

**APOPTOSIS: CARACTERISTICAS GENERALES Y SUS IMPLICACIONES EN  
PROCESOS FISIOPATOLOGICOS**

Lourdes Rodríguez<sup>1</sup> y Jorge Alberto Reyes- Esparza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", Departamento de Gastroenterología "Vasco de Quiroga" 15 Tlalpan, 14000 México D.F. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Cancerología, División de Investigación Básica, México D.F.

Recibido en febrero de 1995. Aprobado em marzo de 1995.

Key words: Apoptosis, programmed cell death.

**SUMMARY**

Apoptosis is a mode of cellular death with characteristic structural features. The set of cellularevents that results is regulated by gene expression. Since this mode of cellular death plays an important role in many physiological and pathological processes, its control and regulation maylead to new therapeutic approaches for treatment of a great variety of diseases.

**RESUMEN**

La apoptosis es un modo de muerte celular con cambios estructurales característicos. El conjunto de eventos celulares que resultan son regulados por la expresión de genes. Puesto que esta forma de muerte celular desempeña un papel importante en muchos procesos fisiológicos y patológicos, su regulación y control pueden conducir a nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades.

**INTRODUCCION**

En los años recientes se ha reconocido ampliamente que la pérdida espontánea de células es un parámetro importante en la homeóstasis de tejidos normales (proliferación celular y recambio *versus* muerte celular). Asimismo, se ha reconocido que las células deben perderse continuamente en muchos tejidos normales para equilibrar la división celular; pues de lo contrario cuando este balance se altera el resultado final puede ser una expansión tumoral de células.

El descubrimiento de un modo diferente de muerte celular (muerte celular programada) cuyas características ultraestructurales son consistentes con un fenómeno controlado y activo, apoyan la hipótesis de que la muerte celular desempeña un papel importante

en la regulación del número de células en una variedad de tejidos, bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Wyllie *et al.*, 1980, Walker *et al.*, 1988; Cohen 1991; Saunder, 1966).

Los términos **apoptosis**, **muerte celular programada**, **muerte celular activa** o **suicidio celular**, son usados para definir un modo particular de muerte celular, caracterizado por un modelo específico de cambios en núcleo y citoplasma (Kerr *et al.*, 1972). De estos, el término apoptosis es el más ampliamente usado, y fue introducido por Kerr en 1972. Sus características morfológicas sugieren que es un fenómeno activo y programado, y ha sido mostrado que este puede ser asociado o inhibido por una variedad de estímulos ambientales, ambos fisiológicos y patológicos. La amplia ocurrencia de apoptosis ha despertado el interés en un gran número de investigadores por definir los mecanismos celulares reguladores y procesos bioquímicos involucrados. El conocimiento de estos mecanismos podrá conducir a nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y el SIDA, entre otras. A continuación describiremos brevemente algunos de los avances más recientes con relación a este fenómeno, su significado y su repercusión en algunos procesos involucrados.

**Características morfológicas de la apoptosis**

La apoptosis afecta específicamente a células individuales, por lo tanto es fácil su identificación mediante microscopio de luz. Los cambios morfológicos observados durante la apoptosis han sido extensamen-

te estudiados y revisados por varios laboratorios (Alle, 1989; Collins, 1991). Los estudios realizados utilizando microscopio electrónico han mostrado que existe cierta secuencia de eventos que hacen de la apoptosis una forma de muerte celular con características morfológicas distintivas. El evento morfológico inicial no ha sido identificado, pues cuando se reconoce que la célula está sufriendo apoptosis ya presenta algunos de los cambios morfológicos típicos.

Las células afectadas reducen su volumen, pierden contacto con las células vecinas y pierden elementos de superficie especializados como las microvellosidades y uniones célula-célula. Varios estudios han mostrado que estos cambios ocurren rápidamente. Existe una notable condensación del núcleo y del citoplasma, probablemente por salida del líquido celular. Hay separación de pequeños fragmentos celulares que permanecen unidos o cercanos a la superficie celular. Estos remanentes celulares son los llamados **cuerpos apoptóticos**, que se caracterizan porque están bien conservados y contienen organelos, los cuales pueden estar condensados pero están aparentemente intactos, tanto químicamente como estructuralmente. Incluso se observan vacuolas citoplásmicas y masas densas de material nuclear en algunos cuerpos. Es importante señalar que estos cuerpos nunca muestran evidencia ultraestructural de degeneración y es probable que en esa etapa ellos sean capaces de presentar actividad metabólica.

