en condiciones genéticas estará caracterizada por defectos en la cascada apoptótica. La importancia de la muerte celular de mantener la homeostasis es reflejada directamente en el número de condiciones fisiológicas que se originan como una consecuencia de defectos adquiridos en la muerte celular, tales como la infección del VIH y/o el cáncer.

Apoptosis en autoinmunidad

Como se ha comentado las células B capturan al antígeno por su anticuerpo de superficie, posteriormente lo internalizan para que posteriormente sea expresado como un complejo [péptido-antígeno] unido al MHC II. Algo similar pasa con las células T; cuando CD4 y TCR en una célula (T_H2) son enlazadas por un antígeno peptídico y por una MHC clase II en la célula B, la célula T es activada y se producen señales de la célula B para que se inicie con la diferenciación y por tanto se secreten inmunoglobulinas. Cuando CD4 y TCR en una célula (T_H1) son enlazadas por un antígeno peptídico y por una MHC clase II en un macrófago, la célula T es activada y se producen señales hacia el macrófago para que destruya a los microorganismos celulares. Un componente crítico en esta señalación es la producción de factores de crecimiento o citoquinas que son requeridas en la proliferación y diferenciación de células inmunes. Las células T CD4⁺ por tanto funcionan como células T ayudadoras al ayudar (valga la redundancia) a células B y a otras APCs (por ejemplo: células dendríticas, monocitos y macrófagos) a dividir y a diferenciar mientras que las células T CD8⁺ reconocen y se unen a complejos de antígenos virales procesados con MHC clase I con las APC. Cuando CD8 y TCR en la célula T son enlazadas por un antígeno peptídico y una MHC clase I en la APC, las señales de TCR le indican a la célula T que debe de eliminar a la APC infectada. Las células T CD8⁺ por tanto funcionan como linfocitos T citotóxicos o citolíticos (CTLs) eliminando a células que han sido infectadas por virus. Las citoquinas producidas por las células T CD4⁺ ayudadoras son críticas en la eliminación de células infectadas por virus por CTLs CD8⁺.

Así los linfocitos B y los linfocitos T (tanto CD4⁺ como CD8⁺) funcionan en común acuerdo para sobrevivir y limpiar al organismo de invasores extraños, los cuáles pueden encontrarse en la circulación, en los tejidos, o en el interior de las células vivas; por lo que será interesante enfocarnos en cómo la infección provocada por el VIH es capaz de destruir este sistema de vigilancia inmune.

El sistema inmune ha sido diseñado para reconocer y eliminar a los invasores extraños al organismo tales como bacterias y virus, y los jugadores clave en este proceso son los linfocitos B (los cuáles maduran en la médula ósea) y los linfocitos T (los cuáles maduran en el timo).

Cada célula B expresa un anticuerpo único en su superficie que es específico para cada antígeno en particular; este anticuerpo constituye el receptor de células B para antígenos (BCR), y cuando se enlaza con determinado antígeno en presencia de células T ayudadoras, el BCR envía señales a la célula para que se divida y se diferencie provocando que el linfocito B secrete anticuerpos específicos para ese antígeno. Los anticuerpos solubles secretados pueden reconocer y unirse a los antígenos en los tejidos o en la circulación con el fin de destruirlos; por lo que el involucramiento de los anticuerpos en la vigilancia inmune es llamada inmunidad humoral (Osborne et al., 1994; Budd et al., 1987).

Los linfocitos T por otro lado están involucrados en la inmunidad celular ya que el reconocimiento del antígeno y la unión al mismo ocurren durante la interacción entre células.

Un punto crítico en esta interacción célula-célula es el reconocimiento del antígeno por parte del linfocito T. Los linfocitos T no reconocen un antígeno específico a menos que sea presentado por una célula presentadora de antígeno (APC) la cuál fagocita al antígeno internalizándolo del entorno en vesículas intracelulares (endosomas), y posteriormente procesa al antígeno que ha sido internalizado generando péptidos inmunogénicos (péptidos derivados de proteínas extrañas); por otro lado en el interior de la APC se encuentran otras vesículas las cuales contienen moléculas MHC cubiertas por una membrana de glicoproteína, ambas vesículas se fusionan (las que contienen los péptidos inmunogénicos con las que contienen las moléculas MHC) y esta fusión por enlaces no covalentes entre péptidos inmunogénicos con MHC derivan en un complejo formado por moléculas MHC unidas al péptido inmunogénico; este complejo es entonces transportado hacia la superficie celular y la fusión del endosoma con la membrana plasmática de la APC expresa en la superficie celular el complejo [péptido antigénico-MHC] el cuál se presenta y ahora sí es reconocido por las células T; por lo que las moléculas de MHC tienen una gran importancia fisiológica ya que asocian a los linfocitos T con sus antígenos específicos.

Uno de los procesos más importantes durante el desarrollo de la inmunidad es la de remover los linfocitos autoreactivos por medio de la apoptosis (Wyllie, 1980; Cohen and Duke, 1984). Sin el proceso de selección negativa, la generación aleatoria de un gran número de receptores de antígenos para los linfocitos podría propiciar que se incremente el riesgo de una gran cantidad de enfermedades autoinmunes como por ejemplo la diátesis autoinmune (Remuzzi G, 1988) en la cual se presentan alteraciones del funcionamiento plaquetario y de su interacción con el subendotelio vascular por lo que los pacientes presentan con frecuencia complicaciones hemorrágicas que condicionan una importante morbi-mortalidad de estos pacientes. El desarrollo de los linfocitos B y T es sujeto a un riguroso proceso de supresión ya que las mutaciones encontradas en el desempeño de su función son las que inician con el proceso de apoptosis y en consecuencia inician con la autoinmunidad.

Los linfocitos T restantes que no son susceptibles a la apoptosis se activan vía receptor de antígeno de las células T (TCR). Las células T expresan receptores para el factor de crecimiento IL-2 (interleucina-2) iniciando con una serie de pasos que llevan a la célula al ciclo celular (Smith, 1988). Para alcanzar la máxima producción de IL-2 las células T deben ser co-estimuladas por una segunda molécula llamada CD28 la cuál se enlaza a dos moléculas altamente reguladas por los linfocitos B o por los macrófagos conocidas como B7-1 y B7-2 (Lenschow et al., 1994). Este segundo receptor formado por CD28, B7-1 y B7-2 es conocido como CTLA-4, el cuál es expresado transitoriamente por células T activadas (June et al., 1994) y confiere una señal regulatoria negativa para que las células T experimenten apoptosis (Gribben et al., 1995). Dentro del ciclo celular inducido por IL-2 inicia una regulación de la expresión de Fas en la superficie y una sensibilización al ligando Fas (Altman et al., 1981). Como consecuencia, las células T que participaron en el ciclo celular son más vulnerables a la apoptosis inducida por Fas, creando una situación de balance entre lo que es la proliferación y la apoptosis de las mismas.

La exposición al ligando Fas resulta en la sensibilización de células T por lo que FasL de superficie puede hacer que las células T se activen por ellas mismas (suicidio celular autónomo). Las células del sistema inmune se encuentran entre las más dispuestas a la expansión clonal seguidas de una rápida supresión por medio de apoptosis. Esto agrega valor durante los procesos infecciosos donde la rápida expansión de las células inmunes es requerida, sin embargo esta fase proliferativa debe controlar rápidamente la infección, para que no se provoque una reacción auto inmune; cualquier defecto en el proceso de la apoptosis de los linfocitos podría iniciar con la presencia de enfermedades autoinmunes.

La autoinmunidad puede resultar de defectos genéticos en la maquinaria apoptótica, por ejemplo, las mutaciones en genes de la maquinaria apoptótica pueden ilustrar cómo estos pueden impactar en la supresión de linfocitos y con esto provocar daños autoinmunes. El ejemplo clásico es el de ratones experimentales *lpr* y *gdl* con apoptosis defectuosa en el sistema inmune lo que provoca mutaciones en los genes Fas o FasL. (Watanabe-Fukunaga et al., 1992; Suda et al., 1993). Con la edad, estos ratones desarrollan una enorme acumulación de linfocitos, la mayoría de los cuales tienen un fenotipo inusual de expresar el TCR en la ausencia de marcadores de células T maduras, llamados CD4 (células T ayudadoras) o CD8 (células T citolíticas o citotóxicas) (Davignon et al., 1985). La destrucción de una gran variedad de genes que gobiernan la apoptosis de los linfocitos T puede precipitar una tendencia hacia los problemas de enfermedades autoinmunes.

SIDA y muerte celular

El virus de la inmunodeficiencia humana está clasificado dentro del género Lentivirus de la familia Retroviridae. Los virus de este género se caracterizan por fusionar y destruir las células del huésped y por producir infecciones lentas, en las cuáles, la aparición de los síntomas está separada del momento de la infección por muchos años. El VIH fue el primer Lentivirus con implicaciones en la patología humana, tiene dos serotipos a la fecha, el VIH-1 y el VIH-2. Por ser inmunotrópico producen un deterioro cuantitativo, cualitativo y progresivo del sistema inmune del huésped hasta causar el SIDA.

El VIH-1 y el VIH-2 tienen estructura similar aunque diferenciada genéticamente. Los virus maduros son esféricos, de 100 nanómetros de diámetro, con una envoltura externa lipídica, con 72 proyecciones de proteína de envoltura (gp120), correspondiente a la parte externa de ésta, unida a la proteína transmembrana (gp41) y debido a que geman a través de la membrana de célula del huésped, la envoltura viral contiene proteínas celulares del huésped como HLA-DR, HLA-clase I y B2-microglobulina. La nucleocápside, compuesta de una matriz externa, la proteína 17 y rodeando la parte externa del core que contiene el ácido nucléico, las proteínas 024 y p26. Dentro de la nucleocápside están las dos cadenas de ácido nucléico y las enzimas asociadas, proteasas, integrasas y transcriptasas reversas, además de algunas cadenas de ADN viral. El tipo de ácido nucléico es ARN con 9,200 nucleótidos para el VIH-1.

El mecanismo preciso por el cual el VIH causa una depleción de los linfocitos T CD4⁺ causando inmunosupresión severa tiene algunas causas conocidas aunque no está completamente esclarecido: altos niveles de ARN dañado o acumulación de ADN no integrado, en citoplasma de la célula del hospedero, gemación del virus que daña la membrana celular y la formación de complejos CD4-(gp120) intracelulares.

Los órganos linfoides albergan VIH en mayor cantidad que las células periféricas durante todos los estadios de la infección. La interacción de las células CD4 con los linfocitos B, las células asesinas naturales y las citotóxicas se realiza principalmente por el contacto directo y la liberación de citocinas. Los factores secretados durante esta interacción afectan el crecimiento y diferenciación de las células linfoides y hematopoyéticas y la función de las células no linfoides.

