

CATEDRA DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNNE.

APOPTOSIS



AUTORES:

SOSA, RICARDO DANIEL
Profesor, Cátedra de
Oncología. Facultad de
Medicina. UNNE.

Brandan, Nora. Profesora
Titular. Cátedra de
Bioquímica. Facultad de
Medicina. UNNE

Jeréz, Javier. Ayudante
Alumno por concurso.
Cátedra de Bioquímica.
Facultad de Medicina. UNNE

APOPTOSIS

1. Introducción

La muerte celular, particularmente la apoptosis, probablemente sea uno de los tópicos más estudiados entre los biólogos celulares. Entender la apoptosis en condiciones de enfermedad es muy importante, ya que no sólo puede enseñar la patogénesis de la enfermedad sino también da pistas de cómo puede ser tratada la enfermedad; por ejemplo, en el cáncer hay una pérdida de balance entre las células en división y la muerte celular, y las células que deberían morir no reciben las señales para hacerlo. El problema puede surgir en cualquier etapa en la vía de la apoptosis. Un ejemplo es el downregulation del p53, un gen supresor de tumor, que resulta en menos apoptosis y mayor crecimiento y desarrollo tumoral, y la inactivación del p53, independientemente del mecanismo, se lo ha vinculado a muchos cánceres humanos.

2. Apoptosis

El término “apoptosis” deriva del griego “απο” y “πιωδζ” que significa “caída” y se refiere a la caída de las hojas de los árboles en otoño. Se lo usa en contraste con “necrosis” para describir la situación en el cual una célula persigue de forma activa un camino hacia la muerte, a partir de recibir ciertos estímulos. Desde que fue descrita la apoptosis por Kerr et al en 1970, es uno de los procesos más investigados en la biología. Al ser un proceso altamente selectivo, es importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. En situaciones fisiológicas tales como la destrucción programada en el desarrollo embrionario para terminar de formar los tejidos, la involución fisiológica tales como el desprendimiento del endometrio o la regresión de la mama luego de la lactancia, la destrucción normal de las células acompañadas por nueva proliferación como en el tracto digestivo, la involución del timo a edad temprana. Y en condiciones patológicas como la muerte celular inducida por un quimioterápico en el cáncer, la muerte y depleción progresiva de los CD4 en el SIDA, algunas formas de muerte celular inducidas por virus como en las hepatitis B o C, la atrofia patológica de órganos y tejidos como resultado de retirar un estímulo como la atrofia de la próstata luego de una orquiectomía, etc.

En resumen, la “muerte celular programada” hace referencia a situaciones en las cuales las células activan un programa letal que se encuentra codificado en el genoma, que en un momento preciso, selecciona determinadas células para morir. La apoptosis tiene como función biológica principal mantener la homeostasis en distintas poblaciones celulares. La desregulación de este proceso puede conducir a estados patológicos que involucran a enfermedades con excesiva acumulación celular (falta apoptosis) o con excesiva pérdida celular (sobra apoptosis).

Diferencias entre Apoptosis y Necrosis

Las células que sufren apoptosis muestran rasgos morfológicos y bioquímicos característicos que las diferencian de las células necróticas.

NECROSIS	APOPTOSIS
Rasgos Morfológicos <ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de la integridad de las membranas. • Floculación de la cromatina. • Hinchazón de la célula. • Lisis completa, sin formación de vesículas. • Desintegración de las organelas, con formación de ampollas. 	Rasgos Morfológicos <ul style="list-style-type: none"> • Formación de ampollas en las membranas sin pérdida de la integridad. • Agregación de la cromatina sobre la membrana nuclear. • Condensación citoplasmática y nuclear. • Formación de vesículas rodeadas de membranas. • No hay desintegración de organelas.

Rasgos Bioquímicos	Rasgos Bioquímicos.
<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de la regulación de la homeostasis iónica. • Proceso pasivo que no requiere de energía. • No requiere síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. • Digestión del DNA al azar. • Fragmentación post-lítica del DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso finamente regulado que involucra pasos de activación, síntesis y etapas. • Proceso activo, dependiente de ATP. • Requiere síntesis de macromoléculas. • Transcripción de genes de novo. • Fragmentación específica del DNA. • Fragmentación pre-lítica del DNA.
Significado Fisiológico/Fisiopatológico	Significado Fisiológico/Fisiopatológico
<ul style="list-style-type: none"> • Muerte masiva de células. • Provocada por disturbios no fisiológicos. • Fagocitosis por macrófagos. • Con respuesta inflamatoria importante 	<ul style="list-style-type: none"> • Muerte de células individuales. • Inducida por estímulos fisiológicos, aunque también patológicos. • Fagocitosis por células adyacentes o macrófagos. • Sin respuesta inflamatoria.