El retículo endoplásmico se dilata y aparece una serie de cavidades semejantes a cráteres, de tal manera que las cisternas dilatadas se fusionan con la superficie celular. Inicialmente y a diferencia de la necrosis, las mitocondrias son normales en estructura. Los cambios estructurales internos más sobresalientes ocurren en el núcleo (Arends *et al.*, 1990). La cromatina se condensa en cápsulas granulares densas bajo la membrana nuclear. Adyacente a eso, los poros nucleares desaparecen. El nucléolo se disocia y da origen a partículas osmiofílicas que están estrechamente asociadas a la periferia de la cromatina condensada. Todos esos cambios nucleares llevan a la ruptura de la cromatina, de tal manera que el ADN de las células apoptóticas se reducen a una serie de fragmentos del tamaño de los nucleosomas (180-200 pares de bases) (Wyllie, 1984).

Las células en apoptosis no inducen una reacción inflamatoria, incluso cuando se presenta en un gran número de células. Sin embargo, ellas son el blanco de fagocitosis inmediata, ya sea por macrófagos presentes o por otras células adyacentes. Los cuerpos apoptóticos ingeridos por otras células, sufren un pro-

ceso dentro de los fagosomas, que es estructuralmente similar al que ocurre en la autólisis *in vitro* de células íntegras. Las enzimas lisosomales desempeñan un papel importante en la degradación posterior de los cuerpos fagocitados. De esta manera son rápidamente reducidos a cuerpos lisosomales.

Es difícil precisar el tiempo que toma la secuencia de eventos descritos antes, pues la apoptosis sucede continuamente en tejidos fetales, tejidos del adulto y en neoplasmas en crecimiento; incluso cuando aumenta por varios estímulos, el proceso se inicia en células individuales de un mismo órgano o tejido en tiempos diferentes. Sin embargo, las observaciones que han reportado varios investigadores sugieren que el fenómeno es completado rápidamente: los cuerpos pueden formarse y desaparecer en un periodo de 24 horas.

### ASPECTOS BIOQUÍMICO-MOLECULARES DE LA APOPTOSIS

La apoptosis se considera como un proceso activo de suicidio celular. Una característica común de la apoptosis es la participación activa de la célula en su propia aniquilación, pues esta moviliza una cascada de eventos que conduce a su desintegración. Existe considerable variación en la señal inicial y los eventos metabólicos celulares necesarios para inducir apoptosis, que dependen en gran medida del tipo celular y de la naturaleza del evento externo el cual dispara la apoptosis. Las señales externas que conducen a este tipo de muerte son, probablemente, tan variadas como aquellas que conducen a la proliferación y diferenciación celular, y pueden incluir la supresión de señales extracelulares así como su aparición.

Ahora es ampliamente aceptado que la apoptosis es un proceso dirigido por genes y puede ser visto como uno más de los procesos dirigidos por genes (igual que la diferenciación), como parte del repertorio con que dispone la célula para responder a estímulos internos y externos (Williams, 1991; Ellis *et al.*, 1991).

#### Influencia de genes reguladores

Algunos oncogenes y genes oncosupresores han sido ya identificados y se conoce que regulan la susceptibilidad celular para entrar en apoptosis. Hasta el presente hay datos convincentes relacionando a p53, c-myc, bcl-2, ced-4 y ras (Williams, 1991; Alios y Sarraj, 1992).

El gen supresor tumoral p53 y el proto-oncogen c-myc han mostrado tener efectos dramáticos sobre la apoptosis en algunas células. En timocitos, y

probablemente en algunos otros tipos celulares, p53 es un componente esencial de la vía que conduce desde el daño al ADN hasta la apoptosis, aunque en otras células este puede conducir a la detención del crecimiento y la reparación del ADN. La restauración de p53 funcional en células que no lo poseen normalmente, ya sea por mutaciones sensibles a temperatura o por transfección del gen bajo un promotor inducible, sugiere fuertemente que la expresión de p53 es suficiente para inducir apoptosis (Kastan *et al.*, 1991).

El gen *c-myc*, al igual que el p53, es más conocido como un elemento importante en el control de la proliferación celular, pero su presencia consistente bajo condiciones de detención del crecimiento, puede indicar la presencia de apoptosis (Bissonnette *et al.*, 1992). Además, se ha observado que oligonucleótidos antisentido *c-myc* inhiben la muerte celular inducida por activación de hibridomas de células T, sugiriendo que la expresión de *c-myc* endógeno es un requisito para la inducción de apoptosis en esta situación (Gwyh *et al.*, 1993). El gen *c-myc* puede, por lo tanto inducir ya sea proliferación como apoptosis y la decisión celular entre esas dos respuestas será determinada por otras señales, como pueden ser la presencia de factores de crecimiento u otros estímulos de sobrevivencia.

