

Apoptosis

C. G. Ponzinibbio



REVISIÓN

HEMATOLOGIA, Vol. 3 N° 1: 5-15
Enero - Abril, 1999

Cátedra de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de La Plata

¿Un reconocimiento biológico en boga, o un conocimiento necesario para el hematólogo?

INTRODUCCION

...a modo de justificación:

La inclusión del término *apoptosis* como palabra clave para iniciar una búsqueda bibliográfica en cualquiera de las bases de datos relacionadas a información médico-biológica trae aparejada a la fecha una lista integrada por miles de trabajos recientes. Frente a esta situación uno se plantea hasta que punto es esto el fruto de una moda, como suele ocurrir en el campo de la biología cuando se toma conocimiento de un nuevo mecanismo de probable aplicación general, o bien, por el contrario, es la resultante lógica de la importancia del hallazgo. En este contexto surge la cuestión de hasta donde tiene importancia su conocimiento para el hematólogo práctico?

En esta síntesis se intentan tomar los aspectos principales del tema y ofrecerlos al hematólogo en modo mas o menos ordenado para que sea él mismo el generador de sus propias conclusiones. No pretende ser una revisión exhaustiva del tema, sino tan sólo una presentación compendiosa fácilmente leíble.

Cuando en 1972, John Kerr y su grupo de trabajo buscaban una explicación para la aparente paradoja dada por el escaso crecimiento de carcinomas basales con intensa actividad mitótica (1), observaron que numerosas células dispersas en el tumor mostraban características que las señalaban como muertas, pero llamativamente, con un patrón morfológico y de distribución diferente al de la necrosis habitual. No supieron entonces como nombrar a ese fenómeno. Frente a la duda decidieron

consultar a los hombres sabios reunidos en la *Escuela de Atenas*. Estos, luego de prolongadas deliberaciones, y atendiendo a que se encontraban en pleno otoño, concluyeron que este proceso debía ser similar al que ocurre naturalmente en las plantas en esa estación: el desprendimiento de las hojas innecesarias que ayuda a la conservación del individuo, sugiriendo entonces el nombre de *αποπτωση*. Fig. 1.

Tal vez, Kerr ignoraba entonces cuanta tinta haría correr años mas tarde. Lo cierto es que toda vida termina con la muerte celular, y si las células nacen, también viven y mueren. La cuestión aquí entonces planteada es: cómo mueren? Durante muchos años se prestó gran atención a la proliferación celular como expresión del crecimiento, sea del individuo normal en todo y en sus partes, como en los tumores. Ahora, la atención se comparte con la muerte celular como otro fenómeno regulador del recambio celular normal necesario para el mantenimiento de la homeostasis de los individuos pluricelulares.

A la apoptosis hay que entenderla como un mecanismo biológico de supresión de las células cuya existencia ha perdido sentido en el contexto del individuo al que pertenecen

La apoptosis es una forma de morir de las células diferente a la necrosis: por su origen, bioquímica, morfología, distribución y consecuencias para el tejido circundante. Es una muerte celular genéticamente programada, normalmente responsable de la eliminación de células innecesarias en tejidos normales, pero que también ocurre en el contexto patológico, ya sea



Fig. 1. Escuela de Atenas.

en forma espontánea o bien inducida por el tratamiento. Incluso ciertos procesos de defensa normales toman ventaja de este programa genético presente en las células con el fin de suprimir células que se han tornado potencialmente nocivas para el huésped.

Muchas células adultas tienen esta carga genética suicida: de no recibir alguna señal que la rescate, espontáneamente se activa el proceso conducente a su autodestrucción (así como en la rima de Becquer:.. *silenciosa veíase el arpa // cuanta nota dormía en su cuerda...// esperando la mano de nieve / que sepa arrancarla..*). Alternativamente, por ejemplo en el sistema inmune, se presentan situaciones en las que una célula mata activamente a otra induciéndola a la apoptosis por medio de una molécula efectora.

La apoptosis es un proceso fundamental durante el desarrollo de los individuos pluricelulares, incluyendo los mamíferos, permitiendo la regresión de tejidos que devienen innecesarios durante el proceso ontogénico normal (remodelación del aparato locomotor, involución de los conductos müllerianos, eliminación neuronal por competencia de factores tróficos, etcétera). También durante la vida adulta normal, la apoptosis participa activamente en el

mantenimiento de la homeostasis individual. Por ejemplo, en el timo, éste es el mecanismo de delección de células inmunocompetentes autorreactivas o que no han encontrado razón para subsistir (léase: encuentro antigénico seguido de expansión clonal).

A continuación se presentan algunos aspectos básicos esenciales de la apoptosis, para centrar luego la atención en la participación de este proceso de muerte en el sistema hemopoyético.

MORFOLOGIA

Dado que el concepto de apoptosis comenzó a partir de un aspecto morfológico, se puede establecer este punto de partida para su análisis.

Considerando en conjunto, el análisis morfológico histológico, ultraestructural, y dinámico en contraste de fases, se describen los cambios morfológicos siguientes que se suceden durante el desarrollo del proceso de la apoptosis. Inicialmente se observa la pérdida de estructuras especializadas de la superficie celular, tales como microvellosidades o regiones de contacto, y a nivel nuclear la compactación de la cromatina y su redistribución hacia la periferia nuclear formando semilunas granulares o cuerpos toroides. Hay entonces también una reducción del

