

APOPTOSIS, ENFERMEDAD Y TERAPEUTICA*

MARÍA CASCALES ANGOSTO

1. Introducción

El número de células en un tejido se mantiene mediante un estricto equilibrio entre la proliferación y muerte, siendo el reemplazo celular un mecanismo necesario para el normal funcionamiento de los organismos multicelulares. La muerte supone una faceta natural e irremediable de la vida y las células de un tejido han de morir en el lugar y momento precisos para no ocasionar anomalías que conduzcan a estados patológicos. La mayor parte de las células, cuando se lesionan, dejan de ser necesarias o se encuentran en exceso, se autodestruyen por activación de un programa intrínseco regulado a nivel genético. Hasta hace poco se consideraba que las causas del crecimiento celular tenían su base en las vías responsables de la división celular y que el cáncer procedía de una proliferación celular incontrolada. Actualmente han cambiado estos conceptos al haberse demostrado que las células poseen mecanismos internos marcadores del momento de morir y que si se eliminan o alteran estos mecanismos es cuando se desarrolla el cáncer. La homeostasis de un tejido, por tanto, supone un equilibrio esencial entre proliferación y muerte y el crecimiento celular puede derivarse de una muerte disminuída o de una proliferación excesiva. Hace más de veinte años, Kerr, Wyllie y Currie, describieron una serie de cambios que inducían la muerte celular siguiendo un programa suicida fácilmente identificable: las células pierden volumen, su cromatina (complejo DNA y proteínas en el núcleo) se condensa y sus membranas desarrollan protuberancias.

Este programa fué denominado «apoptosis», de la palabra griega *αποπτωση* que significa la caída de la hoja. La apoptosis es un proceso muy conservado a través de la evolución que actúa en concierto con la mitosis para preservar la homeostasis de los tejidos y facilitar su remodelación. Se han descrito numerosos ejemplos de células que sufren la apoptosis por cambios diversos en el medio: por ejemplo, las células de la próstata se programan para morir cuando disminuyen las hormonas masculinas, o ciertas células inmunes sufren la apoptosis cuando se las priva de sus factores de crecimiento o citoquinas.

Para el mantenimiento de la homeostasis celular de un tejido se requiere la presencia de mecanismos que regulen la velocidad de muerte de la misma manera que se regulan las de división y diferenciación. En la apoptosis la célula participa en su propia destrucción, y para ello requiere que su maquinaria sintetizadora de proteínas produzca determinados productos genéticos destinados a ejercer funciones encaminadas a la muerte

* Conferencia pronunciada el 17 de abril de 1997.

celular. La regulación de la apoptosis se basa en la modulación de la síntesis de estas proteínas, que actúan, a su vez, como factores limitantes de la propia apoptosis.

Las células programadas para morir por apoptosis sufren una serie de alteraciones peculiares. Hasta la fecha se han estudiado cuatro fases detectables histológicamente: (1) precondensación, en la cual se inducen los genes apoptogénicos, (2) condensación, en la cual decrecen las interacciones entre la célula que va a sufrir la apoptosis y las células vecinas, (3) fragmentación celular con formación de cuerpos apoptóticos y (4) fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Figuras 1 - 4)

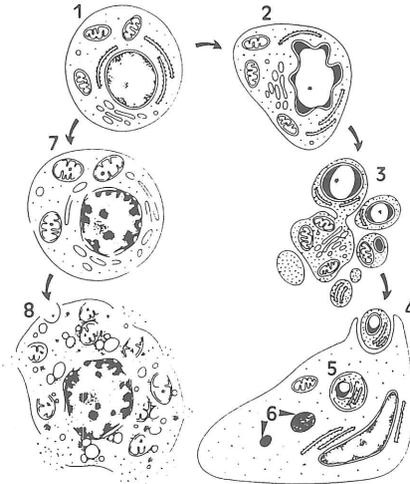


Figura 1. DIFERENCIA ENTRE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA APOPTOSIS (2-6) Y LA NECROSIS (7 Y 8). Una célula normal (1) al iniciarse la apoptosis la cromatina se condensa y se circunscribe en forma de masas en la pared interna de la membrana nuclear, el citoplasma se condensa, pero se preserva la integridad de la membrana y de los orgánulos. En la fase siguiente (3) el núcleo se fragmenta y aparecen protuberancias en la membrana celular, que se separan dando lugar a los cuerpos apoptóticos. Estos son fagocitados por células cercanas (4) y degradados por enzimas lisosómicos (5) reduciéndose a residuos en el interior de telolisomas (6). La necrosis se inicia con un agrupamiento irregular de la cromatina (7) hinchazón de las mitocondrias y aparición de cuerpos densos en sus matrices, disolución de los ribosomas y ruptura de las membranas. Posteriormente (8) se desintegran los componentes celulares y el contenido celular se vierte al exterior.

En la apoptosis, las membranas externas e internas de la célula se encuentran preservadas de forma que el contenido celular permanece en el interior de estas membranas hasta que se verifica la fagocitosis. Esto hace que no aparezcan respuestas inflamatorias alrededor de las células apoptóticas. La necrosis, por el contrario, se asocia con la rotura de las membranas, (Figura 1) salida al exterior del contenido celular e inflamación debida a una lesión tisular masiva que conduce al colapso rápido de la homeostasis interna de la célula. La apoptosis como fenómeno programado requiere la activación de la transcripción y la traducción de genes y puede prevenirse por diferentes estímulos tróficos o mitogénicos. La represión de la apoptosis puede ocasionar una supervivencia celular anormal que conduzca al cáncer. La apoptosis se verifica en células seleccionadas:

lesionadas, preneoplásticas, senescentes, o excesivas. Tal selectividad proporciona las bases para atribuir a la apoptosis un papel protector frente a la enfermedad.

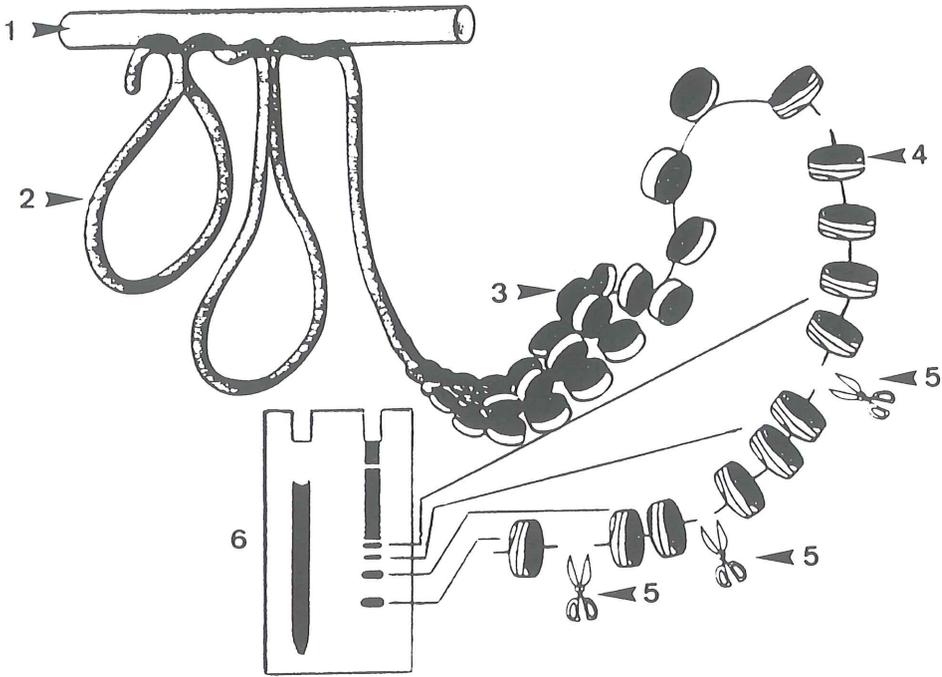


Figura 2.- ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA Y FRAGMENTACIÓN DEL DNA. El núcleo en interfase contiene una proteína matriz (1) en la que se insertan las fibras de cromatina en forma de bucles (2). La fibra de cromatina se presenta como un solenoide contraído que comprende 6 nucleosomas en cada vuelta (3). Los nucleosomas (octámeros de histona) se distribuyen regularmente a lo largo de la doble hélice del DNA, la cual se enrolla dos veces alrededor de cada uno (4). El DNA es más accesible a la rotura en la región situada entre dos nucleosomas (5). Tras la hidrólisis del DNA por las endonucleasas, se liberan fragmentos de DNA de diferente longitud que pueden detectarse por electroforesis en gel de agarosa en forma de bandas escalonadas que se distinguen de la banda continua del DNA sin hidrolizar.

Hoy se considera que la apoptosis es un proceso de importancia crucial para el desarrollo y la homeostasis tisular. Interviene en la formación y crecimiento de los organismos multicelulares (embriogénesis) y en la regulación precisa del número de células, eliminando las no necesarias y potencialmente peligrosas, tales como los linfocitos autoreactivos, las células infectadas por virus y las células tumorales. La apoptosis, como muerte celular altruista, supone un mecanismo de defensa y una protección del organismo frente a la expresión y propagación de mutaciones perjudiciales. Si se considera la apoptosis como muerte celular programada, es obvio que este tipo de muerte puede evitarse de dos maneras: por eliminación de lo que pudiera llamarse *señal de muerte*, o por reparación o restauración de las estructuras moleculares lesionadas por esta señal. En uno u otro caso el resultado final ha de suponer el bloqueo de la muerte.