Algunos proto-oncogenes celulares parecen rescatar del alto estado de recambio en la expansión celular; *bcl-2* que es uno de ellos, es un oncogen encontrado en varias líneas celulares y tejidos que se caracterizan por presentar muerte celular por apoptosis. La expresión de *bcl-2* puede inhibir la apoptosis inducida por varias situaciones de estrés (Strasser *et al.*, 1991). Sentman y colaboradores (Sentman *et al.*, 1991) han demostrado la resistencia de los timocitos corticales para presentar apoptosis. Tales células fallan para sufrir apoptosis en respuesta a una amplia variedad de estímulos a los cuales normalmente son sensibles. Se ha demostrado que *bcl-2* suprime la apoptosis en una amplia variedad de tipos celulares, aunque su sitio y el mecanismo molecular de acción es aún desconocido.

Horvitz y Yuan (1990) demostraron que ciertas mutaciones impiden la muerte celular durante el desarrollo de células específicas. Uno de esos genes expresados en las células agonizantes es *ced-4*, este gen ha sido recientemente secuenciado y clonado. Horvitz infiere de sus trabajos que *ced-4* actúa como continuo represor de la muerte celular y que la inac-

tivación de éste libera el programa de muerte celular. Hay evidencias que sugieren que *ced-4* es una proteína dependiente del calcio.

La alta expresión del oncogen *ras* mutado puede tener el mismo efecto que *bcl-2*, es decir, puede incrementar la resistencia de la célula para presentar apoptosis.

### Segundos mensajeros

La apoptosis es inducida cuando, ya sea un receptor de membrana o un mediador citoplasmático, se une a un ligando, el cual provoca la generación del segundo mensajero. Varios sistemas de segundos mensajeros han sido asociados con la inducción de apoptosis y la respuesta final varía con el estado metabólico de la célula y el tipo de célula en particular.

Un tipo de molécula receptora (*APO-1/Fas*) parece estar particularmente involucrada en el disparo de la apoptosis en algunos tipo celulares, incluyendo líneas celulares leucémicas (Itoh *et al.*, 1991). Un ejemplo de ello son los linfocitos T. Se ha observado en estas células que la interacción ligando-receptor puede conducir a una extraordinaria respuesta celular. En los timocitos corticales inmaduros CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, los ligandos que ocupan el receptor de la célula T inician la apoptosis, mientras que en células maduras postímicas entran a la fase S. Smith *et al.* (1989) han reportado recientemente evidencias de que la apoptosis de la célula blanco puede involucrar el acoplamiento del receptor de superficie celular *APO-1/Fas*.

Hay reportes que señalan que el AMPc desempeña también un papel importante en la apoptosis de timocitos y otros tipos de células linfoides. El efecto del AMPc es mediado por la proteína cinasa A (PKA) e involucra la activación de AMPc-dependiente de proteína cinasa I (PKI). Otra vía enzimática que parece ser parte del mecanismo involucra la regulación negativa de la muerte celular mediada por proteína cinasa (PKC)(CIGB, Cuba). Los ésteres de forbol, los cuales activan PKC, protegen a los timocitos de la apoptosis inducida por los glucocorticoides, los ionóforos del calcio, el AMPc y la activación del receptor de la célula T (Mc Conkey *et al.*, 1989).

Recientemente se ha encontrado que muchas células en apoptosis expresan la actividad de una enzima transglutaminasa que se une a proteínas citoplásmicas. Parte del colapso y distorsión del contorno de la célula en apoptosis puede ser atribuida a la activación de esta enzima (Wyllie, 1980). Sin embargo, el dramático incremento en la densidad mostrado por las células cuando entran en la apoptosis se debe a un

movimiento neto de la salida de líquido. De hecho, el mecanismo responsable de la pérdida de un tercio a un medio del volumen celular en el lapso de unos minutos, se debe a la inhibición del sistema de co-transporte sodio-potasio.

Posteriormente a la colocación de los cambios en la cromatina, el calcio libre citosólico se eleva y se mantiene sostenido, al menos en algunos tipos celulares, lo cual parece ser importante para el resto del proceso. No se conoce si la fuente de calcio es externa a la célula o interna (por ejemplo, de mitocondria)(McConkey *et al.*, 1989). La importancia de este incremento en los niveles de calcio en la muerte celular es indicado por el hecho de que la inhibición del incremento de calcio (por agentes farmacológicos) previenen la muerte celular. Se desconocen los cambios específicos inducidos por la elevación de los niveles de calcio que causan la muerte celular. Existe la posibilidad de que el calcio active directamente a una enzima nucleasa, sensible al calcio-magnesio endógeno (endonucleasa) (Nelipovich *et al.*, 1988; Compton y Lowsky 1992). Parece ser que el calcio actúa directamente sobre esta enzima y que produce la ruptura de la cromatina en nucleosomas, de tal manera que el ADN de la célula en apoptosis se reduce a una serie de fragmentos.

#### **Métodos de estudio para la identificación de la apoptosis**

Los microscopios de luz y el electrónico ofrecen los mejores métodos para detectar células muertas y agonizantes, y permiten hacer morfológicamente una distinción entre necrosis y apoptosis. Sin embargo, esas técnicas no nos permiten hacer una cuantificación del fenómeno en una población de células dada.