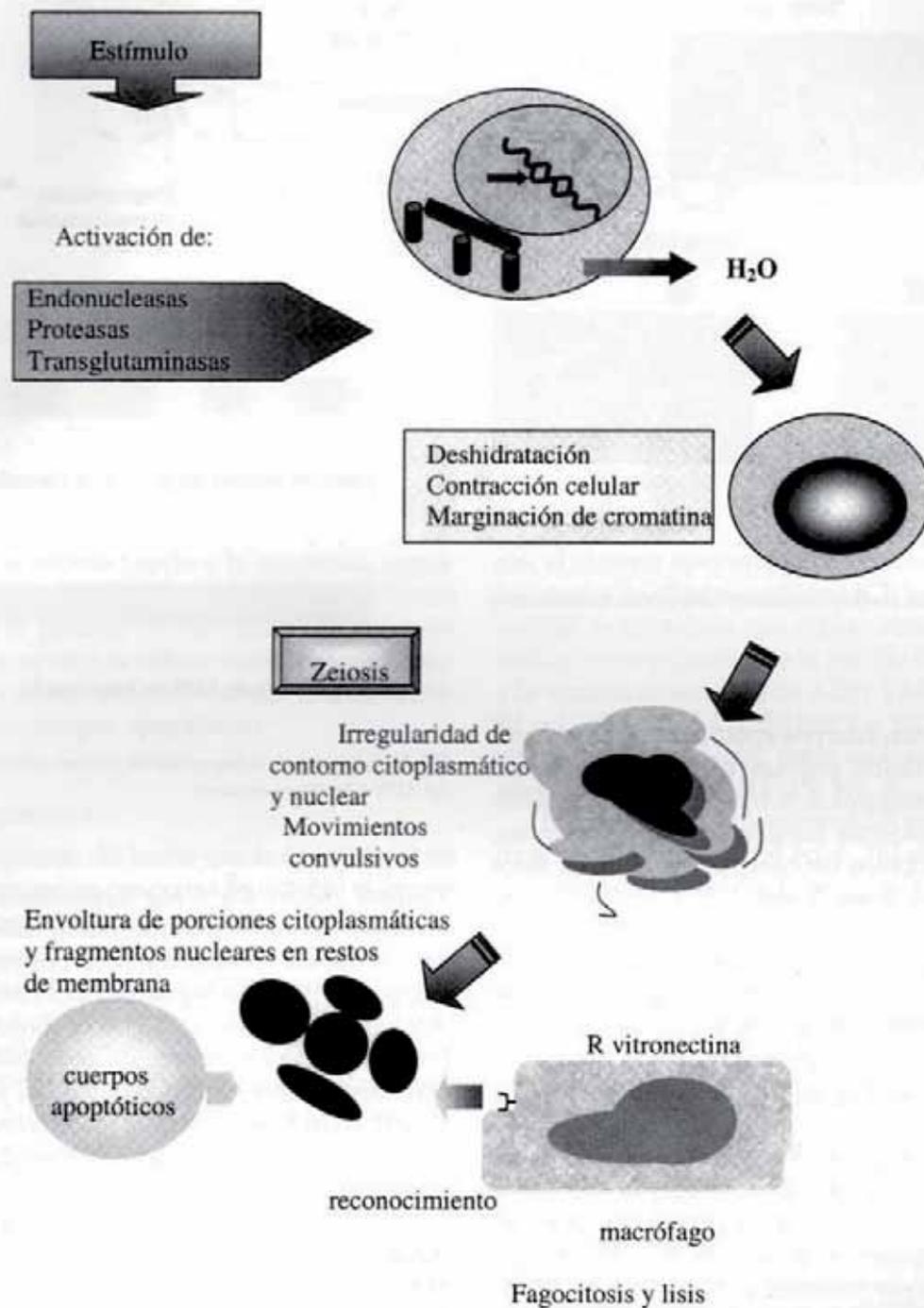


Fig. 2. Esquemmatización de los pasos en la apoptosis

volúmen celular acompañada de condensación citoplasmática. La cromatina se segrega en masas granulares finas. A la condensación inicial le siguen movimientos espasmódicos de la superficie celular, con aparente burbujeo y formación de ampollas superficiales, mientras se desarrolla la fragmentación nuclear en acúmulos discretos de cromatina envueltos por doble membrana nuclear. La célula continúa contorneándose irregularmente, y si bien las mitocondrias permanecen intactas, el retículo endo-

plasmático se dilata y sus membranas se fusionan con la membrana citoplasmática. Las contorsiones violentas de la célula siguen hasta la fragmentación citoplasmática. Cada fragmento se encuentra característicamente envuelto por membrana citoplasmática, y cada uno de ellos contiene una porción del citoplasma con algunas organelas citoplasmáticas que se mantienen íntegras, pudiendo contener también uno o más restos nucleares picnóticos. Estos fragmentos celulares condensados por deshidrata-

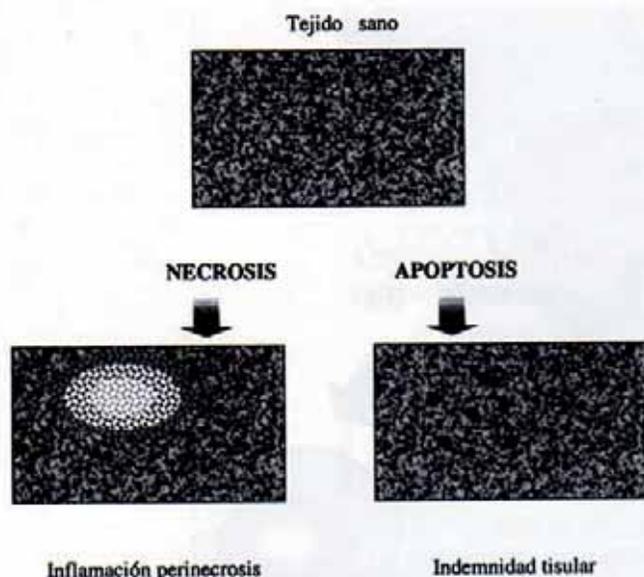


Fig. 3. Diferencias para el tejido circundante entre la muerte accidental y la apoptosis

ción se denominan cuerpos apoptóticos y son reconocidos y fagocitados por las células del sistema monocito-macrófago (3, 4, 5, 6). (Fig. 2). Desde el inicio hasta la fagocitosis transcurren pocos minutos, y una vez fagocitados los cuerpos apoptóticos, éstos son digeridos en pocas horas.