La defensa contra el VIH, como contra cualquier otro antígeno, requiere que este traspase las barreras naturales de la piel y de las mucosas y ser fagocitado por un macrófago que lo digiera y lo procese. El antígeno, una vez procesado, llega a la membrana del macrófago para ser presentado por él y por otras células (dendríticas, endoteliales y linfocitos B) al linfocito T CD4⁺, el cuál responde con la producción de un clon que reconoce específicamente el antígeno presentado y no uno diferente o modificado. Este hecho, es de gran importancia inmune, ya que el VIH tiene una gran variabilidad genética.

Durante los últimos años se ha observado un notable progreso en pro del entendimiento de la patogénesis de la infección provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Dicho virus ha sido asociado con la supresión de células T CD4⁺ y con la destrucción del sistema inmune. De hecho los mecanismos de la supresión fueron confusos ya que los niveles del virus encontrados en torrente sanguíneo mostraban concentraciones muy bajas que hacían casi imposible la medición de la concentración del mismo. Los avances mostrados en el entendimiento del comportamiento del virus ha dado un vuelco al curso de la enfermedad provocada al utilizar técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las cuáles nos ayudan a obtener mediciones que son más sensitivas. Aunado a esto, grandes concentraciones de virus fueron encontradas en órganos linfoides, particularmente en estados tempranos de la enfermedad, por lo que en los últimos años se ha encontrado con una gran cantidad de trabajos que relacionan la carga viral con la progresión de la enfermedad, fortaleciendo la conclusión de que el virus es el responsable de la supresión de células T CD4⁺.

La apoptosis es necesaria para la función inmune normal y para el desarrollo por lo que juega un importante papel en la patogénesis del SIDA; las células T inmaduras mueren por apoptosis en el timo si sus TCRs son específicos para antígenos propios –o sea autoreactivos– mientras que las células T maduras mueren por apoptosis una vez que se ha presentado la estimulación antigénica, durante la selección de células T de alta afinidad en los tejidos linfoides periféricos (Zheng et al., 1996), lo que significa la disminución de la respuesta inmune (Lenardo, 1996; Osborne et al., 1994).

La apoptosis es mediada por la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Fas, en particular, ha sido estudiado extensivamente en años recientes, y la unión entre Fas y FasL induce la proliferación de apoptosis ya sea en la misma célula o en células vecinas (Anderson et al., 1993; Brunner et al., 1995; Dhien et al., 1995; Ju et al., 1995). Los pacientes VIH positivos presentan un alto porcentaje de linfocitos sanguíneos periféricos positivos para la expresión de Fas (Katsikis et al., 1995) y presentan una mayor concentración de Fas por célula (Gougeon et al., 1996); lo más importante podría ser que tanto las células CD4⁺ como las CD8⁺ de pacientes infectados por el VIH son más susceptibles de morir inducidos por FasL (Katsikis et al., 1995; Estaquier et al., 1995). Se ha encontrado que Fas induce a la muerte de células T CD4⁺ con mayor frecuencia en pacientes sintomáticos que en pacientes asintomáticos (Katsikis et al., 1995).

El incremento de la expresión de Fas durante la infección VIH puede ser el resultado de la activación inmune crónica (Lynch et al., 1995); adicionalmente las proteínas de membrana CD4 muestran el incremento de la expresión de Fas (Oyaizu et al., 1994) y esto es posible porque la gp120 se une con las CD4 regulando la expresión de Fas en células no infectadas, auxiliando con esto al incremento de apoptosis inducida por Fas, además de que la gp120 ha mostrado aumentar la muerte inducida por Fas en células T CD4⁺ (Westendorp et al., 1995). La proteína Tat del VIH ha incrementado el nivel de expresión de FasL en células T al adicionarse exogenamente (Westendorp et al., 1995). Tat es secretada de las células infectadas (Ensoli et al., 1990) pudiendo regular a FasL en células no infectadas. Estas pueden morir por ellas mismas al unirse al Fas expresado por la misma célula o por otras células. Estos datos sugieren la participación de Fas y FasL y también sugieren su interacción en la apoptosis inducida por el VIH. Por otro lado la inhibición de la familia de proteasas apoptóticas ICE, las cuales participan en el señalamiento de Fas, inhiben la apoptosis en cultivos de células infectadas por el VIH (Glynn et al., 1996).

Trabajos recientes muestran que la apoptosis ocurre cuando células infectadas y no infectadas se colocan juntas en el mismo cultivo (Nardelli et al., 1995). La replicación viral en los cultivos no es requerida ya que la transcriptasa reversa y los inhibidores de la proteasa se encargan de prevenir la apoptosis; de hecho los CD4 solubles o los anticuerpos que bloquean las interacciones entre CD4-gp120 pueden boquear la apoptosis (Cohen et al., 1992); además las células que expresan solamente Env (gp160/gp120) pueden provocar la muerte de células CD4⁺ no infectadas (Cohen et al., 1992; Kolesnitchenko et al., 1995). Esta evidencia indica la interacción de gp120 en las células infectadas con CD4 en células no infectadas, lo que provoca la apoptosis en células no infectadas.

La inducción de apoptosis por la unión de gp120 con CD4 puede ser provocada por el incremento de la expresión de Fas o por la activación del factor transcripcional AP-1 (Chirmule et al., 1995) o por el reclutamiento de la tirosinasa LcK (Corbeil et al., 1996), provocando una activación impropia de la célula (Kabelitz et al., 1993; Green and Scott, 1994).

Las diversas evidencias revisadas indican que la apoptosis en la infección VIH es, en parte, mediada por la señalización de Fas-FasL, y el mecanismo por el cual el VIH podría causar apoptosis en células no infectadas podría ser por la interacción entre CD4-gp120. El desarrollo de alternativas como los medicamentos antiretrovirales que tuvieran blancos en proteínas virales podrían prevenir la apoptosis al acelerar la muerte de las células, reduciendo la viremia e incrementando la vida de los individuos infectados.

El principal misterio de la infección VIH es cómo el virus provoca la destrucción de las células T CD4⁺ y finalmente las células T CD8⁺. Varios posibles mecanismos de la muerte de células T incluyen la destrucción de células T no infectadas, tanto CD4⁺ como CD8⁺, y la posibilidad de que el virus proteja a la célula que infecta hasta que la replicación viral sea completada es latente.

El virus de inmunodeficiencia humana (HIV) es uno de los más complejos conocidos hasta el momento siendo un miembro de la familia de los retrovirus, y como otros retrovirus, contiene dos cadenas de ARN, contiene también las proteínas esenciales para empaquetar y replicar, además de ser codificado por los genes *gag*, *pol* y *env*. El VIH así como otros retrovirus también codifica para otras proteínas accesorias tales como Tat, Nef, Vpr y Vpu, las cuales tienen diversas funciones en varios puntos de su ciclo de vida. Su genoma es complejo en función de que existen muchos genes que no son comprendidos del todo y es de llamar la atención que el estudio del VIH es más grande que cualquier otro estudio realizado sobre otro patógeno humano.

El VIH como otros retrovirus es un intermediario del ADN; los retrovirus contienen una enzima llamada transcriptasa inversa que puede convertir el ARN vírico en ADN en el citoplasma y recientes trabajos sugieren que ocurren cambios conformacionales en el material genético involucrado (Wu et al., 1996; Trkola et al., 1996). Este ADN puede replicarse desde sitios extracromosómicos o dirigirse hacia el núcleo celular, en donde pasa a formar parte del ADN de la célula del hospedero y esta replicación ocurre en todos los estados de la enfermedad (Pantaleo et al., 1993; Embertson et al., 1993; Piatak et al., 1993; Ho et al., 1995; Wei et al., 1995; Perelson et al., 1996); estos genes víricos integrados se duplican junto con los genes celulares normales, y toda la progenie de la célula originalmente infectada contendrá los genes víricos (Mellors et al., 1996). La expresión de los genes víricos de algunos retrovirus puede ser oncogena, convirtiendo la célula en un cáncer, o tener otros efectos patológicos que pueden alterar la función normal de la célula o producir su muerte. Se sabe que los retrovirus causan enfermedades malignas, y el mismo virus puede provocar diferentes enfermedades en diferentes animales; hay tres grupos de retrovirus que afectan al hombre los cuales tienen, todos ellos, una notable afinidad por los linfocitos, en particular por los linfocitos T CD4⁺. El VIH infecta preferentemente el subgrupo principal de células T, definido fenotípicamente como CD4⁺ y funcionalmente como colaboradoras (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995; Perelson et al., 1996), las cuáles quedan entonces agotadas, dando como resultado una disminución de la proporción de células CD4⁺ con respecto de las células CD8⁺ citotóxicas o citolíticas (Zinkernagel and Hengartner, 1994; Feinberg, 1996); el VIH puede actuar protegiendo a la célula infectada de la muerte hasta que dicha célula haya producido una cantidad suficiente de virus y entonces la célula muere víctima del sistema inmune. Sin embargo, el virus también es capaz de infectar algunas células no linfocíticas, como los macrófagos y las células del tejido nervioso y probablemente permanece presente durante toda la vida. Posterior a la infección por VIH puede producirse una amplia variedad de defectos cualitativos y anomalías funcionales de las células T, de las células B, de las células citocidas

naturales (NK), de los monocitos y de los macrófagos; es decir, están afectados todos los componentes del sistema inmunitario. A pesar del hecho de que puedan afectarse otras células además de los linfocitos T CD4⁺ e independientemente de si las anomalías observadas son de la inmunidad celular o de la humoral, el espectro completo de la disfunción inmunológica en el SIDA se puede explicar por la pérdida de la función de los linfocitos T CD4⁺ colaboradores cuyo papel es de importancia crítica (Nardelli et al, 1995). Puede aparecer una variedad de síndromes neurológicos como resultado de la infección, o probablemente, como resultado de la lesión directa de las células del sistema nervioso por la infección con el VIH.

Capítulo 8



Relevancia clínica de la apoptosis

Importancia en la oncología clínica y en la terapia del cáncer

El común denominador más aparente en todos los cánceres es su acelerado crecimiento, y esto se ha observado tanto clínicamente como experimentalmente (Kerr et al., 1994). La proporción del crecimiento tumoral es un punto de gran importancia tanto para el estudio biológico de la progresión de la enfermedad como para el establecimiento de propuestas prácticas en el tratamiento del cáncer (Kerr et al., 1994). El estudio de la cinética de la proliferación celular en tumores ha producido importante información, particularmente en desórdenes relacionados con el ciclo celular. Esta información contribuye al desarrollo de tratamientos anticáncer cuyo fin es el de suprimir la proliferación celular (Kerr et al., 1994). Recientemente se ha observado que el incremento en la mitosis y la falta de diferenciación son dos de los principales factores que pueden explicar el crecimiento acelerado observado en las enfermedades malignas, de hecho durante la década pasada se observó que la desregulación de la muerte celular programada jugaba un papel importante en este fenómeno (Kerr et al., 1994). Se ha observado que en la mayoría de los tumores malignos la apoptosis es inhibida por lo que se incrementa el número de células durante el desarrollo de neoplasias, incrementándose no sólo la actividad mitótica sino también disminuyéndose el rango de supresión celular el cual ocurre fisiológicamente en todos los tejidos para mantener el balance celular en todos los órganos (Kerr et al., 1994).