El daño celular, en células en apoptosis, muestra cambios morfológicos típicos: condensación nucleoplásmica consistente, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Estas alteraciones nos permiten utilizar diferentes métodos para la identificación de este fenómeno.

La electroforesis de extractos de ADN en geles de agarosa es un método que se ha venido utilizando durante varios años para identificar células en apoptosis. El extracto de estas células revela un modelo típico de una fragmentación del ADN en mono y oligonucleosomas, el cual es distintivo de la célula en apoptosis (Arends y Wyllie, 1991).

Varios artículos han descrito recientemente métodos de citometría de flujo para detectar células en apoptosis, pues algunas de las características de este fenómeno permiten su análisis por este método. La

ruptura del ADN extenso y la preservación de la membrana celular son dos aspectos importantes de la célula en apoptosis, que proporcionan las bases para el desarrollo de la mayoría de los ensayos de citometría de flujo, y permiten hacer la discriminación entre apoptosis y necrosis (Daarzynkiewicks *et al.*, 1994).

La ruptura del ADN puede ser detectada por extracción del ADN degradado (ADN de bajo peso molecular) de células prefijadas con etanol o permeabilizadas con detergentes, y la subsecuente tinción de la célula con fluorocromos para ADN. Las células en apoptosis muestran una reducida tinción del ADN (a causa del ADN de alto peso molecular). Alternativamente, los numerosos fragmentos rotos de ADN presentes en las células en apoptosis, pueden ser marcados en la reacción con nucleósidos conjugados con biotina o digoxigenina, empleando deoxinucleotidil transferasa terminal exógena (TdT) o polimerasa de ADN (Schimtz, 1991).

Otros métodos de estudio de apoptosis están basados en la identificación de la preservación de la membrana celular. La exposición de células a tripsina y ADNasa permite la digestión de la célula con daño en la membrana celular. De esta manera se remueven las células muertas, pero no células en etapa temprana de apoptosis (Walker, 1993). La captación del fluorocromo catiónico RH123 es uno de esos métodos y es específico para mitocondria funcionalmente activa: el colorante se acumula en mitocondrias en virtud de su potencial de membrana. La células con las mitocondrias y la membrana celular alteradas, concentran este colorante y exhiben fuerte fluorescencia. Este método está basado en el análisis de la integridad de la membrana celular, como otros métodos basados en el mismo principio, permite discriminar entre células necróticas, células vivas y células en apoptosis (Darzynkiwvintz *et al.*, 1992; Ormerod *et al.*, 1993).

Recientemente ha sido publicado un método que se basa en la captación del colorante bis-benzimidazole, Hoechst 33342, el cual usa células no fijadas, de modo que la población de células en apoptosis pueda ser seleccionada para estudios morfológicos y bioquímicos posteriores. Hoechst 33342 es captado por células viables y se une a regiones ricas en AT. El método permite la observación de algunos tipos de células en apoptosis ya que éstas captan más rápidamente el Hoechst 33342 que las células normales. Las células con membrana plasmática dañada, incluyendo las células necróticas, pueden ser distinguidas por adición de yodo propidio (PI) el cual es excluido por las células viables (27).

Cada uno de los métodos presentados tiene sus ventajas y sus limitaciones. Los métodos basados sobre el análisis de la integridad y la función de transporte de la membrana celular, sin simples y de bajo costo, pero fallan para identificar células en apoptosis. Sin embargo, pueden ser usadas para identificar células necróticas, células con daño mecánico o en etapas muy tardías de apoptosis.

La identificación de las células en apoptosis es muy compleja. Ninguno de los métodos descritos en la literatura, cuando se usan solos, pueden proporcionar una exactitud total de la detección de apoptosis. El más específico parece ser el método basado en la detección de los fragmentos de ADN rotos. El número de fragmentos de ADN en células en apoptosis es tan grande que el grado de marcaje celular en este ensayo parece ser un adecuado discriminador entre células en apoptosis y en necrosis.

Un alto grado de exactitud en la identificación de la célula en apoptosis puede ser obtenida por el uso de más de un ensayo de viabilidad en la misma muestra. Debe quedar claro que, sin tomar en consideración los métodos de citometría de flujo mencionados para la identificación de apoptosis, este mecanismo de muerte celular debe ser confirmado por la inspección de la célula bajo microscopía electrónica. Los cambios morfológicos durante la apoptosis tienen un modelo muy específico y el análisis de la morfología celular debe ser el factor decisivo en situaciones cuando hay alguna ambigüedad respecto al mecanismo de muerte celular.