Cuando se mira en conjunto el tejido en el que se desarrolla este proceso, se pueden señalar dos hechos que distinguen claramente la apoptosis de la necrosis o muerte accidental de las células: primero, las células apoptóticas se encuentran distribuidas ampliamente por el tejido y no en focos sometidos a hipoxia como en la necrosis (1), y segundo, la ausencia de inflamación circundante, Fig. 3. Esta ausencia de inflamación tisular, parte de la razón de ser de la apoptosis, es debida al hecho que el contenido citoplasmático queda empaquetado en unidades discretas envueltas por membrana citoplasmática, impidiendo de este modo la liberación al medio de una cantidad de sustancias potencialmente histotóxicas. Mas aún, los cuerpos apoptóticos son rápidamente eliminados del medio por los fagocitos profesionales (4-6).

MECANISMOS MOLECULARES

A nivel nuclear, la fragmentación se correlaciona con la escisión de la doble cadena del ADN a nivel internucleosomal conduciendo a la formación de fragmentos que contienen múltiples de unidades de alrededor de 200 pares de bases cada una. Esta fragmentación del ADN es mediada por la activación de una endonucleasa, aparentemente -por lo menos en

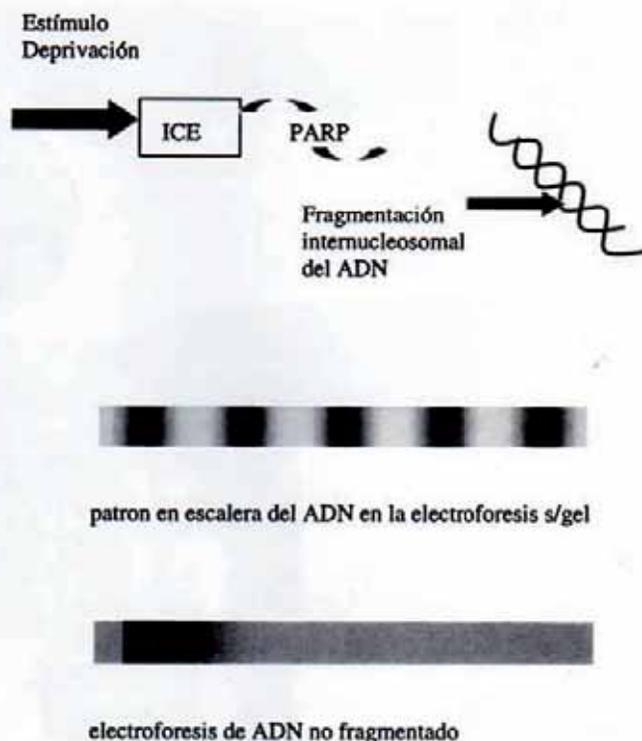


Fig. 4. Apariencia de la fragmentación nuclear a través del análisis en gel del ADN (Patrón en escalera)

algunos casos- Ca / Mg dependiente. Esta endonucleasa está normalmente mantenida inactiva por acción de una polyADPribosa polimerasa (PARP). Cuando la PARP es degradada por cisteinproteinasas activadas durante el inicio de la apoptosis se deja libre el paso para la activación de la endonucleasa. La fragmentación internucleosomal del ADN se ve reflejada cuando se realiza la electroforesis en gel del mismo, ofreciendo un patrón en escalera que es característico (7, 8, 9) (Fig. 4).

Las modificaciones apoptóticas de la forma y el volumen celular se atribuyen a la pérdida de agua y electrolitos, y a la activación de una transglutaminasa citoplasmática. La pérdida de agua pareciera estar mediada por la activación de un sistema de cotransporte de sodio-cloro-potasio a nivel del reticuloendoplasmático. Mediante este sistema se pierde al menos la mitad del agua celular, con conservación de los elementos estructurales mas densos. La activación de la transglutaminasas determina la formación de entrecruzamientos de proteínas citoplasmáticas, formando un casquete debajo de la membrana plasmática, en el que participan proteínas del citoesqueleto, contribuyendo a mantener la integridad inicial de la célula durante el primer tiempo de la apoptosis y evitando el escape de contenido citosólico al medio circundante. Al menos el aumento de la expresión de genes de la β -tubulina se ha visto

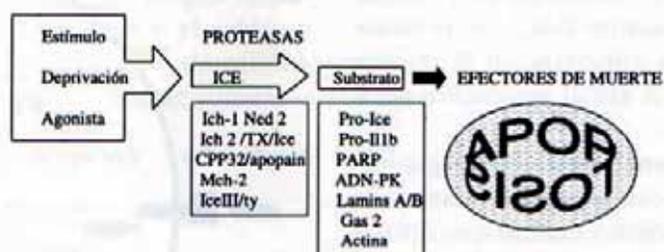


Fig. 5. Secuencia intracelular conducente a la apoptosis

en el tiempo inmediato previo a la apoptosis, seguida de un aumento de la proteína en el citoplasma (10). Durante el proceso de reducción del volumen citoplasmático se ve a la célula sufrir violentos movimientos que cesan cuando comienza la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos

Regulación genética

El reconocimiento del hecho que la apoptosis es un proceso genéticamente programado redobló el interés de los investigadores por la misma.