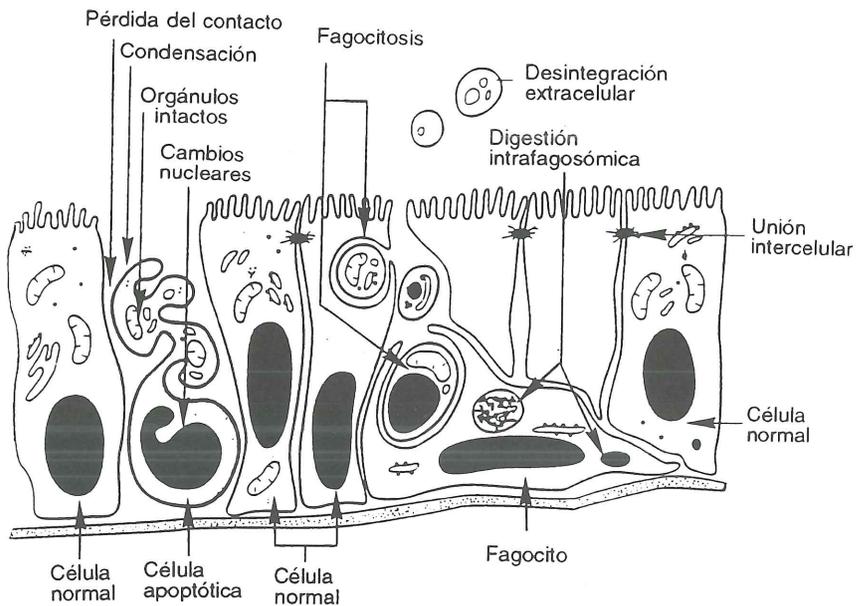


Figura 3.- CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN UN TEJIDO.

La iniciación de la apoptosis se encuentra bajo un estricto control, pues son muchas las señales exógenas y endógenas, inductoras o represoras, las que van a influir sobre la decisión final entre la vida y la muerte. Entre estas señales se encuentran, las relativas al linaje celular, las lesiones infligidas por radiaciones ionizantes o virus, los factores extracelulares de supervivencia, las interacciones celulares y las hormonas. La activación o inactivación inapropiadas de la apoptosis conduce a estados patológicos. Hoy se sabe que un exceso de apoptosis aparece en enfermedades tales como el SIDA, las degenerativas y la agresión isquémica. El hecho de que la apoptosis represente un mecanismo activo dirigido a nivel genético, hace que se intente su regulación mediante agentes que actúen induciendo o inhibiendo la expresión genética de los productos responsables de la puesta en marcha de la maquinaria apoptótica. La apoptosis, al igual que el ciclo celular, no se verifica a través de una simple cascada metabólica, surge como consecuencia de un complejo entramado de vías que se influyen mutuamente y confluyen en su progreso o inhibición.

Otra diferencia entre los mecanismos de muerte celular por apoptosis o por necrosis, es que el primero depende de la disponibilidad intracelular de una serie de proteínas clave, entre ellas una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio, responsable de la fragmentación del DNA (Figura 3). Cualquier inhibidor de esta nucleasa, como los iones zinc, previene la muerte por apoptosis.

La muerte celular programada es esencial en muchos procesos fisiológicos: la embriogénesis, la atrofia tisular, la regresión tumoral y la regulación inmune. En el timo se verifica la pérdida clonal de células T inmaduras autoreactivas, al inducirse la apoptosis

mediante activación del receptor del antígeno. En la perifería, se observa una inducción no apropiada de la apoptosis en las células T4 y T8 que fueron activadas *in vivo*, en casos agudos de mononucleosis infantil benigna producida por el virus de Epstein-Barr. Esta apoptosis de las células T es transitoria y ejerce un papel beneficioso en el control de la infección vírica. Sin embargo, el mismo fenómeno puede ser perjudicial si interfiere con la renovación de las células efectoras. La correlación entre la apoptosis de las células T y la patogénesis del SIDA sugiere que en la infección con el HIV, el mecanismo que produce la pérdida de estas células puede contribuir a la desaparición de las T4 y al desarrollo de la enfermedad.

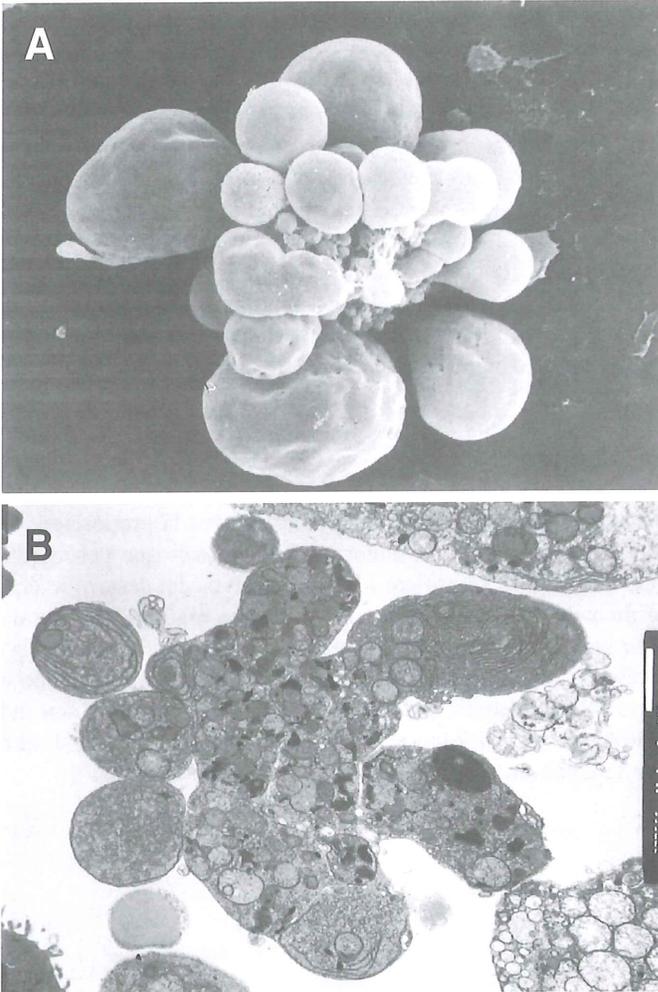


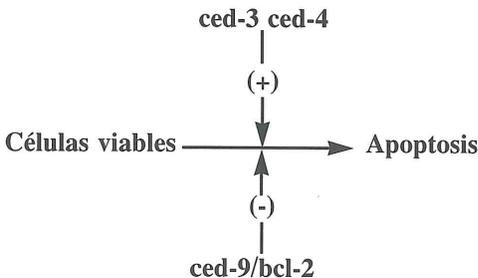
Figura 4.- CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN HEPATOCITOS APOPTÓTICOS. (A) Morfología obtenida por microscopía electrónica de barrido, de la superficie de un hepatocito cultivado en presencia de glicodesoxicolato 50 μM , que sufre apoptosis. Se observa la pérdida de microvellosidades y los cuerpos apoptóticos rodeados de membrana. x2.500 aumentos. (B) Ultraestructura celular, obtenida por microscopía electrónica de transmisión, de un hepatocito cultivado en presencia de glicodesoxicolato 50 μM , en el momento de sufrir la apoptosis. Se observa la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos que incluyen orgánulos. x 4.000 aumentos.

En términos generales, una célula puede encaminarse hacia la apoptosis después de recibir un estímulo específico apoptogénico que puede ser una señal fisiológica y no tiene por qué causar lesión en la célula. Por ejemplo, en células dependientes de citoquinas, la eliminación de esas citoquinas del medio es suficiente para provocar la apoptosis. Estas células, antes de sufrir la carencia de citoquinas, se encontraban en condiciones suficientemente saludables como para mantenerse vivas y proliferar.

Otro aspecto de la apoptosis que promueve interés es el hecho de que puede ser evitada eludiendo los controles normales que conducen a ella. El que las células destinadas a morir eviten hacerlo puede desencadenar un crecimiento maligno. Se consideran células cancerosas aquellas que evaden los controles normales del crecimiento celular y proliferan a una mayor velocidad debido a la expresión alterada de oncogenes tales como el *myc* y el *ras*, o a la pérdida de los genes supresores de tumores como el *p53*. Si el crecimiento celular puede modularse regulando la muerte celular, es obvio que la malignidad celular ha de derivar también de la evasión de este punto final de control. La expresión de diversos oncogenes puede afectar la velocidad de la apoptosis en el interior de un tumor. En fibroblastos que sobreexpresan el protooncogen *c-myc* se producen tumores indolentes con velocidades altas de mitosis y de apoptosis. Sin embargo, las células que sobreexpresan el oncogén *ras*, producen tumores muy metastáticos con velocidades elevadas de mitosis y disminuidas de apoptosis. Esto demuestra que la baja incidencia en apoptosis, acoplada con una elevada velocidad mitótica, favorece el crecimiento celular no restringido que conduce al cáncer.