### Factores que inducen la apoptosis

EL papel tan importante que desempeña la inhibición y/o la inducción de la apoptosis en las enfermedades malignas y degenerativas es ampliamente reconocido (Hertz, 1993). Algunos agentes infecciosos han desarrollado mecanismos para contrarrestar el programa para el suicidio en las células infectadas. Sin embargo, también hay evidencias de que ambos, virus y bacterias, pueden activar el programa de apoptosis en la célula huésped como parte de su arsenal para causar enfermedad. Poco se sabe de los factores que inician la apoptosis o la naturaleza de los mecanismos celulares activados antes de la aparición de los cambios morfológicos característicos. Lo que está claro, sin embargo, es que en ciertas circunstancias la apoptosis es un evento programado determinado por relojes intrínsecos específicos para el tipo de célula involucrada. A continuación se describirán algunos de los factores involucrados en el de-

sarrollo de la apoptosis, en procesos fisiológicos y patológicos.

Muchos agentes que inducen apoptosis, pueden ser oxidantes o estimuladores del metabolismo oxidativo celular. Las células de mamíferos se encuentran en un estado oxidativo en el cual la sobrevivencia requiere un apropiado balance de oxidantes y antioxidantes. Buttke y Sandstron (1994) proponen que, al menos en algunas situaciones, la tendencia de una célula a ir hacia la proliferación o apoptosis dependerá de su habilidad para mantener dicho balance. Estudios previos sugieren que la adición de intermediarios oxígeno-reactivos (ROI) o la disminución de antioxidantes celulares puede llevar a la apoptosis. Asimismo, se ha encontrado que la apoptosis puede ser bloqueada por la adición de compuestos con propiedades antioxidantes.

Dentro del mecanismo de inducción de apoptosis por estrés oxidativo, se señala que los intermediarios oxígeno-reactivos mitocondriales deben ser de particular importancia. Los niveles de ROI generados durante la fosforilación determinará si la célula activada proliferará o sufrirá de apoptosis. Dos procesos inmunológicos significativos donde la apoptosis mediada por estrés oxidativo es de gran importancia son la activación de la célula T y la patogenicidad del SIDA.

### Maduración de células T

Estudios tempranos han mostrado que los timocitos inmaduros son especialmente sensibles a la inducción de apoptosis (Egiston *et al.*, 1990; Compton y Cid, 1992). En la mayoría de los casos su inducción es bloqueada, al menos temporalmente, por inhibidores de síntesis de proteínas y ARN, sugiriendo que la activación de genes para la muerte celular es necesaria para la inducción del proceso. Existen evidencias de que la inducción de la apoptosis en los timocitos involucra un incremento sostenido en la concentración del calcio citosólico.

La tolerancia tímica depende de la inducción de apoptosis en timocitos inmaduros por el complejo antígeno/complejo de histocompatibilidad. La naturaleza de dicho complejo se desconoce. Lo que sí está claro es que la interacción de la célula epitelial tímica con el complejo antígeno/complejo de histocompatibilidad promueve la maduración de timocitos doble positivo o células simple positivo (Teh *et al.*, 1988). La intensa selección del repertorio de células T dentro del timo explica el alto nivel de muerte celular observado dentro del compartimiento de timocitos inmaduros, por tanto, la muerte celular programada

(apoptosis) es esencial para el desarrollo intratímico normal de la célula T y de la tolerancia del órgano mismo.

Recientemente se ha sugerido que el factor de necrosis tumoral (TNF) puede participar en la maduración de timocitos normales. Puesto que la etapa intratímica de la célula T en desarrollo, se caracteriza tanto por una tasa alta de proliferación como de muerte celular, es razonable determinar el papel del TNF en tales procesos. El TNF es una molécula dotada con una capacidad dual para matar ciertas células así como para inducir la proliferación en otras, Hernández y Stutman (1993) sugieren que el TNF puede desempeñar un papel regulador dual en la selección positiva y negativa intratímica. Ellos han mostrado que el TNF induce apoptosis directa en una fracción de timocitos normales. Esos efectos del TNF *in vitro* sobre timocitos no son vistos con células T de sangre periférica. Se sabe que la estimulación del receptor del TNF resulta en una rápida elevación en los niveles intracelulares de ROI. Asimismo, se ha encontrado que la apoptosis inducida por TNF puede ser inhibida, ya sea por tioredoxina, un tiol intracelular reductor y atrapador de radicales libres, o bien por el uso de N-acetilcisteína (NAC) un tiol antioxidante y precursor de GSH que inhibe también el proceso. La hipótesis de que el TNF puede ser un componente en el proceso de selección del repertorio intratímico sigue bajo estudio. Sin embargo, es evidente que otros factores además del TNF pueden participar en la selección negativa intratímica, así como también es factible que existan señales internas para la producción de niveles fisiológicos de citocinas, importantes en la homeostasis linfoidea.