Es interesante señalar que una buena parte de este conocimiento fue extraída de un nematode: *Caenorhabditis elegans*. Durante su desarrollo, de un total de 1090 células, 131 se pierden por apoptosis. Se han identificado en el mismo 3 genes clave para el desarrollo de la apoptosis, *ced 3* y *ced 4* se requieren para que la apoptosis pueda proceder, mientras que el tercer gen *ced 9* es un regulador negativo de la apoptosis (12, 13). Genes similares a *ced 3* y *ced 4* se han encontrado en mamíferos y parecen codificar proteínas que representan efectores y reguladores de la apoptosis provocada por diversos estímulos altamente conservados durante la filogenia. *Ced 3* se relaciona con una familia de cisteinproteasas de mamíferos, conocida actualmente como la familia ICE (*Interleukin 1 converting enzyme*), porque su proteasa paradigmática es la enzima convertidora de IL1b. Así como *ced 3* en nematodes, ICE juega un importante papel en la regulación de la apoptosis, indicando que la misma implica la proteólisis de una o más proteínas blanco críticas (11). La familia ICE está compuesta por un conjunto de proteínas que comparten ciertas características: todas son capaces de inducir apoptosis cuando se sobreexpresan en las células, todas son sintetizadas como proenzimas, con un sustrato específico para su escisión, aunque pueda va-

riar el sistema operante para alcanzar su activación. La familia de cistein-proteasas ICE tiene a su vez una familia de proteínas que actúan como blanco de su acción, cuyo prototipo es la pro IL-1b y que incluye a la enzima reparadora de ADN, PARP, lamins A, B1, B2 y C, GAS, PK Cd, SREBP1 y SREBP 2. Una vez activados por escisión, estos sustratos actúan como efectores de muerte (14, 15) Fig. 5.

El homólogo en mamíferos del gen *ced-9* es aquel dado por la familia del *bcl-2*. Tal como *ced-9*, *bcl-2* previene la apoptosis inducida por una diversidad de estímulos. Experimentos bastante recientes parecieran indicar que la familia *bcl-2* se sitúa en posición anterior a la familia ICE en la secuencia de señalización y que de alguna forma podría regular la actividad de ICE. Todo parece indicar la presencia de pasos altamente conservados a través de la evolución filogenética (16).

El gen *bcl-2* fue el primero en establecer una nueva clase de oncogenes: aquellos que en lugar de promover la proliferación celular, protegen, en cambio, de la muerte celular programada (17). Bcl 2 es una proteína intracelular, localizada en las mitocondrias, retículoendoplasmático liso y membrana nuclear. La porción carboxi terminal actúa como ancla para unirse a la membrana externa mitocondrial y es la vía de señalización, quedando la mayor parte del polipéptido expuesto a la proteólisis en citosol celular

Se sabe que esta es una familia de proteínas con un número creciente de integrantes. Algunas de ellas participan de la capacidad antiapoptótica de Bcl-2 (Bcl-Xl) mientras que otras, por el contrario, muestran capacidad proapoptótica, (Bax, Bad, Bak). En todo caso, para iniciar la señalización intracelular se requiere siempre de la dimerización proteica, dependiendo entonces de la forma en que ésta se realice el resultado para la célula. Bax es la proteína acompañante natural de Bcl-2. Con la formación de un

heterodímero Bcl-2 / Bax, la relación de proporción entre ambos es crítica. Si se establece una homodimerización entre dos moléculas Bcl-2, se previene la apoptosis, si en cambio la dimerización se realiza entre dos moléculas Bax la señal resultante será proapoptótica

Bcl X es otra proteína homóloga de Bcl-2 que tiene una semejanza llamativa con la porción formadora de poros en membranas de ciertas toxinas que actúan como canales para proteína o iones (18). Una cantidad de evidencias se están acumulando para implicar a esta familia de proteínas en la formación de canales en la membrana mitocondrial, que permitirían la emigración de citocromo-c, el que a su vez presenta capacidad de activar caspasas. A pesar de la importancia de esta capacidad, no sería la única forma de esta familia de regular la vida celular. Al menos dos proteínas de la familia: Bcl-2 y Bcl-X se han encontrado capaces de coprecipitar otras once proteínas, entre las que figuran proteínas asociadas a oncogenes *ras* y *p 53*, ambos activos participantes en la regulación celular.

Bad es otra proteína integrante de la familia, si bien está poco expresada en las células del sistema hemopoyético, posee la capacidad de neutralizar el efecto antiapoptótico de bcl-2 y particularmente de Bcl-Xl al heterodimerizarse con ellos (19). Su actividad depende del estado de fosforilación, pues al fosforilarse, la proteína es trasladada de la membrana de las organelas al citosol celular.

En conjunto, el resultado de la acción de las proteínas de esta familia depende del modo en que se realiza la dimerización, apareciendo la regulación del transporte a través de las membranas de las organelas citoplasmáticas (mitocondrias, retículo endoplasmático) como el principal mecanismo de acción.

p53: este gen, conocido como el guardián del genoma (20), es el encargado de prevenir la amplificación del daño cromosómico. Cuando el ADN de una célula sufre una mutación, sea espontánea o inducida por una injuria ambiental, la *p53* se fosforila actuando como factor de transcripción y detiene el ciclo celular en G_1 , permitiendo la acción de enzimas que reparen la mutación. Una vez realizada la reparación, la defosforilación de *p53* permite a la célula continuar en ciclo. Si por el contrario, el daño fue de tal magnitud que el ADN no se puede reparar, *p53* induce a la célula a entrar en apoptosis, previniendo así la replicación de un ADN alterado (21, 22).

Se dijo que se presentan situaciones en las que algunas células inducen activamente la apoptosis de sus células blanco mediante moléculas efectoras. Para ello se hace necesario que las células blanco presenten un receptor para esas moléculas. El principal receptor vinculado a esta actividad fue identi-

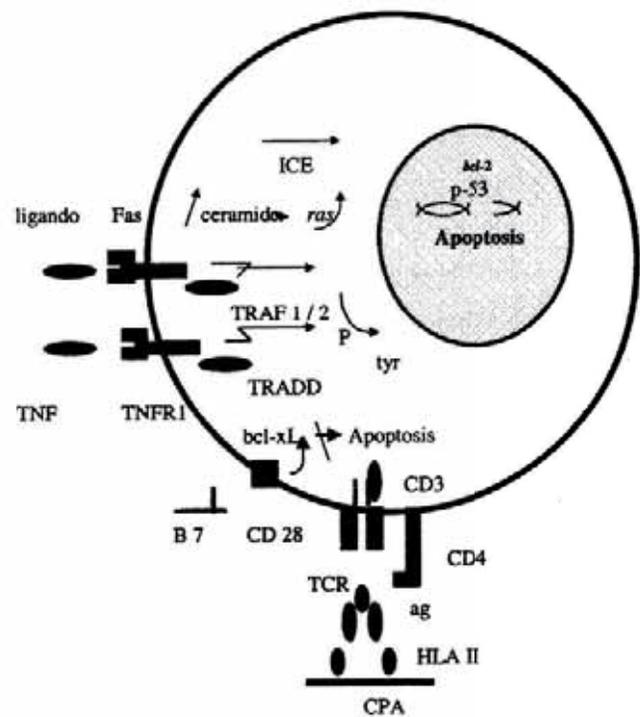


Fig. 6. Receptor FAS y vía de transducción intracelular en células linfoides T, CD4+