2. Los Genes Suicidas

Una ayuda clave en la búsqueda de los genes suicidas la proporcionó un gusano microscópico redondo y transparente *Caenorhabditis elegans* que posee 1090 células. En este nematodo se han podido identificar los genes activos del desarrollo embrionario, trazando el linaje de cada célula a medida que el gusano madura. De esta manera ha sido posible encontrar que de las células embrionarias del gusano, 131 sufren la apoptosis durante su desarrollo. Entre los genes identificados por Horvitz y su grupo en el Instituto de Tecnología de Massachussets, dos de ellos, el *ced-3* y el *ced-4*, son inductores de la apoptosis, mientras que el *ced-9* la previene. Los genes *ced-3* y *ced 4*, al regular positivamente la muerte celular se les considera supresores de tumores.



La búsqueda de genes suicidas en células de mamíferos ha ido más despacio y fue a finales de los ochenta cuando se descubrió el gen *bcl-2*, identificado como oncogen cancerígeno que protegía del suicidio a las células inmunes. En 1992 Horvitz anun-

ció que su grupo había clonado y secuenciado el gen *ced-9* que resultó ser un 23% idéntico al *bcl-2*, y el grupo de Stuar Kim de la Universidad de Stanford descubrió que el *bcl-2* podía sustituir al *ced-9* en el *C. elegans*. Buscando la contrapartida en los vertebrados de los genes suicidas *ced-3* y *ced-4*, un grupo de investigadores de los laboratorios Merck de Rahway, encontró un nuevo gen que codifica una proteína denominada ICE (interleukin-1- β -converting enzyme). ICE es una proteasa que activa la IL-1 β por hidrólisis de una proteína precursora inactiva. Presenta un 28% de identidad con la proteína CED-3 en un ensanchamiento de 5 aminoácidos que se cree que es el sitio activo responsable de la actividad proteasa. Yuan y su grupo de la Universidad de Harvard, comprobaron en 1993 la capacidad apoptogénica de este enzima, la cual podía ser bloqueada por el gen *bcl-2*, cuyo producto inhibe la actividad proteásica de la ICE.

Interesa conocer cómo interaccionan estos genes suicidas con los productos de los genes protectores *ced-9* y *bcl-2*. En el gusano redondo *C. elegans* se demostró que el gen *ced-9* se necesita para prevenir la apoptosis sólo cuando los genes *ced-3* y *ced-4* son funcionales, lo que hace sospechar que *ced-9* actúa inhibiendo la actividad de los dos genes suicidas. Algo similar ha de suceder entre ICE y *bcl-2*. Pero, la mera presencia de *bcl-2* no es suficiente para salvar las células de la mortalidad.

3. Inhibidores y activadores de la Apoptosis

Los mecanismos reguladores de la apoptosis son complejos y en ellos se encuentran implicados numerosos genes. El gen *bcl-2* se identificó por Tsujimoto y su grupo en 1984, como un gen sobreexpresado en linfomas de células B humanas debido a su translocación cromosómica. El producto Bcl-2 es una proteína de 24 kDa que inhibe la apoptosis cuando se sobreexpresa en células tales como las hematopoyéticas privadas de citoquinas y las neuronas. La proteína Bcl-2 no tiene capacidad para estimular la proliferación celular, pero sí para promover la supervivencia de las células en estado no proliferativo, induciendo con ello una predisposición a la oncogénesis. El gen *bcl-2*, fué considerado al principio como un protooncogen sin capacidad transformante. Su oncogenicidad se demostró más tarde sobre fibroblastos 3T3 inyectados en ratones atómicos y fué descrita por su asociación con el linfoma folicular humano. En el 90% de los casos, el denominado «B-cell lymphoma / leukemia gene-2» o *bcl-2*, implica una translocación t(14, 18) en el segmento J_H del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina en 18q21.

Se ha demostrado que el gen *bcl-2* es capaz de prolongar la supervivencia de células dependientes de interleuquina-3 cuando se las priva de esta citoquina, debido a su capacidad para reprimir un número de programas apoptóticos. Después de la eliminación de la interleuquina-3, las células tenían que morir por apoptosis y el hecho de no hacerlo, indicaba que la expresión del gen *bcl-2* podía suprimir la apoptosis y prolongar la supervivencia de las células en medios en los cuales morirían. La supresión de la apoptosis por el producto del gen *bcl-2* no ocurre en todos los casos, ya que en células dependientes de otras citoquinas (IL-2 e IL-6), que sobreexpresan *bcl-2*, no se previene la muerte al eliminar las respectivas citoquinas. La supresión de la apoptosis por el gen *bcl-2* se asocia con líneas celulares y circunstancias particulares y puede estar mediada por interacciones en vías señalizadoras específicas de citoquinas.

Estudios más recientes han propuesto que la proteína Bcl-2 se encuentra acoplada al metabolismo respiratorio y que actúa como antioxidante o atrapador de especies reactivas para proteger las células de sus efectos perniciosos. La generación de especies reactivas de oxígeno juega un papel importante en la iniciación de la apoptosis. Los mecanismos mediante los cuales la Bcl-2 previene la muerte celular e induce la supervivencia pueden estar implicados en la modulación de la concentración intracelular de esas especies reactivas. Se ha observado que la superexpresión del gen *bcl-2* en células de mamíferos disminuye la peroxidación lipídica e incrementa la resistencia celular al H_2O_2 y a la depleción de glutatión. Según esto la proteína Bcl-2 ejercería efectos antioxidantes que podrían reflejarse a nivel de:

- (a) una acción quelante sobre los metales redox activos,
- (b) una acción atrapadora de radicales libres,
- (c) la translocación del glutatión reducido al interior de la mitocondria y
- (d) la inhibición de la formación del radical superóxido interfiriendo con la transferencia de electrones por las proteínas mitocondriales

Stanley Korsmeyer y su grupo, de la Universidad de Washington, han descubierto en 1993, que la proteína Bcl-2 ha de vencer una suerte de competición mano a mano con una proteína gemela promotora de la apoptosis, denominada Bax. La proteína Bax de 21 kDa, presenta gran homología con la Bcl-2 y tiene capacidad de formar homodímeros consigo misma y heterodímeros con Bcl-2. La proporción entre Bcl-2 y Bax determina si las células, que reciben la orden de morir, la aceptan o la ignoran. La superexpresión de Bax acelera la muerte celular inducida por privación de citoquinas, contrarrestando la actividad represora de la apoptosis de Bcl-2. Si Bcl-2 está en exceso se une a Bax y el resto se empareja consigo misma y da órdenes a la célula de sobrevivir. Si Bax se encuentra en exceso, ocurrirá lo contrario (Figura 5).

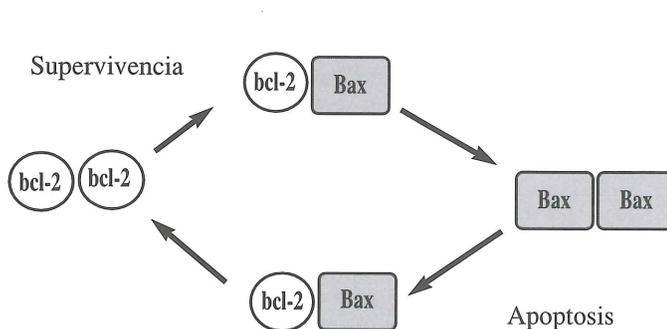


Figura 5. VIVIR O MORIR. La proporción entre ambas proteínas Bcl-2 y Bax, que presentan la capacidad de dimerizarse entre ellas, determina si los linfocitos en cultivo atenderán o ignorarán la orden de morir.

Thompson y su grupo de la Universidad de Chicago han aislado un gen perteneciente a la familia *bcl-2*, *el bcl-x*, que funciona independiente del *bcl-2* en la regulación de la apoptosis y que presenta un funcionamiento original. Este gen codifica dos proteínas diferentes con funciones opuestas, *Bcl-x_s* y *Bcl-x_L*. La *Bcl-x_s* es capaz de inducir la apoptosis y se localiza en tejidos de rápido recambio, como los linfocitos en desarrollo, mientras que la *Bcl-x_L* la previene, de la misma forma que la *Bcl-2*, y se localiza preferentemente en células de cerebro adulto.

En oposición al gen *bcl-2*, el gen supresor *p53* actúa como inductor de la apoptosis en una serie de sistemas celulares en cultivo. Las células T inmaduras pueden morir por exposición a dosis bajas de radiaciones ionizantes u otros tratamientos que lesionan el DNA o por efecto de glucocorticoides o ionóforos del calcio en presencia de ésteres del forbol (Figura 6). La proteína *p53* es esencial para que se verifique la apoptosis en respuesta a la lesión del DNA, pero no interviene en la apoptosis que responde a los glucocorticoides. No está claro el medio que utiliza la proteína *p53* para elevar la susceptibilidad de las células a la apoptosis, pero se sabe que la radiación incrementa la transcripción de los genes inductores de la apoptosis, entre ellos el *p53*. Parece ser que la proteína *p53* detiene la proliferación de las células con DNA lesionado, para permitir que se verifique la reparación del DNA. En caso de que la lesión sea irreparable la célula sufre la apoptosis. Por tanto, la inducción de la apoptosis por *p53* supone un mecanismo defensivo que protege al organismo de la propagación de células que han sufrido mutación, y esto ha hecho que se denomine a *p53* como *el guardian del genoma*. La anulación de la vía *p53* es la alteración específica más común en el cáncer humano y es fundamental para la progresión de esta enfermedad y para su respuesta al tratamiento por radiación o por fármacos quimioterapéuticos.