Las investigaciones y los descubrimientos realizados en esta área han demostrado que la eliminación fisiológica de las células es regulada por un programa genético que involucra oncogenes y antioncogenes (Steller, 1995). Se supo que muchos de estos promotores y supresores de secuencias de ADN jugaban un papel central en la carcinogénesis antes de que las acciones regulatorias de la apoptosis fueran conocidas por lo que los investigadores han acordado que el entendimiento de la bioquímica y de los caminos de señalamiento molecular que controlan la apoptosis es de suma importancia para el problema del cáncer (Thompson, 1995). El estudio de la muerte celular programada en enfermedades malignas nos ha permitido tener una mejor comprensión y entendimiento de la homeostasis de los tejidos; completando el mapa esquemático de la carcinogénesis; lo que nos ofrece tener otra perspectiva de los mecanismos de quimiorresistencia y quimioterapia; y sobre todo, ha abierto nuevas rutas para entender la biología de los tumores y el desarrollo de nuevos tipos de terapias (Clark, 1991).

Con el descubrimiento de la carcinogénesis química ha sido posible producir tumores experimentales en animales y con estos modelos experimentales también ha sido posible analizar los diferentes estados de la carcinogénesis; el primero que es un proceso rápido llamado de **transformación** y en el se presenta un evento inicial el cuál altera el ADN celular por medio de una mutación lo que convierte a la célula en inmortal, el segundo que es un cambio lento y progresivo llamado de **promoción** en el cual se intenta reparar el ADN alterado, se acumulan

mutaciones sucesivas, se promueve la proliferación celular, se inhibe la muerte celular programada, y el tercero que es llamado de **progresión**, donde se presenta una inestabilidad genómica junto con otras mutaciones, la muerte celular programada es expresada en forma irregular, se presenta un fenotipo de resistencia a ciertas drogas, y es aquí donde ocurre la invasión y la formación de metástasis (Ryser, 1971). Diversos estudios han complementado este esquema relativamente simple al proveer otros estados intermedios que ocurren en la carcinogénesis generando enfermedades malignas; estudios genéticos moleculares referentes a carcinoma de colon de tipo hereditario han demostrado que una serie de anomalías genéticas en los cromosomas provoca que se acumule progresivamente en la mucosa del colon adenocarcinoma invasivo (Service, 1994).

El primer cambio inducido por estímulos químicos, físicos o biológicos es una mutación que si no es reparada se hereda a la progenie de la célula. Por muchos años se supo que las células que sufrían mutaciones se convertían en inmortales al mostrar un acelerado crecimiento, sin embargo, no estaba totalmente claro cómo es que ocurría esto. La inmortalización de la célula no es sinónimo de carcinogénesis, es sólo un pre-requisito para que se desarrolle un fenotipo maligno. Muchas de las líneas celulares de tumores son inmortales, y esto significa que han perdido su capacidad de morir después de cierto número de duplicaciones celulares las cuáles son específicas para cada especie (el cultivo de células humanas presenta aproximadamente 60 duplicaciones). Después del descubrimiento de que la muerte celular programada estaba directamente involucrada en el control genético quedó claro que el trastorno del aparato genético podría deberse a la falta de respuesta, por células malignas, a señales de muerte, desde proto oncogenes hasta genes supresores alterados durante la carcinogénesis y que juegan un papel clave en la regulación de la muerte celular (Kerr et al., 1994; Strasser and Vaux, 1996).

Al analizar en nivel molecular las diferentes etapas la carcinogénesis se ha encontrado que el proceso de evolución neoplásica es muy complicado y el modelo de cáncer de colon nos muestra que múltiples cambios genéticos ocurren después de que la célula ha experimentado expansión clonal (Vogelstein et al., 1988). Estos cambios incluyen mutaciones, rearrreglos cromosómicos, amplificación de genes y el aumento o la pérdida de algunos cromosomas. Se ha estimado que se requieren entre tres y siete eventos genéticos aleatorios e independientes para convertir una célula normal en una célula cancerosa y probablemente se requieran mucho más para que se produzca invasión y formación de metástasis (Baker et al., 1989; Hollstein et al., 1990). Estos trastornos genéticos usualmente incrementan la actividad de algunos oncogenes y eliminan o mutan o suprimen algunos genes, lo que provoca un **incremento** en la proliferación celular y una **alteración** en la diferenciación. Estas dos anomalías han sido consideradas suficientes para explicar el crecimiento de tumores, sin embargo la inhibición de la supresión de células normales que regulan la homeostasis en tejidos ofrece parámetros adicionales para explicar el crecimiento descontrolado de neoplasias malignas. Las anomalías genéticas que ocurren durante las diferentes etapas de la carcinogénesis afectan directamente a la apoptosis, de hecho la inhibición de la muerte celular juega un papel importante en el crecimiento de tumores en conjunto con la estimulación de la mitosis y con la supresión de la diferenciación celular (Clark, 1991).

El balance entre la producción celular y la pérdida celular en los tejidos adultos se denomina homeostasis y garantiza un número constante de células en tejidos y órganos de organismos adultos maduros. Cuando este balance se pierde, se puede presentar atrofia o hiperplasia (Th-

ompton, 1995). Los mecanismos moleculares que proveen el control fino de la homeostasis de los tejidos empieza a ser entendido con mayor precisión, esto incluye infinidad de señales, receptores y segundos mensajeros que se encuentran bajo control genético. Por muchos años el crecimiento descontrolado de células fue considerado tanto el resultado de defectos en el control de genes como el resultado de defectos en la proliferación y diferenciación celular, lo que podría ser una evidencia substancial de que la muerte celular es de vital importancia en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. El crecimiento del cáncer representa una de las más obvias anormalidades en el equilibrio de los tejidos que provoca una ganancia progresiva del número de células la cuál no puede ser solamente explicada por la estimulación continua de la división celular de las clonas de células malignas.

Se ha observado que el tiempo en el que se lleva a cabo el ciclo celular en células de tumores malignos en humanos es mayor que en células humanas y es aceptado de manera general que el crecimiento de tumores muestran una actividad mitótica elevada, aunque existen muchos ejemplos en los cuales es verdaderamente difícil encontrar una figura mitótica en una sección numerosa de tejidos como es el caso del carcinoma de próstata (Nowell, 1976), sin embargo, no hay que perder de vista que el incremento de la replicación celular no es la única explicación del continuo incremento de células ya que por otro lado la inhibición del rango normal de la pérdida de células es otro factor de importancia en este proceso. En diferentes tejidos las células parecen coexistir bajo un control social que requiere de señales de sobrevivencia de otras células las cuales evitan que el programa de muerte celular se active. Una célula con una mutación hereditaria afecta la muerte celular o estimula la producción de factores autócrinos de sobrevivencia lo que provoca un crecimiento celular en un ambiente antisocial. La relación entre la replicación celular y la muerte celular se podría definir como el rango de crecimiento del tumor en cuestión (Clark, 1991; Kerr et al., 1994). Muchos de los cánceres surgen de una simple célula que es monoclonal de origen y durante la progresión del tumor provoca una gran inestabilidad genética ya que se deriva en varios clones, y muchas de las enfermedades malignas muestran la existencia de poli clones que se expresan de diferentes maneras (Nowell, 1976).

La supresión de la muerte celular se hace presente durante la carcinogénesis, sin embargo, nunca se suprime el mecanismo apoptótico por completo, las células pueden perder genes apoptóticos clave como el p53 o pueden tener altos niveles en la expresión del gen antiapoptótico Bcl-2 conservando la habilidad de experimentar apoptosis (Harrington et al., 1994). En términos de replicación celular, los tumores contienen cuatro poblaciones de células neoplásicas: i. células del ciclo celular, ii. células que pueden ser reclutadas al ciclo celular, iii. células que no son capaces de dividirse porque están parcialmente diferenciadas y iv. células apoptóticas o células que están muriendo. Por muchos años las estrategias terapéuticas han sido dirigidas en contra de las poblaciones (i. y ii.) sin embargo recientemente se han realizado esfuerzos importantes enfocados a estimular terapias novedosas hacia la muerte celular ya que es de vital importancia en tumores malignos, tanto para oncólogos clínicos como para los experimentales (Fisher, 1994).

Durante el proceso de carcinogénesis ocurren mutaciones que afectan a muchos de los genes que regulan la muerte celular programada, dichos genes, pueden ser agrupados en dos grandes categorías: i. los **represores**, los cuales al expresarse pueden prevenir o eliminar la muerte celular y ii. los **inductores**, los cuales al expresarse pueden inducir directamente la muerte celular o incrementar la susceptibilidad de las células a la inducción de estímulos de muerte (Kerr et al.,

1994; Strasser and Vaux, 1996). Muchas células malignas muestran cambios en la expresión de sus genes, presentan mutaciones en sus genes, o eliminan oncogenes y antioncogenes; tales genes pueden ser Bcl-2, p53, myc, ras, alterando el programa genético de la eliminación celular. Otros cambios ocurren a nivel de receptores celulares, tales como APO-Fas Ligando y receptores de TNF; también se muestran cambios en la actividad de las proteasas y de la familia ICE, y cambios en la señalación de la ceramida-esfingomielina (Strasser and Vaux, 1996).

La mutación del gen p53 es una de las lesiones genéticas más comúnmente observadas en el surgimiento espontáneo de tumores. Más del 50% de todos los cánceres humanos presentan alguna anomalía en p53, y las mutaciones de p53 se caracterizan por que presentan características hereditarias en los diferentes cánceres humanos (Hollstein, 1991). El papel central de las alteraciones del p53 en la carcinogénesis ha sido confirmado en diferentes estudios con animales (Kastan et al., 1992), en ratones transgénicos que contienen múltiples copias de una variedad del gen p53 que ha sido mutado se observa el desarrollo de un 30% de tumores en pocos meses (Kastan et al., 1992).

Este gen supresor juega un papel importante como mediador del ciclo celular ya que detiene el mismo cuando detecta algún daño en el ADN. Se ha demostrado que cultivos de células tratadas con agentes que dañan el ADN detienen su ciclo celular en G1 y presentan un dramático incremento en la expresión del gen p53 (Kastan et al., 1992), en contraste con esto, en células de tumores o en células normales que carecen de p53 no se detiene el ciclo celular en G1 después de que son expuestas a radiaciones (Kastan et al., 1992).