ficado y nombrado como receptor FAS (Apo o CD 95) y su ligando como FAS-L (23). Este receptor pertenece a la familia de los receptores de la muerte, cuyo prototipo es el receptor para el Factor de necrosis tumoral (TNF). La porción extracelular de este receptor está constituida por tres dominios ricos en cisteína. Mientras que esta porción se encuentra representada en todos los integrantes de la familia, la porción citoplasmática del receptor es similar sólo en dos casos, el receptor para TNF 1 y el receptor Fas. Esta porción es necesaria y suficiente para la transducción de la señal apoptótica y se la designa como dominio de la muerte. Se han clonado los genes e identificado un número de proteínas que actúan como transductores intracelulares de la señal. Al menos tres proteínas presentan un dominio de 80 aminoácidos capaz de dimerizarse con la porción citoplasmática de los Receptores Fas y TNF: FADD (*Fas asociated death domain*), RIP (*Fas R interacting protein*) y TRADD (*TNF receptor asociated death domain*). Estas proteínas se unen a una proteasa del tipo ICE, llamada MACH/FLICE, que a su vez sigue la cascada de activación de caspasas (24, 25) (Fig. 6).

La expresión de Fas R es pasible de regulación, y puede ser sobreexpresado por exposición de las células a $IFN\gamma$ y $TNF\beta$.

El ligando para Fas fue purificado como una proteína de pm 40 kd, y es codificado por un gen ubicado en el cromosoma 1 en el humano y el ratón, y células T activadas muestran expresión de mRNA para el mismo. Fas L se puede encontrar soluble o bien unido a membranas celulares

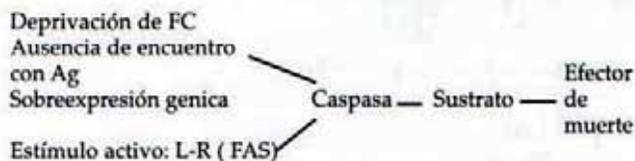
SECUENCIA PROPUESTA:

Se puede postular que a la apoptosis se puede llegar por dos vías principales:

- Una espontánea, en la que la ausencia del elemento de rescate deja libre el paso para la continuación del programa genético de la célula conducente a la apoptosis

- La otra, en la que células genéticamente susceptibles a la apoptosis, son activamente inducidas a la misma por la activación mediada con una señal sobre el receptor específico (FAS L > FAS R)

A partir de cualquiera de las dos vías, se desencadena una secuencia que implica inicialmente la activación de una caspasa, la que a su vez activa un sustrato, el que se activa o se convierte en un efector de la muerte celular. este esquema se sintetiza en la figura siguiente:



LA APOPTOSIS EN LA REGULACION CELULAR DEL SISTEMA HEMOPOYETICO

El sistema hemopoyético constituye la fina expresión de una respuesta biológica a la necesidad recurrente de producir nuevas células diferenciadas. Este sistema capaz de adaptarse elásticamente a las exigencias impuestas, se encuentra bajo un mecanismo de regulación en extremo delicado y sensible. Además de contar con la regulación de la proliferación y diferenciación celular, pareciera que la apoptosis desempeña un papel importante como mecanismo de limitación de la supervivencia celular (26, 27). La apoptosis estaría regulada tanto por sistemas paraacrinicos de interacción entre células en contacto, como por la acción de una cantidad de mediadores químicos solubles secretados por células: las citoquinas (28). En general, las citoquinas extienden la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis (29). Por ejemplo, en sistemas de cultivo se ha podido observar que la mayoría de los factores de crecimiento hemopoyéticos (IL-

3, eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF), además de estimular la proliferación celular, son necesarios para evitar la apoptosis de las células (28). Por el contrario, TGF β es capaz de inducir la apoptosis de células de línea mieloide y de precursores hemopoyéticos (30). Se ha puesto en evidencia que TGF β deregula la expresión en superficie del *c-kit*, el receptor para el factor de crecimiento de células madre (SCF) en precursores hemopoyéticos muy tempranos (31), privándolos de un factor de supervivencia esencial, el que al faltar no inhibe la apoptosis genéticamente programada. También TNF α e IFN γ tendrían un efecto proapoptótico y parecerían actuar estimulando la síntesis de óxido nítrico (ON) con aumento de producción lo que a su vez promovería la apoptosis celular. Ambas citoquinas producirían también la expresión del Fas R en precursores CD 34+ que constitutivamente no lo expresan (26, 32).

En lo concerniente a la participación del oncogen *bcl-2* y el conjunto de proteínas que integran su familia se ha intentado estudiar su participación en la regulación de la hemopoyesis normal. En estudios funcionales se pudo observar que la sobreexpresión constitutiva de *bcl-2* suprime la apoptosis inducida por la remoción del factor de crecimiento en líneas celulares (33). La expresión de *bcl-2* y *Bcl-x* se correlaciona en forma inversa con la posibilidad de evolución a la apoptosis de las células hemopoyéticas. Tanto *bcl-2* como *bcl-x* son expresados en precursores inmaduros, particularmente durante el período embrionario y parecería participar activamente en la regulación de la supervivencia de estos precursores durante la embriogénesis.