2.1. Cambios morfológicos en la apoptosis

Las alteraciones morfológicas de la muerte celular apoptótica que importan tanto al núcleo como al citoplasma, son remarcablemente similares en todos los tipos celulares y especies. Generalmente se requieren sólo algunas horas desde la iniciación de la muerte celular hasta el final de la fragmentación celular. Sin embargo, el tiempo que toma depende del tipo celular, el estímulo y la vía apoptótica.

Los contrastes morfológicos de la apoptosis en el núcleo son la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, que se acompañan de un redondeamiento o balonamiento de la célula, reducción del volumen celular (picnosis) y retracción de los pseudópodos. La condensación de la cromatina comienza en la periferia de la membrana nuclear, formando una estructura tipo anillo. La cromatina, además se condensa hasta que comienza a romperse dentro de la célula pero siempre con una membrana celular intacta, una característica descrita como cariorexix. La membrana plasmática también está intacta y durante todo el proceso. En el estadio final de la apoptosis, se agregan algunas otras características tales como un blebbing de la membrana (se forman como burbujas llamadas “blebs”), modificaciones ultraestructurales de las organelas citoplasmáticas y pérdida, finalmente, de la integridad de la membrana. Generalmente, las células fagocíticas engullen a las células apoptóticas antes que ocurran estos cuerpos apoptóticos. Esta es la razón por el cual, la apoptosis fue descubierta tardíamente en la historia de la biología celular, y los cuerpos apoptóticos sólo pueden verse in vitro y bajo condiciones muy especiales. Si los remanente de las células apoptóticas no son fagocitadas como en el caso de un cultivo celular artificial, sufrirán un proceso de degradación que remeda a la necrosis y esta condición se llama “necrosis secundaria”.

2.2. Cambios bioquímicos en la apoptosis

A grandes rasgos, existen tres tipos principales de cambios bioquímicos que pueden verse en la apoptosis, 1) activación de las caspasas, 2) rotura de DNA y otras proteínas y 3) cambios de la membrana y reconocimientos por parte de las células fagocíticas. Al principio de la apoptosis, hay expresión de fosfatidilserina (PS) en las capas externas de la membrana celular, que han hecho un “flipped out” desde las capas más internas. Esto permite el reconocimiento temprano de células muertas por los macrófagos, lo que resulta en fagocitosis sin liberación de componentes celulares pro-inflamatorios. Esto es seguido de una rotura característica del DNA en piezas grandes de 50 a 300 kilobases. Más tarde, hay un clivaje internucleosomal del DNA en oligonucleosomas formados por múltiplos de 180 a 200 pares de bases, por parte de las endonucleasas. Esto hace que en la corrida electroforética en el gel, aparezca la característica “escalera de

DNA". Otra característica específica de la apoptosis es la activación de un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de la cisteína-proteasas, denominadas "caspasas". La "c" de "caspasa" se refiere a la "Cisteína-proteasa", en tanto el "aspasa" se refiere a la propiedad única de la enzima de clivar siempre después de residuos aspárticos. Las caspasas activadas, clivan muchas proteínas celulares vitales y rompen el andamiaje nuclear y el citoesqueleto. También activan a las DNAsas, que además degradan al DNA nuclear. Aunque los cambios bioquímicos explican en parte algunos de los cambios morfológicos de la apoptosis, es importante notar que el análisis bioquímico de la fragmentación del DNA o la activación de las caspasas no deberían ser usados para definir a un proceso apoptótico, ya que puede ocurrir apoptosis sin fragmentación oligonucleosomal del DNA y puede ser caspasa-independiente. El Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) ha propuesto que la clasificación de las modalidades de muerte celular se basen exclusivamente en criterios morfológicos, ya que no hay una clara equivalencia entre cambios ultraestructurales y bioquímicos que deriven de la muerte celular.