Se ha postulado que p53 es un mediador del ciclo celular ya que detiene la fase G1, proporcionándole a la célula suficiente tiempo para que repare su ADN dañado por alguna lesión genética evitando que se propague dicha lesión si la célula entra en la fase S prematuramente; por lo que p53 juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genética y su pérdida incrementaría la presencia de anomalías genéticas que derivarían en un incremento en la susceptibilidad a transformaciones malignas. Es por esto que p53 es tan importante en la apoptosis, presumiblemente cuando se produce algún daño irreparable en el ADN por radiaciones o por otros agentes el p53 activa el programa de muerte celular para prevenir la propagación del daño genético. Cuando p53 es suprimido o sufre mutaciones aparecen un gran número de cánceres afectando a células que son incapaces de experimentar apoptosis; así las células que han perdido al gen p53 no pueden detener su ciclo celular y como consecuencia el ADN dañado pasa sin restricción a la fase S antes de que ocurra alguna reparación lo que incrementa la acumulación de mutaciones y la célula se mantiene viva aunque la apoptosis sea inhibida (Kastan, 1991; Yonish-Rouach et al., 1991; Shaw et al., 1992). Aún no está bien definido cómo es que el ADN dañado estimula la expresión de p53 y cómo es que este gen regula la activación de la muerte celular programada o por qué el p53 detiene el ciclo celular en la fase G1 en algunas células cancerosas.

El gen Bcl-2 es un inhibidor de apoptosis (Korsmeyer, 1992) ya que promueve la sobrevivencia celular ante diversos estímulos como podrían ser drogas genotóxicas, radiación por ionización y el uso de glucocorticoides (Sentman et al., 1991; Reed, 1994). El papel de este gen antiapoptosis en la génesis de linfoma y de otros cánceres como el cáncer prostático independiente de andrógenos aún no está bien definido; en ratones Bcl-2 transgénicos se ha encontrado que

tumores B-linfoideos aparecen pero solamente después de un largo periodo de latencia, lo que sugiere la necesidad de que se presenten mutaciones adicionales, por lo que la sobreexpresión de myc puede cooperar con el gen Bcl-2 al promover diferentes cánceres (Hermeking and Eick, 1994), y presumiblemente la cooperación de otros oncogenes como ras, es necesaria para que se lleve a cabo la transformación maligna (Fernandez Sarabia and Bischoff, 1993).

Al ser expresado por diferentes tumores Bcl-2 nos podría mostrar la quimio resistencia o la radio resistencia incrementando con esto los pronósticos clínicos actuales. La posibilidad de usar al gen Bcl-2 como un marcador indirecto de resistencia a muerte celular es un punto de gran interés en la actualidad y éste ya ha sido usado en algunas neoplasias hemato inmunológicas tanto como en otro tipo de cánceres.

Myc puede promover apoptosis tanto como proliferación, y esta doble actividad es asociada con señales de sobrevivencia ya que podría proveer seguridad, sin embargo en el caso de que se presente una mutación, el gen Bcl-2 inhibiría la actividad apoptótica de myc y la convertiría en actividad proliferativa. El proto-oncogen c-myc coopera con el gen supresor de tumores p53. En fibroblastos inmóviles de ratones experimentales que expresan la proteína p53 en su forma nativa, la activación de c-myc induce tanto apoptosis como un reingreso al ciclo celular; en contraste, en fibroblastos inmóviles de ratones experimentales que carecen de la proteína p53, la activación de c-myc induce el reingreso del ciclo celular pero no induce la apoptosis (Hermeking and Eick, 1994). Estos mecanismos sugieren que p53 actúa como un mediador de apoptosis ya que adopta el papel de un mecanismo de seguridad al prevenir la proliferación celular inducida por la activación del oncogen.

Muerte celular neuronal durante el desarrollo y en la enfermedad

Durante la década pasada emergieron con gran fuerza la muerte celular programada y la apoptosis tratando de describir las consideraciones morfológicas dentro del mecanismo de estudio de traducción de señales intracelulares. Análogo a esta señalización de eventos que regulan la proliferación y diferenciación, las señales que se encargan de mediar la muerte celular en las neuronas requiere de factores extracelulares para activar los receptores transmembranales. Los ligandos unen a los receptores, así como Fas Ligando (FasL) y el Factor Necrosante de Tumores (TNF) que unen a los receptores Fas y TNF respectivamente orquestando un ensamble de complejos multiproteínicos y la formación de segundos mensajeros que transmiten señales de muerte celular a células sanas y funcionales. Muchos de los caminos que señalizan la apoptosis han sido identificados así como muchas de las proteínas que participan en los mismos han sido caracterizadas y todo esto se ha asociado con mecanismos de muerte celular neuronal y con factores neurotróficos que regulan la sobrevivencia neuronal y la apoptosis.

Los receptores neurotróficos son una familia de cinco factores de crecimiento polipeptídicos que promueven la diferenciación y la sobrevivencia neuronal; estos son el factor nervioso de crecimiento (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y las neurofinas 3, 4/5 y 6 (NT-3, NT-4/5 y NT-6) (Snider, 1994); cada neutropina es mediadora de la acción en respuestas neuronales y se une a dos clases de receptores celulares de membrana que son el receptor de

neurofinas de baja afinidad (p75) y los miembros de la familia Fas/TNF. El primer tipo de receptor es el p75 que se une a todas las neurofinas e influencia la alta afinidad del NGF uniendo y ligando la internalización lo que lo hace jugar un papel definido en la apoptosis; el segundo tipo de receptor consiste en la familia de tirosina cinasas (familia Trk) compuesta por TrkA, TrkB y TrkC quienes comparten hasta en un 50% su secuencia en sus dominios extracelulares y un 85% en sus dominios citoplasmáticos. TrkA, TrkB y TrkC sirven como receptores para NGF, BDNF y NT-3 respectivamente, mientras que TrkA y TrkB pueden también actuar como receptores para NT-4/5 (Snider, 1994). Otras moléculas que también influyen la diferenciación y la sobrevivencia de neuronas en la periferia y en el sistema nervioso central incluyen a miembros de la familia de las neurocinas, incluyendo el factor neurotrófico ciliar (CNTF), al factor inhibitorio de leucemia (LIF), y a otros factores neurotróficos de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de insulina (IGF), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) y proteína morfogénica de unión (BMP) (Snider, 1994).

En tejidos no neuronales los receptores neurotróficos juegan algún papel definido como es el caso del corazón, intestino, hígado, testículos, riñón y músculo liso vascular (TrkC) (Klein et al., 1989).

El papel de NGF durante el desarrollo del sistema nervioso simpático es crítico (Levi-Montalcini, 1987). NGF es producido en cantidades limitadas por tejidos blanco, los procesos promotores de la formación y el mantenimiento de la inervación por la respuestas de neuronas en orden de corresponder al número de neuronas que inervan al área en cuestión se realiza de acuerdo con las necesidades de cada tejido; de hecho, en el periodo perinatal, aproximadamente el 50% de esas neuronas mueren por muerte celular programada cuando sus axones alcanzan sus blancos en condiciones de concentraciones limitadas de neurotrofina; y este modelo es comprobado por experimentos en los cuáles la administración de NGF exógeno en los tejidos blanco aumentan la densidad de inervación (Levi-Montalcini, 1987).

La importancia de los receptores de neurotrofina radica en que promueven la sobrevivencia neuronal y regulan el número de neuronas (Snider, 1994) y cada receptor de neurotrofina juega un distinto papel en el desarrollo del sistema nervioso de los mamíferos, por ejemplo, la destrucción de blancos para el receptor TrkA/NGF provoca muerte neuronal extensiva en neuronas trigeminales, simpáticas y de la médula dorsal (tres blancos específicos de NGF) disminuyendo con esto la actividad colinérgica en la parte anterior del cerebro (Smeyne et al., 1994). Destrucción similar en blancos para los receptores TrkB y TrkC resulta en deficiencias específicas en el sistema nervioso periférico (Klein et al., 1993) mientras que en el sistema nervioso central han sido difíciles de evaluar (Klein, 1994). En diferentes estados de desarrollo, maduración y envejecimiento, diferentes neuronas pueden adquirir o perder la dependencia de neurotrofinas particulares, de hecho, el papel de las neurotrofinas durante la vida y la muerte de una neurona en particular está sujeto a una regulación dinámica de los cambios.

Evidencia genética y bioquímica implica a la familia de proteasas ICE/CED-3 en la mayoría si no es que en todos los caminos de señalamiento de muerte celular fisiológica (Cryns and Yuan, 1996; 1997). Esta superfamilia de proteasas comparte un pentapéptido QACXG como sitio activo con una absoluta dependencia de la actividad catalítica de la cisteína (Alnemri et al., 1996; Yuan et al., 1993; Nicholson et al., 1995). Una vez activadas todas las caspasas rompen enlaces de

proteínas en residuos específicos de aspartato (Thornberry et al., 1992; Wilson et al., 1994) han observado que en *C. elegans* la mutación de ced-3 elimina el programa de muerte celular, lo cual ocurre durante su desarrollo por lo que estos datos indican que ICE es capaz de iniciar con el proceso de muerte en numerosas poblaciones de sistemas invertebrados. En cultivos de células de médula espinal con una microinyección de crmA que es un inhibidor específico de las proteasas ICE se protege a estas neuronas de la apoptosis al retirarse el NGF (Gagliardini et al., 1994), este trabajo sumado a otros realizados sugiere que la cisteín proteasa es un efector clave en la muerte celular en el sistema nervioso de los vertebrados.

Las proenzimas de las caspasas están presentes en las células sanas por lo que no requieren de un proceso de inducción durante la apoptosis (Weil et al., 1996) por lo que la activación es escasamente controlada por la regulación negativa, y esto toma tintes complejos al observar la presencia y la co-expresión de todas las caspasas que han sido identificadas en la misma célula (Alnemri et al., 1996; Greidinger et al., 1996; Takahashi et al., 1996). Diferentes caspasas desempeñan funciones redundantes; de hecho CPP32 es autocatalítica cuando se inicia la apoptosis (Wilson et al., 1994) y también regula la actividad de otras caspasas y puede ser activada por las mismas, como es el caso de cuando es activada por Mch α . (Takahashi et al., 1996) o por proteasas de linfocitos citotóxicos o por granzima B (Martin et al., 1996). Así la activación secuencial de la cascada de las proteasas puede amplificar la apoptosis y dicha activación puede ser iniciada en estados de homeostasis. Una vez activadas, las caspasas se involucran rápidamente en una serie de procesos biológicos, incluyendo la destrucción de sitios de unión en substratos celulares (Fraser et al., 1996) tanto como en la activación de rutas de señalamiento (Pronk et al., 1996; Juo et al., 1997).

Hasta que no se tenga un total entendimiento de el señalamiento de las caspasas nos quedaremos con el postulado que indica que la degradación selectiva de uno o más substratos de las caspasas resulta en la muerte de la célula y que este fenómeno se transmite por herencia de generación en generación. La apoptosis es un activo proceso celular que involucra tanto a células sanas como a células en condiciones patológicas tales como enfermedades neurodegenerativas, enfermedad vascular cerebral (EVC) y enfermedad de Alzheimer.