En conjunto, las citoquinas parecieran modular la expresión diferencial de los genes reguladores de la muerte en las células hemopoyéticas más tempranas (27). Por ejemplo, experimentalmente se ha visto que IL-3 mantiene la expresión de *bcl-2*, y cuando se retira la IL-3, se deregula la expresión de *bcl-2* y las células mueren por apoptosis, mientras que la aplicación de GM-CSF a mieloblastos leucémicos estimula la sobreexpresión de *Bcl-x* confiriendo resistencia a la apoptosis inducida por la aplicación de quimioterapia.

El análisis de los mecanismos participantes en la regulación de la apoptosis por medio de citoquinas en las células hemopoyéticas ha conducido a una disección molecular de los mecanismos de transducción intracelular que utilizan normalmente los receptores para los factores de crecimiento. Básicamente, existen dos tipos de receptores: aquellos que poseen actividad de tirosinquinasa intrínseca (SCF, M-CSF) y los que sin poseer esta actividad activan moléculas adyacentes con actividad de tirosinquinasa sobre residuos de tirosina (IL-3, GM-CSF, Epo)

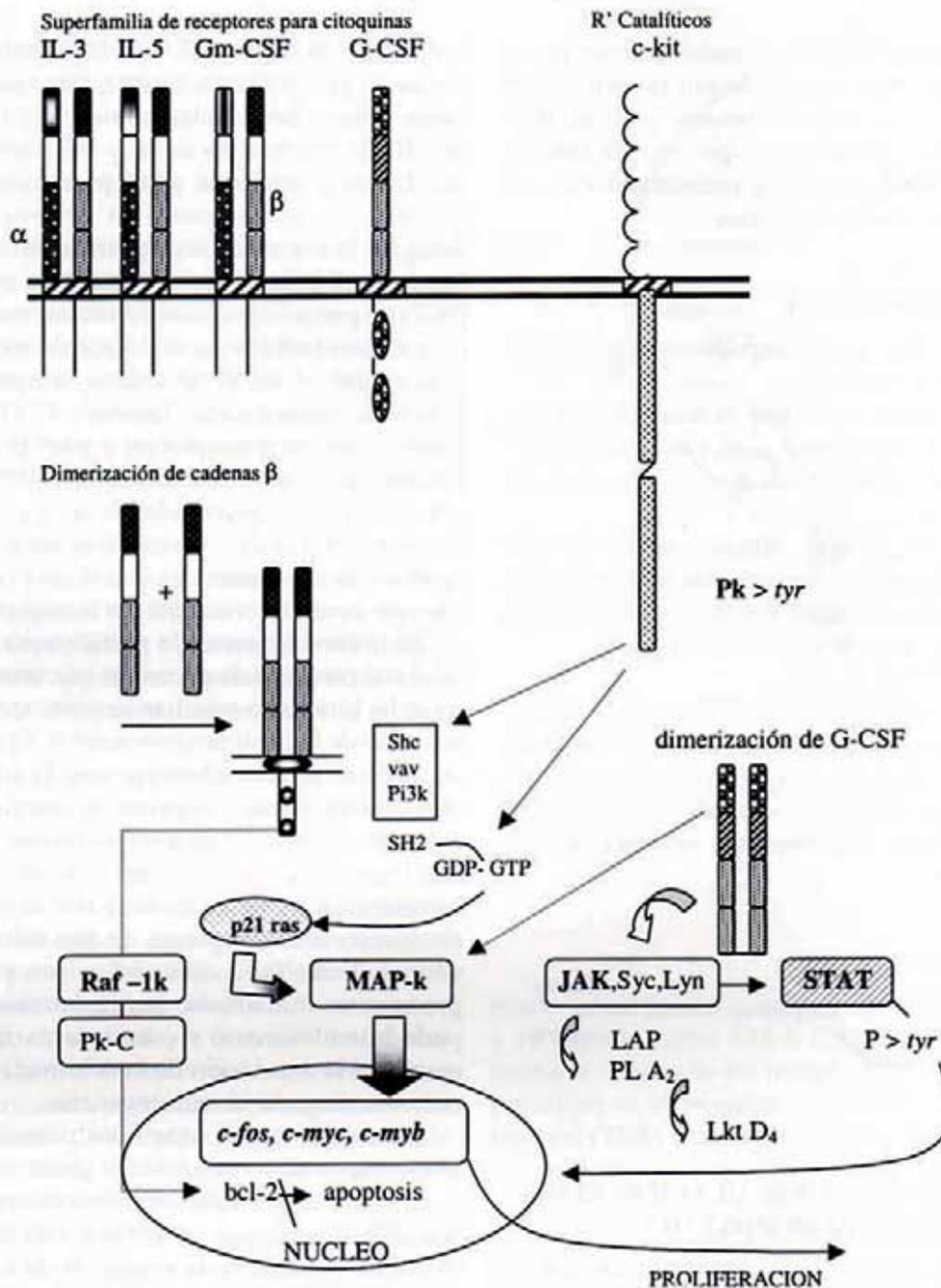


Fig 7. Receptores para citoquinas y mecanismos de transducción intracelular

(34). Estos receptores son heterodiméricos, con una cadena específica para el ligando y una subunidad β común. Habitualmente para el inicio de la transducción de la señal se hace necesaria la dimerización de cadenas β . Ahora bien, el análisis molecular de esta cadena β ha permitido reconocer en ella dos dominios, uno proximal y uno distal con distinta capacidad funcional. El dominio proximal actuaría activando proteínas reguladoras de la familia Janus (Jak) con actividad de tirosinquinasa sobre tirosina y capacidad de inducir la expresión del oncogen *c-myc* que actúa como factor de estimulación nuclear

estimulando la síntesis de ADN (35). El dominio distal es responsable de la fosforilación de tirosina induciendo la expresión de los oncogenes, *c-fos*, *c-jun* y estimulando la vía de señalización dependiente de la proteína *p21-ras*, (Fig 7). Se ha observado que este dominio, es el que tiene la capacidad de suprimir la apoptosis, prolongando la viabilidad de la célula. También se ha puesto en evidencia la capacidad de este dominio intracelular de la cadena β de los receptores para estimular la expresión de *bcl-2*, resultando su acción en función del modo de dimerización de las proteínas de esta familia. Un mecanismo ope-