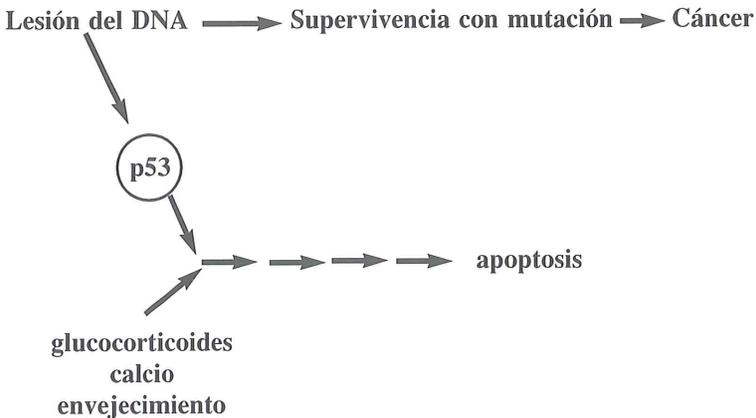


Figura 6. ESQUEMA QUE INDICA LAS DOS VÍAS INDEPENDIENTES QUE CONDUCEN A LA APOPTOSIS EN TIMOCITOS. Una se inicia por lesión del DNA y requiere el producto del gen *p53*, la otra se inicia por acción de los glucocorticoides, ionóforos del calcio o el envejecimiento y no requiere *p53*. La inactivación del *p53* dará por resultado la supervivencia de las células mutadas lo cual conllevará al desarrollo del cáncer.

Otro mecanismo inductor de la apoptosis es a través del antígeno de superficie FAS, considerado como el producto del anti-oncogén *fas*, que posee una estructura característica de receptor transmembrana. Los anticuerpos monoclonales frente a este antígeno in-

ducen la apoptosis en células normales y tumorales que expresan dicho antígeno. Considerando que el antígeno FAS actúa como agente apoptogénico, la pérdida de la función por mutación del gen que lo codifica, causa un defecto linfoproliferativo en ratones *lpr* (defectivos del gen *fas*), similar al lupus eritematoso sistémico humano. Si el antígeno FAS se encuentra implicado en este mecanismo su mutación ha de causar una enfermedad autoinmune. Este fenotipo es similar al observado en las mutaciones de ganancia de función, donde el receptor está activado constitutivamente y transforma las células. En este contexto el antígeno FAS puede considerarse como un anti-oncogén. Las mutaciones de pérdida de función de los receptores causan la desaparición o disfunción de células específicas. Sería interesante visualizar qué fenotipos podrían aparecer por activación constitutiva del receptor de muerte.

El anticuerpo anti-FAS al unirse al antígeno FAS puede actuar de dos maneras: estimulando una señal inductora de muerte o bloqueando la actividad de un factor requerido para la supervivencia. Este anticuerpo, que se expresa en la superficie de diversas células humanas, puede ser el primero con potencial clínico. El antígeno FAS es un receptor transmembrana de 36 kDa cuya secuencia de aminoácidos muestra homología con la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF).

La inducción de la apoptosis por el antígeno FAS puede bloquearse parcialmente por la expresión forzada del *bcl-2*. En una línea celular leucémica que expresaba ambos genes, el *fas* y el *bcl-2* se indujo la proliferación celular en lugar de la apoptosis. También una forma soluble de FAS se ha identificado en pacientes con Lupus eritematoso que bloquea la apoptosis al unirse al ligando FAS (Figura 7). La identificación del antígeno FAS como receptor mediador de la apoptosis abre un área nueva. Descubrir el mecanismo de transducción de señales apoptóticas mediadas por el antígeno FAS puede revelar una vía nueva para la transducción de señales.

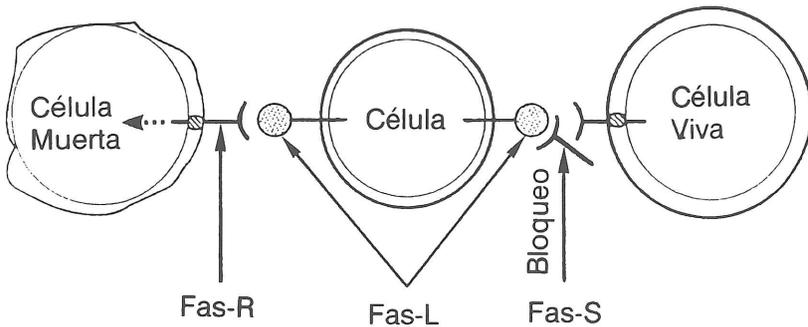


Figura 7.- INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS POR LA MOLÉCULA FAS SOLUBLE (FASs). Fas-R = Receptor FAS; FAS-L = Ligando FAS

Otra molécula efectora de la apoptosis es la interleuquina-1- β (IL-1- β), que se produce por acción de la ICE (IL-1- β converting enzyme) una cisteína proteasa que actúa sobre un precursor y genera la IL-1- β activa. Cualquier inhibidor de la actividad proteasa de ICE inhibe la apoptosis (Figura 8).

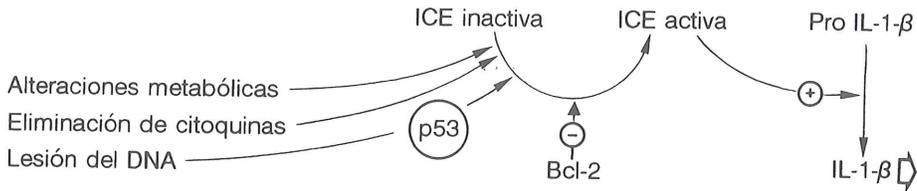


Figura 8.- La activación de la cisteína proteasa ICE causa la rotura del precursor Pro IL-1-β. La IL-1-β madura abandona la célula y alerta a las células vecinas y al sistema inmune. Una célula puede morir cuando detecta alteraciones metabólicas debidas a virus o lesión en el DNA

PROTEINAS IMPLICADAS EN LA MUERTE CELULAR

C. Elegans	Mamíferos	Acción	Función
CED-9	Bcl-2	(-)	opuesto a Bax
?	Bax	(+)	opuesto a Bcl-2
?	Bcl-x _L (long)	(-)	opuesto a Bcl-x _S
?	Bcl-x _S (short)	(+)	opuesto a Bcl-x _L
CED-3	ICE	(+)	proteasa
CED-4	?	(+)	?
?	p53	(+)	Factor de transcripción
?	FAS	(+)	Receptor transmembrana

3. 1. Supresión de la Apoptosis por Genes Adenovíricos

Se conoce desde hace años la capacidad que poseen los genes víricos de transformar las células y se han identificado hasta la fecha una serie de productos de estos genes, que se requieren para la transformación celular. Productos genéticos tales como el antígeno grande T SV40, el adenovirus E1B y el papilomavirus humano E6, tienen capacidad para unirse al producto del gen supresor de tumores, la proteína p53, suprimiendo su actividad, previniendo con ello la parada del ciclo celular en G1 o la apoptosis e incrementando la proliferación celular. Se ha demostrado que algunos genes víricos pueden afectar el crecimiento celular de dos maneras: suprimiendo directamente la apoptosis o activando la expresión del gen *bcl-2*.

La transformación de células de roedores por el adenovirus está facilitada por dos productos proteicos E1A y E1B. E1A es capaz de producir la immortalización celular, pero se requiere la coexpresión de E1B para que la transformación celular sea eficiente. El gen E1B codifica dos proteínas, de 19 y 55 kDa cada una. Ambas poseen capacidad para elevar la actividad transformadora de E1A. La transformación de las células por el producto del gen E1A no es del todo eficiente debido a la incapacidad de las células trans-

formadas de atajar una fase de la apoptosis. La proteína E1B de 55 kDa se une a p53 y bloquea su función supresora tumoral, previniendo así la inducción de la apoptosis. La proteína E1B de 19kDa no se une a p53, pero bloquea la apoptosis por alguna vía aún no definida (Figura 9). La expresión del gen E1A aumenta la sensibilidad de las células HeLa a ser destruidas por el TNF α . Se ha demostrado que la muerte celular inducida por el TNF α y por anticuerpos anti-Fas, puede ser prevenida por expresión de la proteína de 19 kDa del gen E1B.

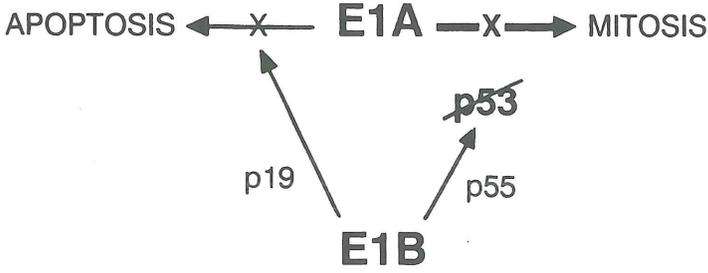


Figura 9.- MODELO MOLECULAR DEL CONTROL DEL CICLO CELULAR POR EL ADENOVIRUS E1. Sólo el componente E1A del virus induce la apoptosis en células infectadas. Sin embargo, en presencia del virus completo se induce la proliferación (mitosis) porque el producto del gen E1B, la proteína p55, se une y secuestra a p53, mientras que el segundo producto de E1B, la proteína p19, bloquea la apoptosis.