2.3 Mecanismos de apoptosis

Entender los mecanismos de apoptosis es crucial y ayuda a entender la patogénesis de condiciones que resultan de una apoptosis desordenada. Esto, a su vez, puede ayudar al desarrollo de drogas que hagan blanco en ciertos genes apoptóticos o vías de la misma. Las caspasas son centrales al mecanismo de la apoptosis ya que son tanto iniciadoras como ejecutoras del proceso. Hay tres vías por el cual las caspasas pueden ser activadas. Las dos comúnmente descritas vías de iniciación son la vía intrínseca (o mitocondrial) y la vía extrínseca (o del receptor de muerte). Ambas vías finalmente llevan a una vía común o fase de ejecución de la apoptosis. Una tercera vía de iniciación, menos conocida, es la vía del retículo endoplásmico intrínseca.

2.3.1 La vía extrínseca del receptor de muerte

La vía extrínseca del receptor de muerte, como su nombre lo indica, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte. Aunque se han descrito varios receptores de muerte, los más conocidos receptores de muerte son el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), y una proteína relacionada llamada Fas (CD95) y sus ligandos, TNF y Fas ligando (FasL), respectivamente. Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta a proteínas adaptadoras tales como el dominio de muerte asociado al receptor TNF (TRADD) y al dominio de muerte asociado a Fas (FADD), así como a cisteína-proteasas como las caspasas. La unión de un ligando de muerte a un receptor de muerte, resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de ligando-receptor-adaptador se conoce como DISC (complejo de señalización que induce muerte). El DISC entonces, inicia el ensamblaje y activación de la pro-caspasa 8. La forma activada de la enzima, la caspasa 8, es una caspasa iniciadora, que inicia la apoptosis clivando otras caspasas ejecutoras o de río abajo.

2.3.2 La vía intrínseca mitocondrial

Como su nombre lo indica, la vía intrínseca se inicia dentro de la célula. Los estímulos internos, tales como un daño genético irreparable, la hipoxia, concentraciones extremadamente altas de calcio citosólico y un stress oxidativo severo, son todos disparadores de la iniciación de la vía mitocondrial intrínseca. Independientemente del estímulo, esta vía es el resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y de la liberación de moléculas proapoptóticas tales como la citocromo-c hacia el citoplasma. Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2, específicamente las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1) En tanto las proteínas anti-apoptóticas frenan la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-c, las proteínas pro-apoptóticas actúan promovieron la liberación de citocromo-c desde la mitocondria hacia el citoplasma. No es la cantidad absoluta, sino el balance entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas lo que determina si se va a iniciar o no la apoptosis. Otros factores apoptóticos que se liberan desde el espacio intermembranoso mitocondrial hacia el citoplasma incluyen al factor inductor de apoptosis (AIF), al segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (Smac), a la proteína de unión al IAP directo con bajo pH (DIABLO) y la proteína A de requerimiento de alta temperatura /Omi (Htra2). La liberación citoplasmática de citocromo-c activa a la

caspasa 3 por medio de la formación de complejo conocido como apoptosoma, que está conformado de citocromo-c, Apaf-1 y caspasa 9. Por otro lado, el Smac/DIABLO o la Omi/HtrA2, promueven la activación de la caspasa uniéndose al inhibidor de las proteínas de apoptosis (IAPs) que posteriormente lleva a la disrupción en la interacción de los IAPs con la caspasa 3 o 9.

2.3.3 La vía común

La fase de ejecución de la apoptosis involucra la activación de una serie de caspasas. Las caspasas que está hacia arriba (río arriba) de la vía intrínseca es la caspasa 9, en tanto la de la vía intrínseca es la caspasa 8. Las vías intrínseca y extrínseca convergen en la caspasa 3. La caspasa 3, así, cliva al inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa, que es responsable de la apoptosis nuclear. Además, las caspasas que están río abajo, inducen el clivaje de las proteínas-kinasas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de reparación del DNA y subunidades inhibitorias de la familia de las endonucleasas. Tienen también un efecto sobre el citoesqueleto, el ciclo celular y las vías de señalización, los cuales, todos juntos, contribuyen a los cambios morfológicos típicos de la apoptosis.

El hecho de que los precursores de las caspasas estén expresados constitutivamente en las células vivas, y que la apoptosis pueda inducirse rápidamente en ellas, probarían la alta sofisticación y eficiencia del proceso de regulación de las caspasas. En la actualidad existen varios modelos que explican el modo en que se regularía la actividad de estas proteasas:

1) Activación de las caspasas efectoras: una señal pro-apoptótica culmina en una caspasa iniciadora que, posteriormente, activa a las efectoras provocando el desensamblaje celular.