Muerte celular en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la cuarta causa de muerte en el primer mundo además de ser la primera causa de demencia en la senectud. Afecta principalmente al 12% de los individuos mayores a 65 años y este porcentaje aumenta a 45% para individuos de 85 años (Evans et al., 1989). Típicamente se presenta en los pacientes una pérdida de la memoria, cambios de personalidad y disturbios de comportamientos. Una premisa común es la pérdida irreversible de la función cerebral por la destrucción de las sinapsis y la pérdida de neuronas que hacen estas sinapsis.

Si la apoptosis es un mecanismo de degeneración neurítica y de muerte celular en la enfermedad de Alzheimer, entonces es posible identificar a los inductores moleculares que se encargan de regular este mecanismo (Benitez-Briebesca L, 1996). Uno de estos agentes podría ser

el péptido β -amiloide, el cual es un aminoácido generado de un proceso proteolítico y precursor de la proteína amiloide la cual ha sido implicada como un factor crítico en la neurodegeneración de la enfermedad de Alzheimer.

La apoptosis es generalmente definida con un estricto criterio morfológico que incluye la contracción de las células, el englobamiento de las membranas, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear. La fragmentación nuclear es acompañada por el desdoblamiento del ADN en fragmentos largos de oligonucleosomas detectables por gel de electroforesis en muchos de los modelos de apoptosis (Duke et al., 1983; Tepper and Studzinski, 1992; Zakeri et al., 1993). El proceso de degradación de ADN produce una serie de fragmentos de ADN el cual contiene hidroxilos terminales los cuales pueden ser etiquetados por enzimas como la desoxinucleotidil transferasa terminal; se ha reportado que las células presentes en la enfermedad de Alzheimer muestran niveles altos de cadenas rotas por lo que al usar la desoxinucleotidil transferasa terminal muchas de las células exhiben una actividad apoptótica al mostrar un encogimiento, una forma celular irregular y la presencia de cuerpos apoptóticos consistentes con los criterios morfológicos observados en la apoptosis (Duke et al., 1983; Zakeri et al., 1993).

Otros marcadores bioquímicos están también siendo utilizados para reconocer la apoptosis en los tejidos de la enfermedad de Alzheimer como es el caso de c-Jun, mecanismos locales de degeneración y la sobreexpresión de la proteína fodrina en el citoesqueleto, la cual sugiere que es un sustrato de muerte para las caspasas (ICE/Ced-3) (Martin and Green, 1995; Martin et al., 1995; Vanags et al., 1996) por lo que es posible que diferentes mecanismos apoptóticos participen en el proceso de degeneración.

Es bien sabido que varios miembros de la familia Bcl-2 pueden regular la sobrevivencia de las células por lo que la pérdida de este mecanismo protector puede iniciar con algunos aspectos del programa de la muerte celular y dañar al ADN. En linfocitos humanos se ha mostrado que Bcl-2 protege de daño al ADN y de la consecuente ruptura de las cadenas del mismo (Reed, 1994). Cuando se presenta un daño en el ADN este es reparado y una de las enzimas que participa en esta reparación es Ref-1, por lo que un aumento en la expresión de Ref-1 nos indica que ADN está siendo reparado y que c-Jun quien es un regulador transcripcional se encuentra en actividad (Abate et al., 1990).

Aspectos genéticos y moleculares de la apoptosis en los ovarios

Como el mayor órgano endócrino, el control de la apoptosis en el ovario por hormonas sistémicas y locales es extremadamente complejo; dada la complejidad y la especificidad de las especies es que existe una regulación de apoptosis en el ovario. Esfuerzos e investigaciones dirigidos hacia la evaluación de efectos intracelulares en la muerte celular fisiológica puede proveer datos de gran importancia para el entendimiento de las bases de la apoptosis en el ovario en los vertebrados, lo cual está apoyado por una sólida fundación de investigación derivada de análisis genéticos y moleculares de apoptosis en tejidos extra gonadales y en células de tumores (Korsmeyer, 1995; Wyllie, 1995; Patel et al., 1996; Yang and Korsmeyer, 1996) y estas investigaciones revelan la existencia de genes y señales intracelulares conservadas a lo largo de

la evolución y que son las encargadas de la sobrevivencia celular o de la muerte en diversos tejidos, incluyendo al ovario.

Es un hecho que el incremento de efectores de muerte celular y también que los miembros de la familia Bcl-2 han emergido como los principales responsables de la cascada de eventos activando o inhibiendo la apoptosis (Korsmeyer, 1995; Yang and Korsmeyer, 1996) además de que reportes recientes han encontrado un vínculo entre Bcl-2 y la función mitocondrial (Zamzami et al., 1996). Evidencia directa que involucra a la mitocondria con la apoptosis sugiere que el papel del metabolismo celular y la generación de especies de oxígeno reactivo se encuentran estrechamente relacionadas (Buttke and Sandstrom, 1994) y en este sentido Bcl-2 ha demostrado prevenir la muerte celular inducida por acumulación de radicales libres de oxígeno (Hockenberry et al., 1993; Kane et al., 1993) y esta función fue atribuida a la localización intracelular en la membrana mitocondrial (Hockenberry et al., 1990; Krajewski et al., 1993) lo que implica que la mitocondria es un contribuidor directo para la iniciación de la apoptosis vía la activación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Zamzami et al., 1993; Marchetti et al., 1996), y se han relacionado acciones antiapoptóticas de Bcl-2 (Zamzami et al., 1996) con acciones proapoptóticas de Bax en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Xiang et al., 1996).

En el ovario, muchas de las proteínas que regulan la apoptosis codifican para la familia de genes Bcl-2 e investigaciones recientes sugieren que el incremento en la expresión de el factor de susceptibilidad hacia la muerte, Bax, se encuentra relacionado con la apoptosis en células granulosa y en células del cuerpo lúteo (Knudson et al., 1995), de hecho ratones experimentales con el gen Bax destruido no son capaces de expresar la proteína funcional Bax mostrando un gran número de anomalías fenotípicas en el ovario, incluyendo aparentes defectos en la inducción normal de apoptosis en células granulosa (Knudson et al., 1995). Es importante la significancia clínica de estas observaciones en el mantenimiento de la fertilidad en mujeres jóvenes tratadas de cáncer (Benitez-Bribiesca L, 1996).

Otro componente central en la señalización de la muerte celular, particularmente en células tumorales expuestas a quimioterapia o radioterapia es la proteína antioncogénica p53 la cuál representa un ejemplo de una proteína bifuncional involucrada con la regulación de proliferación celular y de muerte celular (Ko and Prives, 1996). La respuesta de p53 promueve la expresión de altas concentraciones de bax (Miyashita and Reed, 1995) mientras que el gen promotor Bcl-2 contiene un elemento represor que se une al p53 iniciando con la supresión de la expresión de dicho gen ((Miyashita et al., 1994). Por tanto la combinación de las acciones de genes como p53 y bax (provocan incremento en la muerte celular) y la combinación de p53 y Bcl-2 (provocan decremento en la muerte celular) favorecen la bioactividad e incrementan el potencial de muerte (Oltavi et al., 1994; Oltavi and Korsmeyer, 1994; Yang and Korsmeyer, 1996). En el ovario la acumulación nuclear de la proteína p53 ha sido identificada en células granulosa de los folículos ováricos; en otros sistemas celulares al activarse p53 se provoca una translocación con el consecuente daño del ADN que provoca una acumulación de diferentes especies de oxígeno reactivo el cuál es un componente importante en el señalamiento de la muerte celular en diversos linajes de células (Kastan et al., 1991; Buttke and Sandstrom, 1994).

Apoptosis en tejidos del ojo durante el desarrollo y en la enfermedad.

La genética de la muerte celular emerge de estudios realizados con el *Caenorhabditis elegans* y en tumores humanos. La función antiapoptótica del gen Bcl-2, inicialmente se descubrió como una proteína que contribuía al desarrollo de tumores humanos en células B linfoides, y se encontró que funcional y estructuralmente estaba relacionado con ced-9 (Hengartner and Horovitz, 1994). Posteriormente mutaciones en ced-3 revelaron el papel de los genes en la cascada proteolítica de las caspasas y de la familia de la enzima convertidora de angiotensina ICE (Yuan et al., 1993). La forma exacta en que los genes Bcl-2 interactúan con la familia de las caspasas aún no está claro del todo, sin embargo evidencia reciente sugiere que la activación de las caspasas puede deberse a la liberación del citocromo c de la mitocondria, y que Bcl-2 y bcl-x_L bloquean la liberación del citocromo c (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). Los efectos antiapoptóticos de Bcl-2 y bcl-x_L se han extendido en muchos tejidos –uno de ellos el tejido ocular- el cual es un real candidato a ser estudiado por su capacidad de inhibir la apoptosis retinal. Varios laboratorios de investigación buscan actualmente explotar la actividad antiapoptótica de estos genes utilizando en ratones transgénicos los promotores de opsina IRBP y los primeros resultados reportados son alentadores (Chen et al., 1996). Estos promotores de opsina han aumentado la expresión del gen Bcl-2 y han hecho que se presenten mutaciones en ratones albinos expuestos a luz brillante por 24 horas. Curiosamente, la expresión de altos niveles de Bcl-2 han sido perjudiciales para los fotorreceptores ya que estos ratones transgénicos pierden las células de sus fotorreceptores a los pocos meses siendo estos resultados excepcionales ya que al realizarse la localización de proteínas por técnicas de inmunocitoquímica se tiene que los fotorreceptores se encuentran en el segmento interno que es donde muchas de las células de la mitocondria residen (Chen et al., 1996).

El cristalino se ha convertido en un objeto de estudio de diferenciación celular y de control de muerte celular ya que su tipo de células son únicas y pueden ser utilizadas con diferentes marcadores de diferenciación que muestran las alteraciones en el desarrollo y que permiten estudiarlas cuantitativamente. Durante la diferenciación normal, las células fibrosas del cristalino pierden su núcleo y sus organelos, y algunos aspectos del reensamble de la apoptosis revela la presencia de fragmentos de ADN definidos y células fibrosas del núcleo al utilizar electroforesis con agarosa y la técnica TUNEL. Estas células no mueren y por tanto no son fagocitadas por sus células vecinas por lo que la apoptosis se ve frustrada, y la localización del gen p53 en el ARNm *in situ* revela la restricción de esta expresión en el epitelio anterior y lateral mas no en la parte central del cristalino, donde encontramos las células que no tienen núcleo (Pam and Griep, 1995). Este proceso de destrucción nuclear es independiente de p53; mientras que la pérdida del núcleo y la diferenciación de las células fibrosas del cristalino fue normal en ratones experimentales con p53, los vasos pequeños involucrados en el desarrollo del cristalino no mueren por apoptosis cuando están maduros, lo que sugiere que el desarrollo del tejido cardiovascular es perturbada por la pérdida de este gen (Pan and Griep, 1995). Al ser investigados los mismos genes en apoptosis retinal, donde se evalúa la diferenciación celular del cristalino se encuentra una acumulación y proliferación anormal de fibras celulares en la parte anterior del cristalino, lo que sugiere que la apoptosis es consecuencia de la activación del gen p53 (Morgenbesser et al., 1994).