3. 2. Apoptosis y proto-oncogen c-myc

La expresión del gen *c-myc* durante el ciclo de división celular se asocia con la proliferación y en casos de expresión aberrante, con la transformación. En condiciones normales la expresión del *c-myc* ocurre durante el ciclo celular, elevándose en las células durante la transición $G_0 \rightarrow G_1$ y disminuyendo en las que retornan a G_0 o que sufren la diferenciación terminal.

En mamíferos se ha demostrado que las proteínas producto de dos oncogenes actúan como reguladores potentes en la apoptosis. Cuando se sobreexpresa el gen *myc* en células privadas de factores del crecimiento, se induce la apoptosis (Figura 10A), mientras que la sobreexpresión del gen *bcl-2* hace a las células resistentes a la apoptosis. La observación de que el gen *c-myc* promueve un estado de adicción a los factores del crecimiento puede interpretarse de diferentes maneras. Quizás estos genes inducen un tipo de apoptosis que puede diversificarse con factores del crecimiento (Figura 10B). En esta versión el *c-myc* proporciona señales que pueden conducir hacia la división o hacia la apoptosis. Los factores del crecimiento se consideran factores de supervivencia porque bloquean la vía apoptótica y favorecen la proliferación. Existe la posibilidad de que la señal de supervivencia, generada por los factores del crecimiento, pueda reemplazarse por señales procedentes de los productos de otros genes. De ser así, se resolvería la paradoja de cómo un gen, como el *c-myc*, asociado normalmente con el crecimiento celular y la transformación, puede participar en la apoptosis, ya que una segunda señal de supervivencia bloquearía la inducción de la apoptosis y haría que predominase la proliferación.

La idea de las «dos señales» supone que, dependiendo de la presencia o ausencia de factores del crecimiento, la activación del *c-myc* induce, tanto la división como la apoptosis. En caso de disminuir o desaparecer la expresión de *c-myc*, se hace posible otra tercera opción. En timocitos o tumores linfoides, la ligación de los receptores TCR, en ausencia de factores del crecimiento ocasiona un bloqueo del ciclo celular (Figura 10C). Este modelo simple se complica porque los factores del crecimiento pueden inducir la expresión de *c-myc* además de proporcionar las señales de supervivencia.

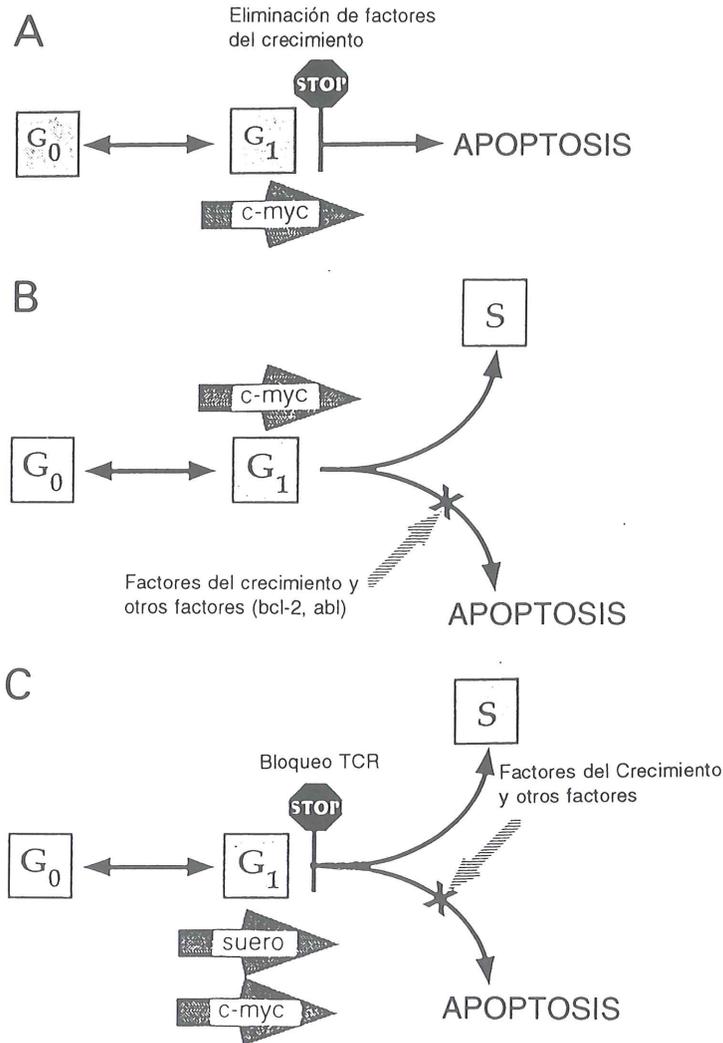


Figura 10. MODELOS QUE RELACIONAN EL GEN *c-myc* CON LA DIVISIÓN CELULAR Y LA APOPTOSIS. (A) La parada del ciclo celular por eliminación de factores de crecimiento se supera por *c-myc*, y las células bloqueadas mueren por apoptosis. (B) El *c-myc* puede inducir la muerte o la división celular, pero en presencia de factores del crecimiento y otros, como *bcl-2* y *abl*, se previene la apoptosis y se favorece la proliferación. (C) La activación de timocitos, via ligación de sus receptores de antígenos TCR, origina la parada del ciclo celular, que se supera por *c-myc* en presencia de suero y señales adicionales, y las células pueden dividirse eludiendo la apoptosis.

4. Significación Fisiológica del Suicidio Celular

La idea de un programa activo de suicidio celular surgió al observar que la apoptosis podía suprimirse con inhibidores de la síntesis del RNA y proteínas, pero cuando se detectó posteriormente que estos inhibidores a veces, no sólo no suprimían la apoptosis, sino que incluso la inducían, se empezó a sospechar que, en la mayoría de las células, las moléculas efectoras de la apoptosis se encuentran siempre presentes. La evidencia más convincente fue comprobar, en células privadas del núcleo, que las proteínas requeridas para la apoptosis se expresaban constitutivamente. Si tales células enucleadas o citoplastos se privan de factores de crecimiento o se tratan con elevadas concentraciones de estaurosporina (un inhibidor de la proteína quinasa), sufren los cambios citoplasmáticos característicos de la apoptosis, mientras que los citoplastos procedentes de células que expresan elevadas cantidades de la proteína Bcl-2 se encuentran protegidos de los cambios apoptóticos. Por tanto, los aspectos más importantes de la apoptosis no requieren la transcripción de nuevos genes y la presencia de la proteína Bcl-2 protege de la apoptosis incluso en ausencia del núcleo celular. El requerimiento de la síntesis de RNA y proteínas para que se verifique la muerte celular por apoptosis, indica que se necesita la presencia de moléculas efectoras que activen o repriman la maquinaria apoptótica ya existente y no la de algún(os) componente(s) imprescindible(s) para el funcionamiento del programa básico de muerte. El bloqueo de la síntesis de RNA o proteínas ha de suponer, por tanto, una competición entre funciones opuestas frente a la muerte celular.

Si las proteínas efectoras de la apoptosis se encuentran en las células vivas, sus actividades letales *han de estar suprimidas en todas las células que sobreviven*. Según ésto, todas las células están programadas para suicidarse y necesitan para mantenerse vivas el aporte continuado de señales o factores extracelulares producidos por otras células. Este control social de la supervivencia celular es una garantía para que se mantenga en los tejidos un equilibrio entre los diferentes tipos celulares. Se han caracterizado diversos *factores de supervivencia* y sus receptores, pero no está aún claro la manera en la que los receptores activados regulan el programa apoptótico. Los factores de supervivencia han de prevenir la inducción de la apoptosis aminorando la cantidad o la actividad de las proteínas inductoras de la muerte. Alternativamente, los factores de supervivencia pueden prevenir la muerte celular hostigando la actividad de proteínas anti-apoptóticas, tales como los miembros de la familia Bcl-2. En ausencia de la actividad del producto genético anti-apoptótico *ced-9*, los nematodos *C. Elegans* muestran una intensa muerte celular ectópica.

Observando los cambios nucleares que se verifican en los estadios iniciales de la apoptosis, no ofrece duda que las células mueren por la rotura endonucleolítica de su DNA. Sin embargo, es un hecho comprobado que las células sin núcleo permanecen activas fisiológicamente durante un tiempo determinado en el cual pueden sufrir los cambios citoplasmáticos característicos de la apoptosis. También los núcleos aislados pueden exhibir la condensación y degradación oligonucleosómica del DNA. Esto demuestra que los diferentes compartimentos subcelulares poseen una autonomía considerable frente a los cambios estructurales típicos de la apoptosis. Se ha propuesto que la acumulación de especies activas de oxígeno puede ser la causa de apoptosis en un proceso controlado por la proteína Bcl-2. Esta idea surgió de experimentos que demostraban que Bcl-2 protege de la muerte inducida por peróxidos y que existen ciertos antioxidantes que actúan evi-

tando la apoptosis en respuesta a la privación de citoquinas. Sin embargo, está aún por resolver si las células utilizan estas especies reactivas de oxígeno para suicidarse. Tanto la apoptosis como la protección para no llegar a ella por la proteína Bcl-2, se han observado en ausencia de respiración mitocondrial y en células desarrolladas prácticamente en un medio anaerobio en las que se reduce al máximo la cantidad de radicales libres.