Además de los factores de crecimiento, algunas proteínas integrantes de la matriz extracelular han sido implicadas como moléculas que promueven el crecimiento, la proliferación, el anclaje y la migración de células hematopoyéticas, entre otras cosas. Por ejemplo, los progenitores linfoides y eritroides se unen a fibronectina, pero las células diferenciadas de ese linaje son incapaces de adherirse porque pierden la expresión de algunos receptores durante su madurez. Sugahara *et al.* (1994) en un estudio sobre los efectos de las moléculas de la matriz extracelular sobre células progenitoras hematopoyéticas encontraron que de varias moléculas estudiadas, la fibronectina induce dramáticamente la apoptosis. Tanto la inhibición del crecimiento como la apoptosis inducida por fibronectina en células MO7E fueron abolidas por el tratamiento con

anticuerpos anti-fibronectina o anti-VLA5. Los resultados sugieren la posibilidad de que la interacción de fibronectina con su receptor puede contribuir, al menos en parte, en la hematopoyesis *in vivo*.

### SIDA y apoptosis

Estudios recientes realizados por varios laboratorios han mostrado que durante la patogénesis del SIDA se **dispara** un programa de muerte celular (Gouglion, 1993). Hallazgos recientes sugieren un nuevo mecanismo para explicar los defectos y disminución de células auxiliares CD4+ . En pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) se ha observado la presencia de apoptosis en una fracción de células CD4+ y también CD8+ *in vitro*, tal muerte es asociada con la activación de células T (Meyard *et al.*, 1992). Sin embargo, esta activación no resulta en proliferación celular, sino más bien en muerte celular, es decir, no solo las células infectadas con HIV pueden ser el blanco primario para la apoptosis, sino también ésta se puede disparar en células activadas no infectadas. La muerte celular de células CD4+ y CD8+ es observada con posterioridad a la activación de la células T por el principal complejo de histocompatibilidad (MHC). El reconocimiento de la importancia de la apoptosis en la patogénesis del SIDA puede tener consecuencias dramáticas para la concepción de nuevas estrategias en el estudio y tratamiento para combatir la enfermedad.

### Enfermedades infecciosas y apoptosis.

Hay extensa evidencia de que la inducción de apoptosis contribuye directamente a la patogénesis de un gran número de enfermedades virales, además del virus tipo 1 de inmunodeficiencia humana.

Recientemente Hinshow *et al.* (1994) han mostrado que todos los virus de la influenza de mamíferos estudiados inducen apoptosis en células MDCK. La fragmentación de ADN es comúnmente inducida por el virus de la influenza. Sus estudios muestran claramente que cepas muy diferentes, incluyendo virus de influenza A y B, inducen esta respuesta celular. Células infectadas con virus muestran efectos citopatológicos siempre acompañados de la fragmentación del ADN, típicamente 3-6 h después de la infección. Hay evidencias para una relación entre proteínas virales específicas y una vía de apoptosis involucrando bcl-2.

En la intrincada relación entre las bacterias patógenas y su huéspedes algunos patógenos han desarrollado vías para activar la muerte celular programada en eucariotes (Zychlinsky, 1993). Una de las especies

bacterianas que inducen apoptosis es *Shigella flexneri*, un patógeno gram negativo que causa disentería por invadir la mucosa colónica humana.

Recientemente, se reportó que el mecanismo de citotoxicidad de este patógeno es la inducción de apoptosis de macrófagos. Esta inducción dependerá de la capacidad de la bacteria para escapar del fagolisosoma dentro del citoplasma. Un patógeno bacteriano que puede también actuar sobre la célula para llevarla a la apoptosis es el *Helicobacter pylori*, un patógeno involucrado en la gastritis crónica y la úlcera péptica. Otro patógeno que a juzgar por la morfología de la células infectadas, también parece despertar la muerte celular es la *Bordetella pertussis*. Algunas exotoxinas de bacterias patógenas son capaces de inducir apoptosis, por ejemplo la toxina diftérica, aunque el mecanismo molecular no está bien claro.

La inducción de apoptosis bacteriana parece ser un factor patogénico importante en su citotoxicidad, pues mediante ese mecanismo atacan de manera efectiva a células de defensa del huésped, como los macrófagos y las células T, para desarrollar la enfermedad.

#### Terapia antitumoral y apoptosis

Aunque mucho se conoce acerca del mecanismo primario de acción de muchos agentes anticáncer, incluyendo la localización de sus blancos primarios, no está todavía claro cómo la interacción con esos blancos debe conducir a la repentina o eventual muerte celular. Recientemente se ha sugerido que diversas drogas anticáncer pueden inducir un modo de muerte celular, el cual tiene características de apoptosis (Barry *et al.*, 1990, Dive y Hickman, 1991). La inducción de apoptosis como una estrategia antitumoral ha alcanzado ya gran credibilidad. Entre las drogas que se sabe pueden inducir apoptosis están: los inhibidores de la dihidrofolato reductasa, 5-fluoruracilo, venenos de la topoisomerasa II y los agentes que dañan el ADN. La mayoría de las drogas que inician la apoptosis reducen el potencial proliferativo. Cambios en la actividad específica de proteínas regulada por el ciclo celular podrían, por lo tanto, representar un tipo común de daño que proporcionaría el evento inicial para la cascada que inicia la muerte celular.