Capítulo 9



Conclusiones y perspectivas

Descubrimientos sobre los genes, a partir del estudio de la vida y la muerte de las células de un nemátodo que puso de manifiesto que la regulación del programa de muerte constituye una fuente de plasticidad adaptativa, permitieron comprender mejor los orígenes de las enfermedades ligadas a la degeneración de las células, al identificar los genes que intervienen en la regulación de la 'muerte programada' de las células, es decir el proceso que permite mantener un número apropiado de células en los tejidos, se logró comprender mejor ciertas enfermedades en las que dicho equilibrio se rompe, como el SIDA o el infarto de miocardio, en las que hay un exceso de células perdidas en razón de una 'muerte programada' demasiado importante, o los cánceres, en los que, por el contrario, siguen viviendo y reproduciéndose un número excesivo de células teóricamente destinadas a morir.

Ya que la muerte celular está controlada por información genética, este proceso está sujeto al efecto de mutaciones, las que junto con condiciones del medio ambiente celular constituyen la materia prima de la evolución.

Quedan aún por identificar los genes cuya expresión controla la expresión constitutiva del programa de muerte celular en linfocitos y en neuronas. Por otro lado, existen genes con un efecto protector, para los que a pesar de conocerse los productos génicos y el resultado funcional de su sobreexpresión, aún se desconocen en detalle las bases bioquímicas de su funcionamiento.

Una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos que llevan a la muerte será de gran utilidad para entender y posiblemente tratar entidades patológicas como la enfermedad de Alzheimer, el SIDA y el desarrollo de tumores, que resultan de alteraciones en el programa de muerte celular; en caso de lograr un total entendimiento de dichas bases bioquímicas de los cambios morfológicos podremos conocer la Biología Molecular de las enfermedades y crear nuevas alternativas terapéuticas en áreas tan diversas como el cáncer, los trasplantes, las enfermedades autoinmunes y los procesos inflamatorios sistémicos que revolucionarían a la medicina de hoy en día, ya que se podría individualizar cada entidad patológica en cada individuo y con esto se obtendrían tratamientos específicos e individualizados.

Capítulo 10

Referencias

Abate C, Patel L, Rauscher III FJ, Curran T (1990): Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity *in vitro*. *Science* 249:1157-61.

Aizenman E, Engelberg-Kulka H, Glaser G (1996): An *Escherichia coli* chromosomal 'addiction module' regulated by 3', 5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. *Proc. Natl Acad Sci USA* 93:6059-63

Allen PM (1994): Peptides in positive and negative selection: A delicate balance. *Cell* 76:593-96.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Altman A, Theophilopoulos AN, Weiner R, Katz DH, and Dixon FJ (1981): Analysis of T cell functions in autoimmune murine strains. Detects in production of and responsiveness to IL-2. *J Exp Med* 154:791-801.

Ameisen JC (1996): The origin of programmed cell death. *Science* 272:1278-79

Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T (1994): From AIDS to parasite infection: Pathogen-mediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation. *Immunol Rev* 142:9-51

An B, Dou QP (1996): Cleavage of the retinoblastoma protein during apoptosis: An interleukin 1b-converting enzyme-like protease as candidate. *Cancer Res* 56:438-42.

Anderson MR, Armitage RJ, Naraskowsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH (1993): Fas transduces activating signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 178:2231-35.

Armstrong RC, Aja T, Xiang J, Gaur S, Krebs JF, Hoang K, Bai X, Korsmeyer SJ, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ (1996): Fas-induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem* 271:16850-55.

Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Van Kaer L, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S (1994): Evidence for a differential avidity model of T cells selection in the thymus. *Cell* 76:651-63.

Bachvaroff RT, Ayvazian JH, Skupp S, Rapaport FT (1977): Specific restriction endonuclease degradation of DNA as a consequence of immunologically mediated cell damage. *Transplant Proc* 9:807-12.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro J, et (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217-21.

Bardales RH, Hailey LS, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM (1996): In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infraction. *Am J Pathol* 149:821-29.

Benítez-Bribiesca L (1996): Imágenes de la apoptosis, *Gac Méd Méx.* 132:641.

Berke G (1995): The CTL's kiss of death. *Cell* 81:9-12.

- Bishop J, (1987): The molecular genetics of cancer. *Science* 235:305-11.
- Bodmer, J-L, Burns K, Schneider P, Hofman K, Steiner V, Thome M, Bornard T, Hahne M, Schroter M, Becker K, Wilson A, French LE, Browning JL, MacDonald HR, Tschoop J (1997): TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas (Apo-1)/CD95. *Immunity* 6:79-88.
- Boise LH, Gonzalez Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunes G, Thompson C (1993): Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74:597-608.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D (1996): Involvement of MACH, novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85:803-15.
- Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ (1995): Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267:891-93.
- Brancolini C, Benedetti M, Schneider C (1995): Microfilament reorganization during apoptosis: The role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases. *EMBO J* 14:5179-90.
- Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, Green DR (1995): Cell autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T cell hybridomas. *Nature* 373:441-44.
- Budd RC, Schreyer M, Miescher GC, Mac Donald HR (1987): T cell lineages in the thymus of lpr/lpr mice: Evidence for parallel pathways of normal and abnormal T cell development. *J Immunol* 139:2210-18.
- Buttke TM, Sandstrom PA (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15:7-10.
- Carson, D.A., Ribeiro, J.M. (1993). Apoptosis and disease. *Lancet* 341, 1251 – 1254.
- Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, Rowan KR, Thornberry NA, Miller DK, Rosen A (1996): Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: A fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 183:1957-64
- Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A (1994a): Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 179:1317-30.
- Casciola-Rosen LA, Anhalt GJ, Rosen A (1995): DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* 182:1625-34.
- Casciola-Rosen LA, Miller DK, Anhalt GJ, Rosen A (1994b): Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem* 269:30757-60.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K, Black RA (1992): Molecular cloning of the interleukin - 1 b converting enzyme. *Science* 256:97-100.
- Chen J, Flannery JG, LaVail MM, Steinberg RH, Xu J, Simon MI (1996): Bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7042-47.

- Chinnaiyan A, O'Rourke K, Lane V, Dixit V (1997): Interaction of Ced-4 with Ced-3 and Ced-9: A molecular framework for cell death. *Science* 275:1122-26
- Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duran H, Poirier GG, Dixit VM (1996a): Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-x_L function upstream of the CED-3 like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 271:4573-76.
- Chinnaiyan, A. M. y Dixit, V. M. (1996). The cell – death machine. *Curr. Biol.* 6, 555 – 562.
- Chirmule N, Goonewardena H, Pahwa S, Pasieka R, Kalyanaraman VS, Pahwa S (1995): HIV-1 envelope glycoproteins induce activation of activated protein-1 in CD4⁺ T cells. *J Biol Chem* 270:19364-69.
- Cinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996b): FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:4961-65.
- Clark WH (1991): Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 64:631-44.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH (1993): Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362:849-52.
- Clarke, P.G.H., Clarke, S. (1995). Historic apoptosis. *Nature* 378, 230.
- Cohen DI, Tani Y, Tian H, Boone E, Samelson LE, Lane HC (1992): Participation of tyrosine phosphorylation in the cytopathic effect of human immunodeficiency virus-1. *Science* 256:542-45.
- Cohen JJ (1993): Apoptosis. *Immunol Today* 14:126-30
- Cohen JJ, Duke RC (1984): Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132:38-42
- Cohen JJ, Duke RC, Chervenak R, Sellins KS, Olson LK (1985): DNA fragmentation in targets of CTL: An example of programmed cell death in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 184:493-508
- Cohen, J.J. (1995). Exponential growth in apoptosis. *Immunol. Today* 16, 346 – 348.
- Cohen, J.J. (1996). Apoptosis and its regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 406, 11 – 20.
- Corbeil J, Tremblay M, Richmann DD (1996): HIV-induced apoptosis requires the CD4 receptor cytoplasmic tail and is accelerated by interaction of CD4 with p56^{lck}. *J Exp Med* 183:39-48.
- Cory S: Bcl-2 family and lymphocyte survival (1995): *Ann Rev Immunol* 13:513-43.
- Cowan WM, Fawcett JW, O'Leary DDM, Stanfield BB (1984): Regressive events in neurogenesis. *Science* 225: 1258-1265
- Cryns VL, Bergeron L, Zhu H, Li H, Yuan J (1996): Specific cleavage of a-fodrin during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by an interleukin-1 β -converting enzyme/Ced-3 protease distinct from tye poly (ADP-ribose) polymerase protease. *J Biol Chem* 271:31277-82.
- Cryns VL, Byun Y, Rana A, Mellor H, Lustig KD, Ghanem L, Parker PJ, Kirschner MW, Yuan J (1997): Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis: Identification of

- a novel, small pool expression cloning strategy. *J Biol Chem* 272:29449-53.
- Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC (1995): Activation of the apoptotic protease CPP32 by the cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377:446-48.
- Davingnon JL, Budd RC, Ceredig R, Piguet PF, MacDonald HR, Cerottini JC, Vasalli P, Izui S (1985): Functional analysis of T cell subsets from mice bearing the *Ipr* gene. *J Immunol* 135:3704-9.
- Deng GE, Podack ER (1995): Deoxyribonuclease induction in apoptotic cytotoxic T lymphocytes. *FASEB J* 9:665-69.
- Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin K-M, Krammer PH (1995): Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373:438-41.
- Dieken ES, Miesfeld RL (1992): Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Mol Cell Biol* 12:589-97.
- Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He W-W, Dixit VM (1996a): ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:1621-25.
- Duan H, Orth K, Chinnaiyan AM, Poirier GG, Froelich CJ, He WW, Dixit VM (1996b): ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol Chem* 271:16720-24.
- Duckett, C.S., Thompson, C.B. (1997). The control and execution of programmed cell death: an update. *Biochim. et Biophys. Acta* 1332, 45 – 47.
- Duke RC, Chervenak R, Cohen JJ (1983): Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: An early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6361-65.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M., and Young, J.D.E. (1996). Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.* 275, 48 – 55.
- Duvall E, Wyllie AH (1986): Death and the cell. *Immunol Today* 7:115-19
- Ellis, H. M. y Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 44, 817 – 829.
- Embertson J, Zupancic M, Rivas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Hasse AT (1993): Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362:359-62.
- Enari M, Tanian RV, Wong WW, Nagata S (1996): Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380:723-26.
- Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F (1990): Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345:84-86.
- Estaquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber C-M, Bourez J-M, Ameisen JC (1995): T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: Preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis of CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 182:1759-67.