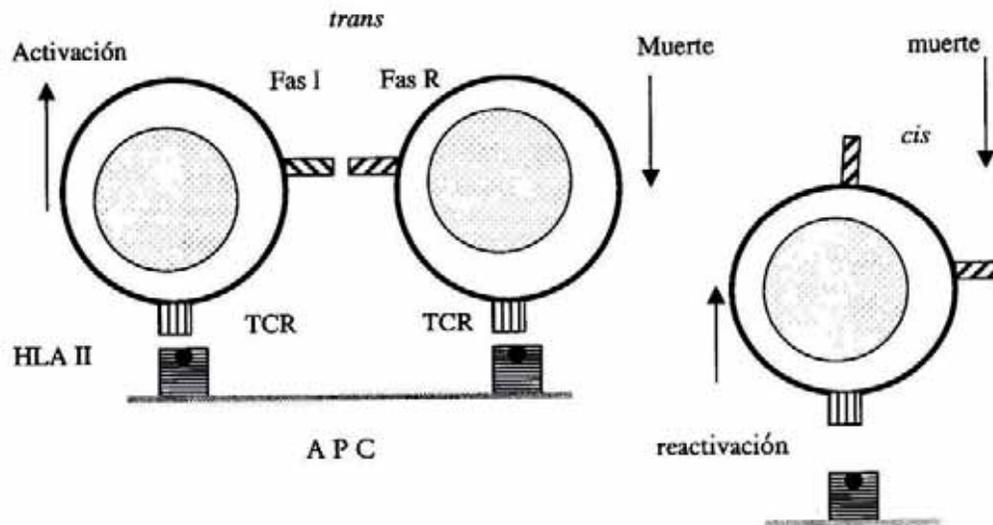


Fig. 8 Activación de la señal por activación del receptor FAS en posición *trans* o *cis* en células linfoides

rante en forma similar se ha podido señalar para el receptor de la eritropoyetina.

En conclusión se puede decir que las citoquinas actuantes en la regulación de la hemopoyesis participan no sólo en la regulación de la proliferación y diferenciación celular sino también en la regulación de la apoptosis. Los efectos de cada uno de los mediadores sobre un tipo celular pueden ser opuestos, dependiendo su acción del estado de maduración de la célula blanco.

Donde se hace mas evidente la participación del proceso de apoptosis para el mantenimiento de la homeostasis es en el sistema inmune, cuyo sustrato celular es otorgado por el tejido linfoide, (36, 37).

Si bien todas las células linfoides normales se originan en la médula ósea a partir de un precursor común, las células T migran al timo para su ulterior maduración adquiriendo el fenotipo CD4 o CD8 (38). Para ello pasan por un estadio previo de doble positividad CD4+ CD8+, con capacidad de reactividad diversa. De hecho es en el timo donde se produce la delección de clones autoreactivos, capaces de reconocer epitopes propios en contexto del propio HLA (selección negativa) (39, 40). Pues bien, de todas las células que ingresan al timo, el 95% muere por apoptosis y tan sólo el 5% alcanza los órganos linfoides periféricos como células linfoides maduras. Pareciera que esta apoptosis es mediada por un mecanismo único al tejido linfático: la expresión de receptor y ligando Fas, al menos por dos vías principales, la expresión en *trans* del L y R en células separadas, pero espacialmente yuxtapuestas, o alternativamente, la expresión en *cis* de ambas moléculas en la misma célula (23). (Fig. 8).

El mismo sistema de señalización participa en los mecanismos de citotoxicidad mediado por células. Tanto los linfocitos citotóxicos, como las células NK o las células activadas por linfoquinas inducen la apoptosis de sus víctimas a los pocos minutos del contacto. Al menos dos mecanismos parecieran operar para obtener la destrucción del blanco. El primero es el secretorio. En este caso la perforina, proteína granular de estos tipos celulares, se secreta al contacto con la membrana de la célula blanco. Granzyme, cosecretado junto a la perforina, se introduce a través de los canales abiertos por la perforina en la membrana celular de la célula blanco, estimulando la apoptosis a través de la activación del sistema de caspasas (24).

El segundo mecanismo, no secretorio, implica la expresión del ligando Fas en la célula efectora, que se acopla al receptor Fas en la célula blanco. La unión del L al R desencadena la secuencia de apoptosis propuesta, gatillando una secuencia de activación sucesiva de proteasas y sustratos (23, 24).

Otra diferencia que se puede señalar entre ambos mecanismos está dada por la participación del Ca^{++} . En el mecanismo habitual secretor, junto con la secreción de perforina y granzymes, se hace disponible en el sitio una cantidad de Ca^{++} necesario para la polimerización de la perforina y mantenerla unida a la membrana. En cambio, el mecanismo de activación de la apoptosis mediada por la unión del L al R Fas, pareciera ser del todo Ca^{++} independiente (24).

Pese al la diferencia en el mecanismo de activación, una vez gatillada, la secuencia de señalización intracelular mediada por activación de caspasas pareciera ser la misma en ambos casos

El sistema Fas L/Fas R aparece como esencial en el sistema inmune: no sólo se emplea para la deleción de clones autoreactivos, como mecanismo de citotoxicidad para controlar la proliferación de células que expresan epitopes virales- o eventualmente neoplásicos- sino que también parecería participar en el establecimiento de los llamados santuarios del sistema inmune, tal como la cámara anterior del ojo. En este sitio, la expresión del Fas L controlaría la ejecución de células linfoides activadas que expresan el receptor, permitiendo la sobrevivencia de injertos incompatibles instalados en ese sitio.