La existencia de un programa genético para muerte celular inducida por drogas sugiere que las mutaciones de algunos genes podrían tener una profunda repercusión sobre la terapia, si las drogas son capaces de iniciar este proceso. Se ha señalado recientemente que es posible que este efecto de la quimioterapia puede ser determinado por la respuesta de la célula

a la formación de un complejo droga-blanco, y a sus secuelas, más bien que a los cambios bioquímicos traídos por la misma droga (Dive *et al.*, 1992). Una de esas respuestas, determinada por el fenotipo de la célula puede ser la activación de un programa genético para la muerte celular.

#### CONCLUSION

Hasta hace menos de 10 años el significado de muerte celular programada (apoptosis) no fue completamente reconocido por la mayoría de los investigadores en el área de las ciencias biológicas. El estudio de la apoptosis, sin embargo, está progresando ahora rápidamente, tanto a nivel celular como molecular. El significado del proceso está adquiriendo cada vez más importancia por su participación en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos. ¿Qué factores determinan cuáles células serán afectadas? ¿Qué papel desempeña la edad? ¿Cuál es el modo de acción de algunos iniciadores o inhibidores? y ¿Qué otros mecanismos bioquímicos y morfológicos están implicados? Estas son algunas de las interrogantes que quedan por resolver, y que hacen de este fenómeno un campo muy interesante por investigar. Con motivo de que la apoptosis es un evento importante en el control de poblaciones celulares específicas, es por tanto fácil predecir que la regulación de la apoptosis será de gran utilidad para muchas aplicaciones terapéuticas.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su gratitud a la Srta. Verónica Alvarez Durán por su asistencia secretarial y a la Q. Aurora Acosta por sus acertadas críticas al texto.

#### REFERENCIAS

- ALIONS, M.R. and C.E. SARRA (1992). Apoptosis: A gene directed programme of cell death. *J.R. Cell.Physicians Lond.* 26:25-35.
- ALLEN, T.D. (1989). Ultrastructural aspects of cell death. In *Perspectives on Mammalian Cell Death* C.S. Potten ed. 39-65. Oxford University Press, USA.
- ARENDS, M.J.; R.J. MORRIS and A.H. WYLLIE (1990). Apoptosis: the role of endonuclease. *Am. J.Pathol.* 136:593-608.
- ARENDS, M.J. and A.H. WYLLIE (1991). Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *Int.Rev.Exp.Path.* 32:223-254.
- BARRY, M.A.; C.A. BEHNKE and A. EASTMAN (1990). Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxin and hypertermia. *Biochem Pharmacol.* 40:2353-2358.