- Evans DA, Funkestein HH, Albert MS, Scher Pa, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO (1989): Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. *JAMA* 262:2551-65.
- Faucheu C, Diu A, Chan AWE, Blanchet A-M, Miossec C, Hervé F, Collard-Dutilleul V, Gu Y, Aldape RA, Lippke JA, Rocher C, Su MS-S, Livingston DJ, Hercend T, Lalanne J-L (1995): A novel human protease similar to the interleukin-1b converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J* 14:1914-22.
- Feinberg MB (1996): Changing the natural history of HIV disease. *Lancet* 348:239-46.
- Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES (1996): *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7464-69.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994a): CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein ced-3 and mammalian interleukin-1B-converting enzyme. *J Biol Chem* 269:30761-64.
- Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1994b): *Mch2*, a new member of the apoptotic *ced-3/lce* cysteine protease family. *Cancer Res* 55:2737-42.
- Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang L, Yu Z, Croce CM, Salvesen G (1995): *Mch3*, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32. *Cancer Res* 55:6045-52.
- Fernández-Sarabia MJ, Bischoff JR (1993): Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature* 366:274-75.
- Fisher DE (1994): Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell* 78:539.
- Forrester K, Ambis S, Lupold SE, Kapust RB, Spillare EA, Weinberg WC, Felley-Bosco E, Wang XW, Geller DA, Tzeng E, Billiar TR, Harris CC (1996): Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2442-47.
- Fraser A, Evan G (1996): A license to kill. *Cell* 85:781-84.
- Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RKK, Drexler HCA, Rotello RJ, Fishman MC, Yuan J (1994): Prevention of vertebrate neuronal death by the *crmA* gene. *Science* 263:826-28.
- Gerdes K, Rasmussen PB, Molin S (1986): Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3116-20
- Glynn JM, McAelligott DL, Moiser DE (1996): Apoptosis induced by HIV infection in H9 T cells is blocked by ICE-family protease inhibition but not by a Fas (CD95) antagonist. *J Immunol* 157:2754-58.
- Golstein P (1997): Controlling cell death. *Science* 275:1081-82
- Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf M-G, Crouvoisier M, Goujard C, Debord T, Montagnier L (1996): Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons. *J Immunol* 156:3509-20.
- Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace, Jr., AJ, Giaccia AJ (1994): Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase check-point by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 14:6264-77.

- Green DR, Scott DW (1994): Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 6:476-87.
- Greidinger EL, Miller DK, Yamin T-T, Casciola-Rosen L, Rosen A (1996): Sequential activation of three distinct ICE-like activities in Fas-ligated Jurkat cells. *FEBS Lett* 390:299-303.
- Gribben JC, Freeman GJ, Boussiotis VA, Renner P, Jellis CL, Greenfield E, Barber M, Restivo VA, Ke X, Gray GS, Nadler LM (1995): CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:811-15.
- Gupta, S. (1996). Apoptosis / Programmed cell death (a historical perspective). *Adv. Exp. Med. Biol.* 406, 1 – 9.
- Halaby R, Zakeri Z, Lockshin RA (1994): Metabolic events during programmed cell death in insect labial glands. *Biochem Cell Biol* 72:597-601
- Haldar S, Basu A, Croce CM (1997): Bcl-2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 57:229-33.
- Han Z, Malik N, Carter T, Reeves WH, Wyche JH, Hendrickson EA (1996): DNA-dependent protein kinase is a target for a CPP32-like apoptotic protease. *J Biol Chem* 271:25035-40.
- Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA (1997): Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme family protein reduce ischemic and cytotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2007-12.
- Hashida T, Tanaka Y, Matsunami N, Yoshihara K, Kamiya T, Tanigawa Y, Koide SS (1982): Purification and properties of bull seminal plasma Ca²⁺, Mg²⁺-dependent endonuclease. *J Biol Chem* 257:13114-19.
- Heald R, McLoughlin M, McKeon F (1993): Human weel maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated cdc2kinase. *Cell* 74:463-74
- Hengartner MO (1995): Life and death decisions: Ced-9 and programmed cell death in *C. elegans*. *Science* 270:931
- Hengartner MO, Horvitz HR (1994): *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76:665-76.
- Hengartner, M. O. (1998). Apoptosis: Death cycle and swiss army knives. *Nature* 391, 441 – 442.
- Henkart PA, Grinstein S (1996): Apoptosis: Mitochondria resurrected? *J Exp Med* 183:1293-95.
- Henkart, P. A. (1995). Apoptosis: O death, where is thy sting? *J. Immunol.* 154, 4905 – 4907.
- Hermeking H, Eick D (1994): Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 265:2091-93.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M (1995): Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-26.
- Hockenberry D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990): Bcl.2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-36.
- Hockenberry DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993): Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-51.

- Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR (1994): T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.
- Irmiler M, Hofmann K, Vaux D, Tschopp J (1997): Direct physical interaction between the *Caenorhabditis elegans* 'death proteins' CED-3 and CED-4. *FEBS Lett* 406:189-190.
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997): Programmed cell death in animal development. *Cell* 88:347-354 and 407-8
- Jänicke RU, Walker PA, Lin XY, Porter AG (1996): Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 15:6969-78.
- Jiang S, Chow SC, Nioterea P, Orrenius S (1994): Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: Studies using Ca²⁺-ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp Cell Res* 212:84-92.
- Ju S-T, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, El-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A (1995): Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373:333-48.
- June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB (1994): The B7 and CD 28 receptor families. *Immunol Today* 15:321-30.
- Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann HP, Blenus J (1997): Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol* 17:24-35.
- Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K (1993): Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 14:338-39.
- Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talanian RV, Allen H, Banach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P, Mankovich JA, Terranova M, Ghayur T (1995): Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1b - converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 270:15250-56.
- Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE (1993): Bcl-2 inhibition of neural death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262:1274-77.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D et al. (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51:6304-11.
- Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA (1995): Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* 181:2029-36.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Porier GG (1993): Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53:3976-85.
- Kayalar C, Örd T, Testa MP, Zhong L-T, Bredesen DE (1996): Cleavage of actin by interleukin 1b- converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2234-38.
- Kerr JFR, Willie AH, Currie AR (1972): Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide – ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239 – 257.

- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994): Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-26.
- Khodarev NN, Ashwell JD (1996): An inducible lymphocyte nuclear Ca^{2+} / Mg^{2+} - dependent endonuclease associated with apoptosis. *J Immunol* 156:922-31.
- Kim T-W, Pettingell WH, Jung Y-K, Kovacs DM, Tanzi RE (1997): Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 277:373-76.
- Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M (1989): TrkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* 8:3701-9.
- Klein R, S Santiago I, Smeyne RJ, Lira SA, Brambila R, Bryant S, Zhang L, Snider WD, Barbacid M (1994): Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates la muscle afferentes and results in abnormal movements. *Nature* 368:249-51.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer D (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-36
- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WB, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995): Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270:96-99.
- Ko LJ, Prives C (1996): p53: Puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054-72.
- Kolesnitchenko V, Wahl LM, Tian H, Sunila I, Tani V, Hartmanh C-P, Crossman J, Raffeld M, Orenstein J, Samelson LE, Cohen DJ (1995): Human immunodeficiency virus 1 envelope-initiated G2-phase programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11889-93.
- Korsmeyer SJ (1992): Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood* 80:879-86.
- Korsmeyer SJ (1995): Regulators of cell death. *Trends Genet* 11:101-105.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC (1993): Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membrane. *Cancer Res* 53:4701-14.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA (1997): Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18:44-51
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J.L., and Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9, 1277 – 1286.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994): Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-47.
- Lee SL, Wesselschmidt RL, Linette GP, Kanagawa O, Russell JH, Milbrandt J (1995): Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGF1-B (Nur77). *Science* 269:532-35.
- Lenschow DJ, Sperling AJ, Cooke MP, Freeman G, Rhee L, Decker DC, Gray G, Nadler LM, Goodnow CC, Bluestone JA (1994): Differential up-regulation of the B7-1 and B7-2 costimulatory molecules after Ig receptor engagement by antigen. *J Immunol* 153:1990-97.

- Leonardo MJ (1996): Fas and the art of lymphocyte maintenance. *J Exp Med* 183:721-24.
- Levi-Montalcini R (1987): Nerve growth factor: Thirtyfive years later. *Science* 237:1154-64.
- Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C (1995): Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26:1252-57.
- Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ (1996): Cross talk between cell death and cell cycle progression: Bcl-2 regulates NFAT-mediated activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9545-52
- Lippke JA, Gu Y, Sarnecki C, Caron PR, Su MS-S (1996): Identification and characterization of CPP32/*Mch2* homolog 1, a novel cysteine protease similar to CPP32. *J Biol Chem* 271:1825-28.
- Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA (1994): Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor require the immediate-early gene *nur77*. *Nature* 367:281-84.
- Losick R, Stragier P (1992): *Nature* 355:601
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jack T (1993): p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-49.
- Lundgren K, Walmorth N, Booker R, Dembski M, Kirschner M, Beach D (1991): *Cell* 64:1111
- Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR (1995): Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol Today* 16:569-74.
- MacDonald HR, Lees RK (1990): Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature* 43:624-46.
- Majno G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3-15.
- Maki A, Berezsky IK, Fargnoli J, et al. (1992): Role of $[Ca^{2+}]_i$ in induction of *c-fos*, *c-jun*, and *c-myc* RNA in rat PTE after oxidative stress. *FASEB J* 6:919-24.
- Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeflner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G (1996): Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184:1155-60.
- Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, Chaung T-H, Casiano CA, O'Brien GA, Fitzgerald P, Tan EM, Bokoch GM, Greenberg AH, Green DR (1996): The cytotoxic cell protease granzyme B apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J* 15:2407-16.
- Martin SJ, Green DR (1995): Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82:349-52.
- Martin SJ, O'Brien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A, Saido TC, Green DR (1995): Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270:6425-28.
- Matlashewsky G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, and Levine A (1984): Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J* 3:3257-62.
- Medema, J.P. (1999). Apoptosis: Life and death in a flash. *Nature* 398, 756 – 757.

- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA (1996): Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272:1167-70.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993): Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75:653-60.
- Miura, M. y Yuan, J. (1996). Regulation of programmed cell death by interleukin - 1 β - converting enzyme family of proteases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 389, 165 - 172.
- Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC (1994): Identification of p53-dependent negative response element in the Bcl-2 gene. *Cancer Res* 54:3131-35.
- Miyashita T, Reed JC (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-99.
- Montoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, Loh DY (1995): Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-X-deficient mice. *Science* 267:1506-10
- Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA (1994): p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* 371:72-74.
- Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, Casano FJ, Miller DK, Molineaux SM, Yamin T-T, Yu VL, Nicholson DW (1995): Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICE_{rel} II and ICE_{rel} III, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Bio Chem* 270:15870-76.
- Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY (1990): Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR thymocytes in vivo. *Science* 250:1720:23.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Kreamer PH, Peter ME, Dixit VM (1996): FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817-27.
- Nagata S (1997): Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-65
- Nagata S, Goldstein P (1995): The Fas death factor. *Science* 267:1449-56
- Nardelli B, Gonzalez CJ, Schechter M, Valentine FR (1995): CD4⁺ blood lymphocytes are rapidly killed in vitro by contact with autologous human immunodeficiency virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7312-16.
- Negulyaev YA, Vadernikiva EA, Maximov AV (1996): Disruption of actin filaments increases the activity of sodium-conducting channels in human myeloid leukemia cells. *Mol Biol Cell* 7:1857-64.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin P, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37-43.
- Nossal GJV (1994): Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229-39.
- Nowell PC (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23-28.
- Oltavi ZN, Korsmeyer SJ (1994): Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 79:189-92.
- Oltavi ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993): Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609-19.

- Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM (1996a): The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 271:16443-46.
- Orth K, O'Rourke K, Salvesen GS, Dixit VM (1996b): Molecular ordering of apoptotic mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J Biol Chem* 271:20977-80.
- Osborne BA, Smith SW, Mcauglin KA, Grimm L, Kallinch T, Schwartz LM (1994): Identification of genes induced during apoptosis in T lymphocytes. *Immunol Rev* 142:301-20.
- Oshimi Y, Miyazaki S (1995): Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca²⁺ level. *J Immunol* 154:599-609.
- Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S (1994): Cross-linking of CD4 molecules puregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha secretion. *Blood* 84:2622-31.
- Page DM, Kane LP, Allison JP, Hedrick SM (1993): Two signals are required for negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *J Immunol* 151:1868-80.
- Palmer JD (1997): Organelle genomes: Going, going, gone! *Science* 275:790-91
- Pan H, Griep AE (1995): Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development. *Genes Dev* 9:2157-69.
- Pantaleo G, Graziozi C, Dermarest JF, Butini L, Montroni M, Fox C, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS (1993): HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stages of disease. *Nature* 362:355-63.
- Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH (1996): The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 10:587-97.
- Pentilla A, Trump BF (1974): Extracellular acidosis protects Ehrlich ascites tumor cells and rat renal cortex against anoxic injury. *Science* 185:277-78.
- Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JJM, Ho DD (1996): HIV-1 dynamics *in vivo*: Virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. *Science* 271:1582-86.
- Piatak M, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk K-C, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD (1993): High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259:1749-54.
- Pronk GJ, Ramer K, Amiri P, Williams LT (1996): Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science* 271:808-10.
- Punt JA, Osborne BA, Takahama Y, Sharrow SO, Singer A (1994): Negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by t-cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J Exp Med* 179:709-13.
- Raff MC (1992): Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993): Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science* 262:695-700

- Reed JC (1994): Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 24:1-6.
- Remuzzi G, 1988: Bleeding in renal failure. *Lancet* 1:1205-08
- Rowe, P. M. (1994). Cell death according to plan. *Lancet* 344, 812.
- Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R (1993): Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4409-13.
- Ryser HJ (1971): Chemical carcinogenesis. *New Engl J Med* 285:721-34.
- Saunders JWJ (1966): Death in the embryonic systems. *Science* 154:604-12
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C (1993): Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14:131-36
- Schwartz LM, Osborne BA (1993): Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 14:582-90
- Schwartz LM, Smith S, Jones MEE, Osborne BA (1993): Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 90:980-84
- Sebzda E, Wallace VA, Mayer J, Young RSM, Mak TW, Ohashi PS, (1994): Mature T cell reactivity altered by peptide agonist that induces positive selection. *Science* 263:1615-18.
- Sedlak TW, Oltavi ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995): Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7834-38.
- Sentman CL, Shutter JR, Hockenberry D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ (1991): Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 67:879-88.
- Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J (1992): Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4495-98.
- Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, Lira SA, Barbacid M (1994): Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted *trk*/NGF receptor gene. *Nature* 368:246-49.
- Smith CA, Williams G, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JT (1989): Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induces death by apoptosis in immature T cells in thymic culture. *Nature* 338:181-83.
- Smith KA (1988): Interleukin-2: Inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-76.
- Smith MW, Phelps PC, Trump BF (1992): Injury-induced changes in cytosolic Ca²⁺ in individual rabbit proximal tubule cells. *Am J Physiol* 262 (Renal Fluid Electrolyte 31):F647-55.

- Snider WD (1994): Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell* 77:627-38.
- Sokolova IA, Cowan KH, Schneider E (1995): $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease activation is an early event in VP-16-induced apoptosis of human breast cancer MCF7 cells *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1266:135-42.
- Song Q, Lees-Miller SP, Kumar S, Zhang Z, Chan DW, Smith GC, Jackson SP, Alnemri ES, Litwack G, Khanna KK, Lavin MF (1996): DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: A target for an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J* 15:3238-46.
- Song Z, McCall K, Steller H (1997): DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science* 275:536-40
- Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, Robertson N, Armstrong RC, Wang L, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Elnemri ES (1996): The Ced-3/interleukin 1 β converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2 are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem* 271:27099-106.
- Steller H (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-49.
- Strasser A, (1995): Life and death during lymphocyte development and function: Evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr Opin Immunol* 7:228-34.
- Strasser A, Harris AW, Cory S (1991): Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67:889-99.
- Strasser A, Vaux DL (1996): The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2239-44.
- Stratling WH, Grade C, Horz W (1984): Ca/Mg -dependent endonuclease from porcine liver: Purification, properties and sequence specificity. *J Biol Chem* 259:5893-98.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S (1993): Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169-78.
- Surch CD, Sprent J (1994): T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100-3.
- Takahashi A, Alnemri AS, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirer GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1996): Cleavage of lamin A by Mch2a but not CPP32: Multiple interleukin 1 β -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8395-8400.
- Tepper CG, Studzinski GP (1992): Teniposide induces nuclear but not mitochondrial DNA degradation. *Cancer Res* 52:3384:90.

- Thompson CB (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-62.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineauw SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJ-F, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin T-T, Lee TD, Shively JE, MacCross M, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ (1992): A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356:768-74.
- Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP (1996): CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384:184-87.
- Trump BF, Berezsky IK (1995): Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* 9:219-28
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14:18) translocation. *Science* 226:1097-99.
- Ueda N, Walker PD, Hsu SM, Shah SV (1995): Activation of a 15-kDa endonuclease in hypoxia/reoxygenation injury without morphologic features of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7202-6.
- Umansky SR, Korol BA, Nelipovich PA (1981): *In vivo* DNA degradation in thymocytes of gamma-irradiated or hydrocortisone-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 655:9-17.
- Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S (1996): Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 271:31075-85.
- Vaux DL (1993): Towards an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:786-89
- Vaux DL, Cory S., Adams JM (1988): Bcl-2 gene promotes mammalian cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-42.
- Vaux DL, Weissman IL, Kim SK (1992): Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human *bcl-2*. *Science* 258:1955-57.
- Vaux, D. L., Haecker, G., Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777 –779.
- Vaux, D. L., Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *PNAS USA* 93, 2239 – 2244.
- Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ (1993): Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229-40.
- Vincenz C, Dixit VM (1997): Fas-associated death domain protein interleukin-1 β -converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/CED-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55- mediated death signaling. *J Biol Chem* 272:6578-83.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-32.

Von Boehmer H (1994): Positive selection of thymocytes. *Cell* 76:219-28.

Walker NPC, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bumb NJ, Ferenz CR, Franklyn S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, Herzog L, Hugunin M, Houy W, Mankovich JA, McGuinness L, Orlewicz E, Paskind M, Pratt CA, Reis P, Summani A, Terranova M, Welch JP, Xiong L, Möller A, Tracey DE, Kamen R, Wong WW (1994): Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 β -converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* 78:343-52.

Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J (1994): *Ich-1*, an *Ice/ced-3*-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78:739-50.

Wang S, Miura M, Jung Y-K, Zhu H, Gagliardini V, Shi L, Greenberg AH, Yuan J (1996): Identification and characterization of *Ich-3*, a member of the interleukin-1 β converting enzyme (ICE)/*Ced-3* family and an upstream regulator of ICE. *J Biol Chem* 271:20580-87.

Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL (1996): Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J* 15:1012-20.

Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H. y Yuan, J. (1994). *Ich - 1*, an *ICE / ced - 3* - related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78, 739 - 750.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992): Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in *Fas* antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-17.

Waterhouse N, Kumar S, Song Q, Strike P, Sparrow L, Dreyfuss G, Alnemri ES, Litwack G, Lavin M, Watters D, (1996): Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases in apoptosis. *J Biol Chem* 271: 29335-41.

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EAD, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM (1995): Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-22.

Weil M, Jacobson MD, Coles HSR, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC (1996): Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 133:1053-59.

Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dien J, Walczak H, Debatin K-M, Krammer PH (1995): Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375:497-500.

White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. y Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264, 677 - 683.

- Whyte, M. y Evan, G. (1995). The last cut is the deepest. *Nature* 376, 17 – 18.
- Williams GT (1991): Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65:1097-98
- Williams MS, Henkart PA (1994): Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis. *J Immunol* 4247-4255.
- Wilson KP, Black J-AF, Thompson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, Livingston DJ (1994): Structure and mechanism of interleukin-1 β -converting enzyme. *Nature* 370:270-75.
- Wu D, Wallen H, Nunez G (1997): Interaction and regulation of subcellular localization of Ced-4 by Ced-9. *Science* 275:1126-29
- Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Nesman W, Gerard C, Sodroski J (1996): CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179-83.
- Wyllie AH (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-56
- Wyllie AH (1995): The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Develop* 5:97-104.
- Wyllie, A. (1998). Apoptosis: An endonuclease at last. *Nature* 391, 20 – 21.
- Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ (1996): BAX-induced cell death may not require interleukin-1 β -converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14559-63.
- Yang E, Korsmeyer SJ (1996): Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 88:386-401.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995): Bad, a heterodimeric partner for Bcl-_{xL} and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285-91.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-32
- Yarmolinsky MB (1995): Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 267:836-37
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M (1991): Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352:345-47.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, and Horvitz HR (1993): The *C. elegans* cell death gene Ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β converting enzyme. *Cell* 75:641-52
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR (1993): The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75:641-52.

- Yuan, J. Y., Horvitz, H. R. (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced - 3* and *ced - 4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev. Biol.* 138, 33 - 41.
- Zacharchuk CM, Mercep M, Chakaborti PK, Simons S Jr, Ashwell JD (1990): Variations in thymocytes susceptibility to clonal deletion during: Implications for neonatal tolerance. *J Immunol* 145:4037-45.
- Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA (1995): Cell death. Programmed, apoptosis, necrosis, or other. *Cell Death Differ* 2:87-96
- Zakeri ZF, Quaglino D, Latham T, Lockshin RA (1993): Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB J* 7:470-78.
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Montgomery I, Castedo M, Kroemer G (1996): Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 183:1533-44.
- Zheng B, Han S, Zhu Q, Goldsby R, Kelsoe G (1996): Alternative pathways for the selection of antigen-specific peripheral T cells. *Nature* 384:263-66.
- Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ (1995): Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377:348-51.
- Zinkernagel RM, Hengartner H (1994): T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus by virus: Implications for HIV and AIDS. *Immunol Today* 15:262-68.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997): Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-13.