Existen numerosas similitudes entre la apoptosis y el ciclo celular y se sospecha que la apoptosis y la mitosis se encuentran estrechamente relacionadas e incluso acopladas. Esta idea surgió al implicar en el control de la apoptosis genes que juegan un papel destacado en la regulación de la división celular, como los relativos a las proteínas p53, c-Myc, Rb-1, E1A, ciclina D, c-Fos y la quinasa p34. Algunos de estos genes afectan la apoptosis en situaciones específicas, por ejemplo, el p53 que interviene en la respuesta apoptótica inducida por la lesión del DNA, no se requiere para inducir la muerte celular durante el desarrollo.

Otros genes, como el *c-myc*, son capaces de inducir, tanto la apoptosis como la división. Sin embargo, no hay que excluir la interpretación alternativa de que la apoptosis sea el resultado de un conflicto entre señales de crecimiento incompatibles. El requerimiento de la intervención de la proteína p53 para que *c-myc* induzca la apoptosis, hace suponer que *c-myc* no regula la muerte celular durante el desarrollo, la cual puede ocurrir en ausencia de p53. Aunque es probable que alguno de los componentes del programa apoptótico esté compartido con otros procesos celulares incluída la mitosis, la naturaleza terminal y las características de la apoptosis han de requerir componentes específicos. Lo que sí está claro es que la apoptosis es un sistema de elementos estrictamente regulados, que promueven o inhiben, el punto de salida que es la muerte.

5. Apoptosis y enfermedad

La homeostasis en un tejido normal se mantiene mediante un equilibrio estricto entre la división y la muerte de sus células. En un tejido tumoral la velocidad de división celular excede a la velocidad de muerte. Un tejido normal puede convertirse en tumoral, tanto si se incrementa la velocidad de división celular, como si se detiene la velocidad de muerte o con ambas cosas a la vez.

Tejido normal: División celular = Muerte celular

Tejido canceroso: División celular > Muerte celular (Acumulación celular)

Tejido en degeneración: División celular < Muerte celular (Pérdida celular)

La supervivencia de los organismos multicelulares depende de la funcionalidad de los tipos de células diferenciadas. Una vez que finaliza el desarrollo, la viabilidad del organismo depende del mantenimiento y renovación de estos diversos tipos celulares. Dichos mantenimiento y renovación difieren ampliamente según el tipo celular. Por ejemplo, las células sanguíneas sufren una constante renovación a partir de las células progenitoras hematopoyéticas. Los linfocitos y las células reproductoras, sufren expansiones y contracciones cíclicas de acuerdo con su participación en la defensa del huésped o en la reproducción, mientras que las neuronas poseen una capacidad limitada de autorenovación y la mayoría de ellas sobrevive durante el período vital del organismo.

La muerte celular programada se regula por señales extrínsecas e intrínsecas que inducen o previenen el Programa Genético de Suicidio Celular. La compleja interacción de las múltiples señales apoptogénicas en los numerosos tipos celulares conduce a una plethora de puntos de control donde puede verse afectada la regulación normal de la muerte. Esta complejidad se refleja en las numerosos estados patológicos que afectan a poblaciones celulares en proliferación, quiescentes o diferenciadas terminales.

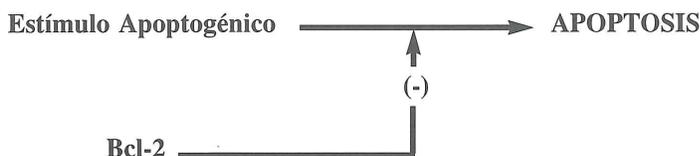
5.1. Enfermedades asociadas a la Acumulación celular

Las enfermedades que se caracterizan por excesiva proliferación celular incluyen el cáncer, las autoinmunes y ciertas enfermedades víricas. La acumulación celular es una consecuencia de una mayor proliferación celular debida a una velocidad más elevada de división celular y/o a una mayor supervivencia celular causada por la disminución de la apoptosis en respuesta a estímulos apropiados. Hasta hace pocos años sólo se consideraba el papel de la proliferación incontrolada en la patogénesis de estas enfermedades, pero numerosas evidencias han hecho que en la actualidad se atribuya un importante papel a las alteraciones ocasionadas por el descontrol de la supervivencia celular.

5.1.1. Cáncer

En la gran mayoría de cánceres humanos, las células presentan una capacidad menor para sufrir la apoptosis en respuesta a estímulos apoptogénicos. Esto se hace más ostensible en células procedentes de tumores metastáticos. Para mantener su viabilidad las células normales dependen de factores tisulares específicos y esta dependencia las previene de sobrevivir en tejidos distintos a los fisiológicos. Sin embargo, las células tumorales metastáticas han eliminado esta dependencia y pueden sobrevivir fuera de su tejido de procedencia. Para ello han tenido que desarrollar un grado de independencia de los factores que restringen la distribución de las células normales. En la actualidad se conocen las bases moleculares de la resistencia a la apoptosis que poseen las células tumorales y se han definido varios genes que son críticos en la regulación de esta muerte celular.

A finales de los años ochenta se estableció una relación entre la apoptosis y el cáncer. La conexión entre ambos conceptos la proporcionó el descubrimiento de la capacidad oncogénica del gen *bcl-2*, por su actuación como represor de la apoptosis ante un estímulo apoptogénico.



Por otro lado, se descubrió que la introducción de un gen supresor p53 normal en células leucémicas carentes de p53, daba como resultado la muerte de esas células por apoptosis y que cualquier alteración del gen p53 traía consigo la eliminación de la propiedad de desencadenar la apoptosis.

¿Puede la estimulación de la apoptosis ser utilizada por los clínicos para producir la regresión de los tumores? La inducción de la apoptosis puede soslayar uno de los problemas más importantes de la terapia del cáncer, *la resistencia*. Se cree que un camino para que las células se vuelvan resistentes es por inducción de aquellos genes que bloquean la apoptosis (*bcl-2*) o por represión de aquellos que la inducen (*p53*). Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos (metotrexato, vincristina, cis-platino, etc) originan aberraciones celulares que conducirían a la apoptosis si la superexpresión de *bcl-2* no permitiera la supervivencia de estas células aberrantes que van a dar origen al fenotipo resistente. Un objetivo de gran interés es la transferencia de genes activadores de la apoptosis, como el tipo silvestre de *p53*, que solapan el bloqueo de este tipo de muerte celular inducido por los genes inhibidores.

5.1.2. Autoinmunidad

Los linfocitos, en condiciones normales, sufren la apoptosis durante el desarrollo y al finalizar la respuesta inmune. Muchas de las disfunciones del sistema inmune derivan de las alteraciones de la apoptosis. Una apoptosis anormalmente elevada originará un estado de inmunosupresión, mientras que un bloqueo de la apoptosis será la causa de una hiperactividad causante de la enfermedad autoinmune.

La regulación fisiológica de la muerte celular es esencial para la eliminación de los linfocitos reactivos, tanto durante el desarrollo como después de la respuesta inmune. Un fallo en el proceso de eliminación de linfocitos autoreactivos puede desencadenar una enfermedad autoinmune. Recientes investigaciones en animales han demostrado la importancia de las alteraciones de la apoptosis en la etiología de estas enfermedades. Por ejemplo, una molécula crítica para la regulación de la muerte celular en linfocitos es el receptor FAS. La activación de FAS por su ligando conduce a la apoptosis. Se han atribuido a las alteraciones en la apoptosis mediada por FAS enfermedades autoinmunes hereditarias. Así, en pacientes con lupus eritematosus sistémico se han detectado elevados niveles de la forma soluble FAS (Figura 7), la cual inhibe competitivamente las interacciones del receptor FAS con su ligando.

De esta forma, la inhibición del proceso apoptogénico inducida por FAS, contribuye a la supervivencia y acumulación de los linfocitos autoreactivos.



En humanos no se ha encontrado aún una directa conexión entre las enfermedades autoinmunes y los genes implicados en el control de la apoptosis. Se encuentran en su comienzo las investigaciones sobre el papel de la apoptosis en enfermedades tales como el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la psoriasis, la diabetes autoinmune, etc. En alguna de estas enfermedades ya se han detectado alteraciones en la susceptibilidad de los linfocitos a morir por apoptosis.

5.1.3. Infección vírica

La alteración de la fisiología celular que resulta de la infección vírica puede llevar a que dicha célula sufra la apoptosis. El suicidio de una célula infectada se considera un mecanismo de defensa que evita la propagación del virus. Las células T citotóxicas actúan también evitando la expansión vírica al reconocer y destruir las células que poseen péptidos del virus asociados con las moléculas de superficie del complejo mayor de histocompatibilidad. Se ha demostrado que las células T pueden inducir la muerte celular activando un programa de muerte en la célula objetivo. Las células T citotóxicas inducen la apoptosis por activar la expresión del receptor FAS o por introducción de proteasas, tales como la granzima B que activan el programa de muerte celular.

Para contrarrestar las defensas del huésped algunos virus han desarrollado mecanismos que alteran la regulación normal de la apoptosis en células infectadas. Por ejemplo, la efectividad de la infección adenovírica depende de la función de la proteína E1B 19kDa, que bloquea directamente la apoptosis inhibiendo la actividad de p53. La acción de E1B 19 kDa puede ser reemplazada por Bcl-2, sugiriéndose similitudes estructurales entre estos dos genes.

La prevención de la apoptosis es importante para establecer el estado de latencia vírica. El virus Epstein-Barr origina una infección latente en células B. El gen vírico LMP-1 que se produce durante dicha latencia, promueve la expresión del gen bcl-2 proporcionando una ventaja de supervivencia en las células infectadas latentes.