No sólo los linfocitos mueren por apoptosis. También los polimorfonucleares no utilizados en su función primaria de defensa son eliminados por apoptosis en un intento de evitar el daño tisular implícito en el potencial tóxico del contenido neutrofílico en tejidos sanos. Si bien en algunos experimentos se ha señalado la expresión del receptor Fas en PMNs, no se ha aclarado aún la vía por la que se desencadena el mecanismo de apoptosis en estas células (41). Se ha visto que los macrófagos utilizan el receptor para vitronectina para reconocer PMNs envejecidos, pero además, el cambio de la simetría normal de la membrana celular, con la expresión en superficie de fosfatidilserina, constituiría otro mecanismo de reconocimiento por parte de los macrófagos. Otro hecho interesante para señalar en este punto es que los factores de crecimiento específicos de línea G y GM-CSF actúan inhibiendo o retardando la apoptosis en PMNs. Este efecto es compartido por el Interferon γ y por los glucocorticoides. En este caso, se puede especular que constituye otro mecanismo para explicar la neutrofilia observada asociada al uso de glucocorticoides.

A MODO DE CIERRE

Hasta este punto se han presentado algunos aspectos esenciales básicos pertinentes a este proceso dado en llamar *apoptosis*, y luego se ha visto algo de su participación en la regulación de la homeostasis del sistema hemopoyético normal. Tal vez lo expuesto alcance para comprenderlo, y justificar así tanto que se escribe. Pero, mas aún, el análisis podría continuar, pues son cada vez mas numerosas y frecuentes las publicaciones concernientes a la participación del proceso de apoptosis en la patogenia de la patología hemopoyética. Bien, ésta sería otra historia..., ya con peso propio suficiente...

BIBLIOGRAFIA

- Kerr JF, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 1972; 107: 41-4.
- Kerr JF, Winterford C, Harmon B. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-26.
- Cooper G. Apoptosis (Programmed cell death) en The cell, a molecular approach. ASM Press, Washington 1997 p592-97.
- Howie SE, Harrison DJ, Willye AH. Lymphocyte apoptosis, mechanisms and implications in disease. *Immuno Rev* 1994; 142: 141-56.
- Koury MJ. Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp Hematol* 1992; 20: 391-4.
- Willye AH. Cell death. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- Willye AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-56.
- Cohen J, Duke R. Glucocorticoid activation of a calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984; 132: 38-42.
- McConkey D, Aguilar Santelises M, Hartzell P et al. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 1991; 146: 1072-6.
- Cotter T, Lennon S, Glynn J, Green DR. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res* 1992; 52: 997-1005.
- Yang E, Korsmeyer S. Molecular thanaptosis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
- Vaux D, Weissman IL, Kim S. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992; 258: 1955.
- Wallach D, Boldin M, Kovalenko A, et al. The yeast two hybrid screening technique and its use in the study of protein-protein interactions in apoptosis. *Cur Op Immunol* 1998; 10: 131-6.
- Whyte M. ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 1996; 6: 245-48.
- Thornberry N, Rosen A, Nicholson D. Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol* 1997; 41: 155-77.
- Reed J. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997; 387: 773-6.
- Korsmeyer S. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80: 879-86.
- Minn A, Vélez P, Schendel S et al. Bcl-xl forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385: 353-7.
- Kitada S, Krajewska M, Zhang X et al. expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines. *Am J Pathol* 1998; 152: 51-61.
- Lane DP. Cancer p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
- Clarke A, Purdie C, Harrison D. et al. Thymocyte apoptosis induced by p 53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-852.
- Lowe S, Schmitt E, Smith S et al. p 53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.
- Berke G. Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Immunol Today* 1995; 16: 343-46.
- Rudin C, Van Dongen J, Thompson C. Apoptotic signalling in lymphocytes. *Cur Op Hematol* 1996; 3: 35-40.
- Campana D, Cleveland J. Regulation of apoptosis in normal hemopoiesis and hematological disease. *Rec Adv Hematol* 1996; 8: 1-20.
- Eckert P, Vaux D. Apoptosis, haemopoiesis and leukaemogenesis. *Bail Clin Hematol* 1997; 10: 561-76.
- Park J. Cytokine regulation of apoptosis in hematopoietic precursor cells. *Cur Op Hematol* 1996; 3: 191-6.
- Williams G, Smith C, Spooner E. et al. Hemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing

- apoptosis. **Nature** 1990; 343: 76-79.
30. Graham G. Growth inhibitors in haemopoiesis and leukaemogenesis. **Bail Clin Hematol** 1997; 10: 539-559.
 31. Broudy V. Stem cell factor and hematopoiesis. **Blood** 1997; 90: 1345-64.
 32. Lee JW, Beckham C, Michel B, Rosen H, Deeg J. HLA-DR mediated signals for hematopoiesis and induction of apoptosis involve but are not limited to a nitric oxide pathway. **Blood**; 1997; 90: 217-25.
 33. Nunez G, London L, Hockenberry D et al. Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor deprived hemopoietic cell lines. **J Immunol** 1990; 144. 3602-10.
 34. Woodcock J, Bagley C, López A. Receptors of the cytokine superfamily: mechanisms of activation and involvement in disease. **Bail Clin Hematol** 1997; 10: 507-24
 35. Aronica S, Broxmeyer H. Advances in understanding the postreceptor mechanisms of action of GM. CSF, G-CSF, and Steel Factor. **Cur Op Hematol** 1996; 3: 185-90.
 36. Cohen J. programmed cell death in the immune system. **Adv Immunol** 1991: 50-55.
 37. Murray R. Physiologic roles of Interlekin 2, interleukin 4 and interleukin 7. **Cur Op Hematol** 1996; 3: 230-4.
 38. Von Bohemer H. Thymic selection: a matter of life and death. **Immunol Today** 1992; 13: 454-6.
 39. Cohen J. Exponential growth in apoptosis . **Immunol Today** 1995; 16: 346-48.
 40. Jameson S, Bevan M. T-cell selection. **Cur Op Immunol** 1998; 10: 214-9.
 41. Homburg C, Roos D. Apoptosis of neutrophils. **Cur Op Hematol** 1996; 3: 94-99.