- BISSONNETE, R.F.; F. ECHEVERRI; A. MAHBOUBI and A.R. GREEN (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* **359**:552-554.
- BUTTKKE, T.M. and P.A. SANDSTROM (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* **15**:7-10.
- COHEN, J.J. (1994). Apoptosis: El proceso fisiológico de muerte celular. *Hospital Practice* **3**(10):439-448.
- COHEN, J.J., (1991) Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.* **50**:5-85.
- COLLINS, M. (1991). Death by a thousand cuts. *Curr. Biol.* **3**:140-142.
- COMPTON, M.M.A. (1992). Biochemical hall mark of apoptosis-internucleosomal degradation of the genoma. *Canc. Metast.* **11**:105-119.
- COMPTON, M.M. and J.A. CID LOWSKY (1992). Thymocyte apoptosis-a model of programmed cell death. *Trends Endo.* **3**:17-23
- DARZYNKIEWICKS, Z.; S. BRUNO; G. DEL BINO (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* **13**:795-808.
- DARZYNKIEWICKS, Z.; H.A. CRESSMAN; J.R. ROBINSON (1994). *Methods in Cell Biology: Flow cytometry* (2nd Edition). Academic Press, N.Y.
- DIVE, C. and J.A. HICKMAN (1991). Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death. *Drug targets interactions.*
- EGISTON, M.; R. SCOLLAY; K. SHORTMAN (1980). Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:2579-2582.
- ELLIS, R.E., J. JUAN and H. R.HORWTZ (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Ann Rev. Cell Biol.* **7**:663-698
- GOUGION, M.L. (1993). Apoptosis in AIDS. *Science* **268**:1269-1272.
- GWYHT, W. and A. CHRISTOPHER (1993). Molecular regulation of apoptosis: genetic control on death. *Cell.* **74**:777-779.
- HERNANDEZ, T. and O. STUTMAN (1993). Immune junctions of tumor necrosis factor. Tumor necrosis factor induces apoptosis os mature thymocys and can also stimulate or inhibit IL-6 induced proliferation depending on the concentration of metogenic co-stimulation. *J. of Immunology* **151**(8):3999-4012.
- HERNTZ, N. (1993). Cell death and the cell cycle: a relationship between transportation and neurodegeneration? *TIBS* **18**:157-159
- HINSHOW, V.S.; C.W. OLSEN; N. DYBDAHL-SISSOKO and D. EVANS (1994). Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J. of Virology* **68**(6):3667-3673.
- HORWITZ H.R. and J.YUAN (1990). The Caenorhabditis elegans genes ced-3 y ced-4 cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev.Biol.* **138**:33-41
- ITOH N., S. YONEHARA; A. ISHII; M. YONEHARA; S.L. MIZUSHIMA; M. SAMESHIMA; A. ITASE; S. YOSHIYUK and S.NAGATA (1991). The polypeptide encoded by the cDNA of human cell surface antigen fas can modulate apoptosis. *Cell* **66**:233-243.
- KASTAN M.B.; O. OHYERWERE; D. SIDRANSKY; B.VOGELSTEIN and R.W. CRAIG (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**:6304-6311.
- KERR, J.F.R.; D.H. WYLLIE and A.R. CURRIE (19972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kintetics. *BR.J. Cancer* **26**:239-257.
- McCONKEY, D.J.; P.HARTZELL; M.JONDAL and s. ORRENIUS (1989). Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei bay agents that stimulate protein kinase C. *J.Biol. Chem.* **264**:13399-13402.
- McCONKEY, D.J.; P. NICOTERA; P.HARTZELL; G. BELLOMO; A.H. WYLLIE and S. ORRENIUS (1989). Glucocorticoidsactive a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic calcium concentration. *Arch Biochem & Biophys* **269**:365-370.
- MEYARD, L.; S.A. OTLO; R.R. JONKER; M.J. MINJNSTER; R.P. KEET and F. MIEDEMA (1992). Programme death of T cell in HIV-1 infection. *Science* **257**:217-219.
- NELIPOVICH, P.A.; L.A. NIKONOVA and S.R. UMANSKY (1988). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca2+ /Mg2+ dependent endonuclease in thymocytos of irradiated rats. *Int. J.Radiat. Biol.* **53**:749-765.
- ORMEROD, M.G.; X.M. SUN; D. BROWN, R.T. SNOWDEN and G.M. COHEN (1993). Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta oncológica* **32**(4):417-424.
- SAUNDER, J.W. (1966). Death in embryonic systems. *Science* **154**:604-612.
- SENTMAN, C.L.; J.R. SCHUTTER; D. HOCKENBERG; D. KANAGA and S.S. KORSMEYER (1991). Bcl-2 inhibits multiples form of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* **67**:879-888.
- SCHIMTZ, G. (1991). Non radioactive labelling of oligonucleotides *in vitro* with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* **92**:222-231.
- SMITH, C.A.; G.T. WILLIAMS; R. KINGSTONE; E.J. JENKINSON; J.J.T. OWEN (1989). Antibodies to CD3/T receptor complex induce cell death by apoptosis in imadute thymic culture. *Nature* **337**:181-184.
- STRASSER, A.; S. WHITTINGHAM; D.L. VAUX; M.L. BATH; J.M. ADAMS; S. CORY and A.Q. HARRIS (1991). Enforcial Bcl-2 expression in b-lymphayd cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **88**:8661-8665.
- SUGAHARA, H.; H.KAMAKURA; T. FURUTSU; J. SOHIKAWA; K. HASHIMOTO; Y. KANAYAMA and Y. MATZUZAWA (1994). INDUCTION of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectine via its interaction with vlylate antigen 5. *J. Exp.Med.* **179**:1757-1766.
- THE, S.H.; P. KISIELOW; B. SCOTT; H. KEISHE; Y. URMATSU; H. BLETHMANN and V.H. BOEHMER (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cell. *Nature* **335**:229-233.
- THOMPSON, H.J. (1992). Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidem. Biomarkers and prevention* **1**:597-602.
- WALKER, N.I.; B.V. HARMAN; G.C. GOBE; J.F.R. KERR (1988). Paterns of cell death, *Methods Achiev. Exp. Pathol.* **23**:18-54.
- WALKER, P.R. (1993). Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* **15**:1032-1047.
- WILLIAMS, G.T. (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* **65**:1097-1098.
- WYLLIE, A.H.; R.G. MORRIS; L.A.SMITH and D. DUNLOP (1984). Chromatin cleavage in apoptosis asociation with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* **142**:67-77.
- WYLLIE, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**:555-556.
- ZYCHLINSKY, A. (1993). Programmed cell death in infections diseases. *Trends in microbiology* **1**(3):114-117.