5.2. Enfermedades asociadas con una muerte celular en exceso

La excesiva muerte celular puede deberse a condiciones genéticas o adquiridas que elevan la acumulación de señales inductoras de la apoptosis o que disminuyen el umbral de actuación de estas señales. En la mayoría de las enfermedades degenerativas subyace un defecto en los mecanismos que controlan la muerte celular. Entre las enfermedades causadas por excesiva pérdida celular cabe citar: la depleción de linfocitos inducida por el virus HIV, las neurodegenerativas y las lesiones isquémicas.

5.2.1. SIDA

El ejemplo más dramático de depleción celular asociada a virus lo constituye el SIDA, enfermedad inducida por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Es el caso clásico de inmunosupresión ocasionada por el desequilibrio entre la velocidad de muerte de los linfocitos T4 y su reemplazo, mediado por el producto del gen gp120 de la envuelta del virus HIV en el progreso de la enfermedad. El hallazgo de elevados niveles del factor de muerte FAS en linfocitos de sangre periférica de enfermos HIV, hace suponer que en la depleción preferencial de los linfocitos T4 ha de estar implicada una mayor expresión del receptor FAS. Por ello en la actualidad, se sugiere que el control de la apoptosis a nivel de este receptor, puede contribuir a la prevención de esta enfermedad, bien mediante la forma soluble del receptor FAS, generada por deleción del dominio transmembrana a nivel del mRNA Fas o modulando la expresión del ligando FAS.

Una pregunta que se hacen los investigadores es por qué el virus HIV desarrolla un mecanismo que elimina selectivamente la célula que lo hospeda. La respuesta quizás refleje el hecho de que las células T4 tienen una función importante en el establecimiento de la inmunidad frente a una amplia variedad de infecciones víricas. El que se establezca una infección crónica HIV debe depender de la destrucción de las células T4 mediada por el virus y de la pérdida concomitante de una respuesta inmune protectora mediada por las células.

5.2.1. Neurodegenerativas

Una serie de enfermedades neurológicas, tales como: Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, etc., se caracterizan por la pérdida gradual de grupos específicos de neuronas. La pérdida celular en estas enfermedades no induce una respuesta inflamatoria y las evidencias encontradas muestran que es la apoptosis el mecanismo de muerte.

La patogénesis de estas enfermedades puede estar asociada a diversas causas que predisponen a la apoptosis: déficit de factores de supervivencia, alteraciones mitocondriales, estrés oxidativo, exceso de calcio, etc. La superexpresión de Bcl-2 disminuye la neurotoxicidad de cada una de estas causas inductoras de la muerte celular. Frente al por qué tales células post mitóticas irreemplazables, como las neuronas, han retenido su capacidad de sufrir la apoptosis, se han sugerido varias hipótesis. Una de ellas es para evitar su reincorporación al ciclo celular después de haber sufrido alguna mutación genética. Esta hipótesis se sustenta en evidencias que demuestran la expresión forzada de oncogenes en células diferenciadas terminales que las conducen a la muerte en lugar de a la proliferación. Otra hipótesis que concuerda con la anterior, es que en un organismo multicelular es más ventajosa la pérdida de una célula que la supervivencia de una célula lesionada, incluso cuando la célula sea irreemplazable. Se ha evidenciado un aumento de la apoptosis en casos crónicos de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple y en casos de muerte neuronal inducida por priones. También se ha detectado una elevada apoptosis en casos agudos de infarto cardíaco y cerebral. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares de la muerte por apoptosis de las neuronas en situaciones crónicas, se sabe que en la enfermedad de Alzheimer, la acumulación de β -amiloide vuelve a las neuronas más susceptibles a la excitotoxicidad, lo cual las conduce a morir por apoptosis. La terapia para estas enfermedades podría enfocarse en promover la superexpresión del gen bcl-2 para tratar de inhibir la actividad de los inductores de la apoptosis o bien el tratamiento con antioxidantes.

5.2.2. Otras

Dos enfermedades comunes asociadas con la muerte celular son el infarto de miocardio y el infarto cerebral. Estas enfermedades surgen como resultado de una pérdida aguda de riego sanguíneo (isquemia). En ambas, las células de la zona central isquémica mueren rápidamente por necrosis. Sin embargo, fuera de esa zona central las células pueden morir por apoptosis. Se ha demostrado que los agentes inhibidores de la apoptosis limitan el tamaño de la zona infartada.

Se sabe aún muy poco acerca de dos de las más importantes enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético: la osteoporosis y la osteoartritis. No existen evidencias que relacionen estas enfermedades con los genes que controlan la apoptosis, pero la progresiva muerte celular de los condrocitos y osteocitos, de una y otra enfermedad, presenta las características morfológicas de la apoptosis.

Las células hepáticas sufren también la muerte celular programada. De hecho, el término apoptosis se utilizó originalmente para describir la muerte de las células ubicadas fuera de la zona necrosada pericentral resultante de la ligación de la vena porta. Desde entonces se ha demostrado que diversas toxinas asociadas con la degeneración grasa aguda del hígado, entre ellas el etanol, inducen la apoptosis de los hepatocitos.

6. Apoptosis y Potencial terapéutico.

El progreso de la terapia anticancerosa se fundamenta en el conocimiento de los mecanismos celulares que gobiernan la regulación de la división y la muerte y su desregulación en las células cancerosas. El control mitótico es muy importante frente a la susceptibilidad de los tumores a los fármacos quimioterapéuticos que detienen las células en mitosis. Si este detenimiento es reversible, el momento de administración de un segundo agente que lesione el DNA, puede ser crítico para la efectividad de un tratamiento quimioterapéutico. Los agentes que estimulan los mecanismos apoptóticos pueden ser útiles en células cancerosas que carecen de p53 y no sufren la apoptosis en respuesta a fármacos o radiaciones que lesionan el DNA. Recientemente, el grupo de Clayman de la Universidad de Texas, ha demostrado la supresión del crecimiento en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, mediante la transferencia del gen p53 silvestre vía un adenovirus recombinante.

En células normales, la privación de factores del crecimiento las conduce a entrar en la fase de quiescencia (G_0) y la ausencia de receptores en estas células no ocasiona apoptosis sino un crecimiento celular más lento. Sin embargo, las células forzadas a proliferar mediante oncogenes, que es lo que ocurre en la mayoría de las células tumorales, la eliminación de los factores del crecimiento específicos o, lo que es equivalente, la ablación de los receptores de los factores del crecimiento, induce en estas células una masiva apoptosis, ya que son incapaces de buscar refugio en el estado quiescente. Los efectos combinados entre los oncogenes y los factores del crecimiento autocrinos o paracrinos han de jugar un papel importante en la determinación del grado de crecimiento y muerte celular.

En tumores que dependen de hormonas, la inducción de la apoptosis por *eliminación de las hormonas* se asocia con la regresión tumoral. La administración de análogos de la somatostatina promueve la apoptosis masiva y la regresión del cancer inducido en hamster por agentes químicos. En una línea celular de cáncer de mama humano, el tamoxifeno y otros antiestrógenos inducen la depresión de la síntesis del DNA y el incremento de la muerte celular. Este efecto parece que se debe a la acción antiproliferativa de la proliferación del tamoxifeno, vía inducción de la apoptosis, en los estadios iniciales del cáncer. Durante el tratamiento de la leucemia linfática, puede inducirse la apoptosis mediante tratamiento con glucocorticoides. Tanto los agentes

quimioterapéuticos como las radiaciones lesionan las células tumorales induciéndolas hacia el suicidio. Tratamientos que restauran la capacidad de regular la apoptosis pueden también aportar beneficios considerables en algunos tumores malignos. Se ha demostrado recientemente que el crecimiento de linfomas humanos de células B que sufren translocaciones *bcl-2*, pueden ser inhibidos *in vitro* por *oligonucleótidos antisentido* dirigidos contra el gen *bcl-2*.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la expansión proliferativa de linfocitos reactivos a autoantígenos. Se han explorado métodos para inducir la apoptosis selectiva en las células autoreactivas que causan la enfermedad, y se ha demostrado que el tratamiento continuado con antígeno puede dar lugar a la muerte selectiva de los linfocitos. La eliminación específica de los linfocitos por tratamiento repetitivo con un autoantígeno asociado a la enfermedad, es efectiva en casos de encefalitis autoinmune experimental en ratón. Estrategias similares han de ser aplicadas con éxito en enfermedades autoinmunes humanas, siempre que se identifiquen los antígenos específicos de la reacción.

Por el contrario, los tratamientos que aumentan la *resistencia* celular para sufrir la apoptosis pueden ser beneficiosos en enfermedades degenerativas, incluso en ausencia de alteraciones específicas en los genes implicados en la regulación de la muerte celular. La elevación en la expresión del gen *bcl-2* puede incrementar la resistencia de las células a casi todos los estímulos apoptóticos. Así, los tratamientos que eleven el umbral apoptótico de células específicas pueden ser beneficiosos en casos de enfermedades asociadas con la pérdida celular. Tales tratamientos incluyen el uso de factores del crecimiento para promover la regeneración de las células hematopoyéticas después de la quimioterapia, ensayos con *factores neurotróficos de supervivencia* en enfermedades o traumas degenerativos y administración de *antioxidantes* (N-acetilcisteína) para prevenir la muerte de los linfocitos T4 en respuesta a la infección HIV. Un candidato para la regulación de la apoptosis, es un *análogo hidrosoluble del Coenzima Q₁₀* en vías de comercialización por una firma Japonesa. Este análogo del Coenzima Q inhibe la apoptosis a través de la *eliminación de los radicales libres*. El interés de este fármaco se basa en que, por su naturaleza hidrofílica, posee una mayor capacidad para ser asimilado por el organismo y puede cruzar la barrera hematoencefálica y aplicarse con éxito en enfermedades neurodegenerativas. Los agentes que alteran el metabolismo del calcio podrían utilizarse para el tratamiento de lesiones isquémicas.