2) Activación de las caspasas iniciadoras: las caspasas iniciadoras se activarían por unión a cofactores específicos. Así, en el caso de la pro-caspasa 8 se requeriría la unión con su cofactor FADD para su activación. La pro-caspasa 9, en cambio, se activa al unirse a Apaf-1, pero requiere del citocromo-c y del ATP para conformar el apoptosoma. Esto indica que la activación de estas proteasas puede requerir de múltiples cofactores, habiendo surgido distintos modelos para explicar cómo podría producirse la activación a través de ellos.

3) Los inhibidores como reguladores: las IAPs actuarían bloqueando la apoptosis a través de la inhibición de caspasas efectoras, sin embargo, también previenen la activación de estas enzimas cuando hay sobreexpresión, sugiriendo que los blancos reales en las células son la pro-caspasas efectoras y otras proteínas involucradas en la activación.

2.3.4 La vía del retículo endoplasmático intrínseco.

Esta vía del retículo endoplasmático intrínseco es una tercera vía y la menos conocida. Se cree que depende de la caspasa 12 y es independiente de la mitocondria. Cuando el RE se injuria por stress celular como hipoxia, radicales libres o falta prolongada de glucosa, hay un desplegamiento de proteínas y una síntesis reducida de proteínas en la célula, y una proteína adaptadora conocida como factor 2 asociado al receptor TNF (TRAF2), se disocia de la pro-caspasa 12, resultando en la activación de la misma.

Proteínas de la familia Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2, está comprendida por proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, que juegan un rol importantísimo en la regulación de la apoptosis, especialmente en la vía intrínseca, ya que son previas al daño celular irreversible y actúan principalmente a nivel mitocondrial.

Todos los miembros Bcl-2 están localizados en la membrana mitocondrial externa. Son dímeros responsables de la permeabilidad de esta membrana, sea en la forma de canal iónico o a través de la creación de poros. Según su función y los dominios de homología Bcl-2 (BH = Bcl-2 Homology), los miembros de esta familia se dividen en tres grupos. El primer grupo son las proteínas anti-apoptóticas que contienen los cuatro dominios BH y protegen a la célula de cualquier estímulo apoptótico. Algunos ejemplos son el Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1/Bfl-1 y Bcl-B/Bcl2L10. El segundo grupo está conformado de proteínas sólo con dominio BH-3, llamadas así en comparación a los otros miembros, y están restringidas al dominio BH3. Ejemplos de este grupo incluyen al Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk y Bik. En momentos de mucho stress celular, tal como daño al DNA, privación de algún factor de crecimiento, se activan las proteínas sólo-BH3, que son iniciadoras de la apoptosis. Por lo tanto, son pro-apoptóticas. Los miembros del tercer grupo contienen también los cuatro dominios BH y también son pro-apoptóticas. Algunos ejemplos incluyen al Bax, Bak y Bok/Mtd.

Cuando hay disrupción en el balance de miembros de la familia Bcl-2 anti-apoptóticos y pro-apoptóticos, el resultado es una apoptosis desregulada en las células afectadas. Esto puede deberse a una sobreexpresión de una o más proteínas anti-apoptóticas o a una sub-expresión de una o más proteínas pro-apoptóticas o a una combinación de ambas cosas. Por ejemplo, se demostró que la sobreexpresión de Bcl-2 (anti-apoptótica) protege a las células del cáncer de próstata de la apoptosis; también se demostró que la sobreexpresión de Bcl-2 lleva a la inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL en los neuroblastomas y en las células de cáncer de mama.

p53

La proteína p53, también llamada proteína tumoral 53 (o TP 53), es uno de las proteínas supresoras de tumores mejor conocidos, codificado por el gen supresor de tumor TP53, localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p). Se los denomina por su peso molecular, es decir 53 kDa. Esta proteína no solo está involucrada en la inducción de la apoptosis sino también tiene un papel clave en la regulación del ciclo celular, diferenciación, desarrollo, amplificación génica, recombinación del DNA, segregación cromosómica y senescencia celular, por lo que es llamada "guardian del genoma".

Inhibidor de proteínas de la apoptosis (IAPs)

El inhibidor de proteínas de la apoptosis son un grupo de proteínas estructural y funcionalmente similares que regulan la apoptosis, citoquinesis y transducción de señales. Se caracterizan por la presencia de un dominio proteico de repetición (BIR). A la fecha, se han identificado ocho IAPs. Los IAPs son inhibidores endógenos de las caspasas y pueden inhibir la actividad de las caspasas uniendo sus dominios BIR conservados a los sitios activos de las caspasas, promoviendo la degradación o manteniendo a las caspasas lejos de sus sustratos.