Podría ser posible alterar el umbral de muerte inhibiendo la acción de los factores apoptóticos de la superficie celular. Por ejemplo, la manipulación de FAS mediante anticuerpos monoclonales específicos, o por regulación de la expresión del mismo receptor FAS o su forma soluble, o a través del control del ligando FAS, son todos ellos mecanismos potenciales para modular la apoptosis en situaciones clínicas. Aunque el uso de los receptores de superficie y los sistemas de segundos mensajeros presentan en la actualidad un gran atractivo, hay que considerar que estos agentes pueden ejercer efectos pleiotrópicos. En algún caso la activación del receptor Fas puede estimular la proliferación de los linfocitos en lugar de su muerte. El tratamiento con interleuquina 12 (IL-12) *in vivo* ha demostrado que esta citoquina protege las células de la médula ósea de la radiación gamma, mientras que potencia la muerte celular en el tracto gastrointestinal.

En principio, los genes implicados en el control de la muerte celular, tales como los miembros de las familias *bcl-2* e ICE, pueden proporcionar objetivos ideales para la intervención terapéutica, pero no hay que olvidar que la mayoría de las enfermedades no se caracterizan por un incremento definido y generalizado de la susceptibilidad o resistencia a la apoptosis. Sería poco beneficiosa una terapia que aumentara la supervivencia de las células neurales a expensas de un empeoramiento de la enfermedad inmune o aquella que previniera la muerte celular apoptótica a expensas del incremento de la progresión tumoral.

Algunas observaciones sugieren que los mediadores centrales de la apoptosis son los que han de poder manipularse específicamente en un próximo futuro. Determinados tejidos en el organismo experimentan cambios en la expresión de formas individuales de las familias genéticas *bcl-2* e ICE y pueden ya desarrollarse inhibidores específicos de la cisteína proteasa frente a determinadas formas de ICE. Los agentes farmacológicos que actúan como inhibidores o previenen las interacciones proteína-proteína en las familias *bcl-2* e ICE, presentan relativa especificidad para estos miembros individuales o para heterómeros formados por ellas. Finalmente, la expresión y función de estas formas *bcl-2* e ICE se regulan ellas mismas por eventos de transducción de señales específicos del linaje celular. Se sabe que la proteína Bcl-2 sufre modulaciones específicas en respuesta a citoquinas, al contacto célula-célula o al contacto célula-matriz extracelular. Ciertos factores del crecimiento actúan induciendo cambios post-traduccionales de la Bcl-2.

Clarke y su grupo de la Universidad de Michigan han utilizado recientemente el gen *bcl-x_s*, por su capacidad de inhibir la acción del *bcl-2*, en el tratamiento selectivo de carcinomas sólidos, tales como el cáncer de colon, el neuroblastoma pediátrico, etc. Mediante transferencia genética del gen humano *bcl-x_s*, utilizando como vector un adenovirus, se ha conseguido inducir selectivamente la apoptosis en las células de estos tumores sólidos, dejando intacta la capacidad regeneradora de las células hematopoyéticas.

Los conjugados moleculares complejos con adenovirus, presentan una elevada eficacia en la transferencia genética debido a que la endocitosis se encuentra mediada por el receptor de la superficie celular que reconoce a un ligando específico en el conjugado. El adenovirus protege al conjugado de la lisis endosómica, pero puede indetermindar la especificidad hacia la célula objetivo al unirse a receptores víricos de la superficie celular. Para superar este problema se incapacita al adenovirus para unirse a su receptor mediante el anticuerpo monoclonal anti-proteína fibrosa de la envuelta vírica. El resultado es un vector conjugado molecular multifuncional, que conserva su especificidad de enlace y con ello su selectividad, y que es capaz de prevenir la degradación lisosómica de los complejos DNA-conjugados endosómicos internalizados (Figura 11)

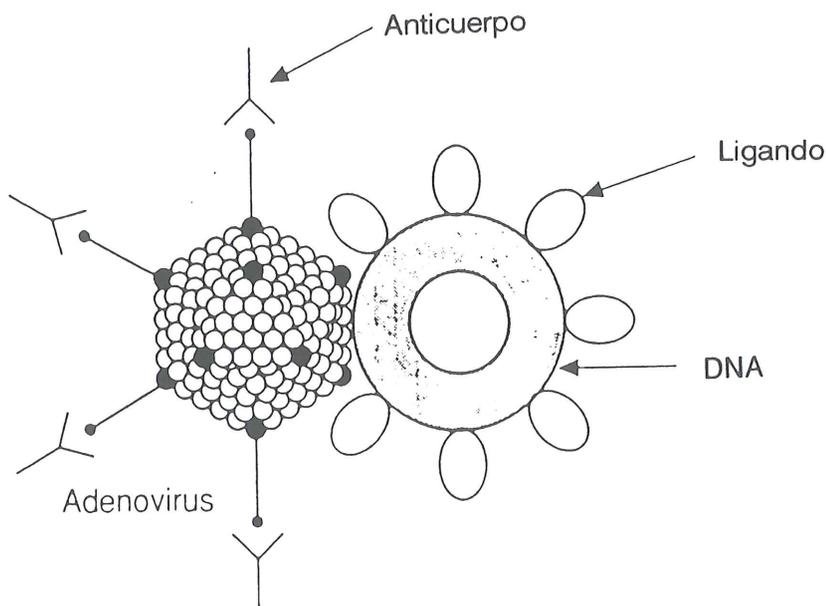


Figura II. Vector conjugado molecular multifuncional que utiliza de manera selectiva la lisis endosómica mediada por el adenovirus. El adenovirus pierde su capacidad de enlace por interacción con un anticuerpo monoclonal de la proteína fibrosa de la envuelta vírica. El complejo se internaliza en las células por vías no adenovíricas, sirviéndose del virus exclusivamente en la lisis endosómica.

De todo lo anteriormente expuesto, es obvio que un elevado número de estados patológicos del ser humano se deben al fracaso agudo o crónico de la apoptosis. Las interacciones de las señales apoptóticas con los diversos tipos celulares, muestran la multitud de puntos de regulación que pueden ser afectados cuando se pierde el estricto control de la muerte celular normal. A pesar de su complejidad, la modulación de la apoptosis supone para el farmacólogo de hoy uno de los objetivos de mayor interés frente a nuevos fármacos diseñados para actuar sobre vías de integración y transducción de señales. En la actualidad se cuenta con una amplia variedad de estrategias terapéuticas que se ofrecen prometedoras frente a enfermedades neurodegenerativas, tumorales, del sistema inmune, cardíacas y quizás las del propio envejecimiento. Entre las áreas más fértiles para el desarrollo de agentes terapéuticos relacionados con la apoptosis, tanto para su inducción en la patología cancerosa, como para su represión en las enfermedades degenerativas, se encuentran aquellas que pueden afectar las vías de óxido-reducción (antioxidantes), las que eliminan los radicales libres, las hormonas y las estrategias que incluyen oligonucleótidos antisentido, regulación transcripcional y transferencia genética.

BIBLIOGRAFIA

- Kerr J.F.R., Wyllie A.H. y Currie A.H. (1972) Apoptosis, a basic biological phenomenon with implications in tissues kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-245.
- Wyllie A.H. (1993) Apoptosis. *Br J Cancer* 67, 205-208.
- White E. (1996) Life, Death and the pursuit of Apoptosis. *Genes & Developments* 10, 1-15.
- Williams G.T. (1991) Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65, 1097-1098.
- Steller H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
- Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartwig E. y Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 Beta-converting enzyme, a dead gene ced-3. *Cell* 75, 653-656.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC & Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B-cells with the (14-18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099
- Oltvai Z., Milliman C. y Korsmeyer S. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *cell* 74, 609- 612.
- Nagata S (1994) Apoptosis-mediating Fas antigen and its natural mutation. en *Apoptosis II: The Molecular Basis of Apoptosis in Disease*. Cold Spring Harbor Lab Press pp 313-326.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462
- Boise LH, González-García M, Postena CE et al (1993) Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608
- Baker AF, Briehl MM, Dorr R y Powis G (1996) Decreased antioxidant defence and increased oxidant stress during dexametasone-induced apoptosis: bcl-2 prevents the loss of antioxidant enzyme activity. *Death & Differentiation* 3, 207-213.
- Afione SA, Conrad CK y Flotte TR (1995) gene therapy vectors as drug delivery systems. *Clin Pharmacokinet* 28, 131-189.
- Michael SI, Huang Ch, Romer MU, et al (1993) Binding-incompetent adenovirus facilitates molecular conjugate-mediated gene transfer by the receptor-mediated endocytosis pathway. *J Biol Chem* 268, 6866-6869.