

Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación

Masyelly Rojas, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta

Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela

Recibido Noviembre 3, 2009. Aceptado Noviembre 25, 2009

PROGRAMMED CELL DEATH: I. ACTIVATION AND REGULATION MECHANISMS

Resumen

La apoptosis juega un papel importante en muchas facetas de la fisiología celular, incluyendo la muerte celular programada asociada con el desarrollo, homeostasis de tejidos, educación de las células inmunes y algunos aspectos del envejecimiento. En la patogénesis de múltiples enfermedades están implicados defectos en los mecanismos de regulación de la apoptosis, lo cual puede explicar como el estudio de la muerte celular programada ha emergido como una de las áreas de crecimiento, más rápidas de las investigaciones biomédicas en años recientes.

PALABRAS CLAVE: Apoptosis, muerte celular programada, caspasas, receptores de muerte, regulación, dominios de muerte.

Abstract

The apoptosis plays an important role in the cellular physiology, including development, homeostasis, instruction of the immune cells and aging. Defects in the mechanisms of regulation of the apoptosis are implicated in the pathogenesis of multiple diseases, which can explain why the study of cell death has emerged as one strengthening area of biomedical research in recent years.

KEY WORDS: Apoptosis, cell death, caspases, death receptor, regulation, death domain

Introducción

La apoptosis es una forma de muerte celular, caracterizada por distintos cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina y fragmentación nuclear (*pyknosis*), pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular. Eventualmente la célula se rompe en pequeños fragmentos rodeados de membrana (conocidos como cuerpos apoptóticos), los cuales son eliminados por fagocitosis, sin iniciar una respuesta inflamatoria (1). La liberación de los cuerpos apoptóticos inspiró el término de “apoptosis”, palabra griega que significa “caerse o desprenderse”, que evoca la caída de las hojas de los árboles en otoño. La apoptosis es de reconocida importancia en animales vertebrados e invertebrados y en plantas.

Bajo condiciones patológicas la muerte celular puede ser modulada. En ocasiones carece de la constelación de cambios morfológicos asociados con la apoptosis fisiológica, o retiene solamente porciones del programa, así que estrictamente no califica para ser llamada apoptosis, ejemplo de ello son los cambios generados durante la isquemia (2). Las evidencias indican que la apoptosis insuficiente se puede manifestar como cáncer o autoinmunidad, mientras que la muerte acelerada se aprecia en enfermedades degenerativas agudas y crónicas, inmunodeficiencias e infertilidad (3).

La apoptosis también es un mecanismo de defensa importante contra patógenos. Así, el suicidio celular puede constituir un mecanismo para privar a los virus del hospedador celular para su replicación, limitando así su dispersión. También, algunas de las familias de las proteínas

involucradas en la regulación de la apoptosis participan en la respuesta inflamatoria hacia patógenos microbianos, por ejemplo, las caspasas que son una familia de proteasas efectoras críticas del programa de apoptosis, pueden degradar y activar citocinas proinflamatorias, tales como pro-interleucina- 1β (pro-IL- 1β) y pro-IL-18; de manera similar, proteínas involucradas en la activación de caspasas participan en la activación del factor nuclear (NF)- $\kappa\beta$, el cual regula la expresión de numerosos genes importantes para la respuesta inflamatoria e inmunidad innata y adquirida (2). Como se puede evidenciar, el proceso de muerte celular y sus reguladores están involucrados en el control de múltiples procesos celulares, importantes en la homeostasis celular, es por ello que en esta revisión, abordaremos los mecanismos moleculares involucrados en la activación y modulación de la muerte celular programada.

Mecanismos de activación de la muerte celular programada

La muerte celular puede activarse a través de la vía **intrínseca** o de la vía **extrínseca**, dependiendo del origen del estímulo de muerte. La vía **intrínseca** es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN. La inactivación de esta vía es generalmente llevada a cabo como un sello del cáncer (4). Esta vía es mediada en la mitocondria, y en respuesta a estímulos apoptóticos diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de las proteínas bien caracterizadas incluyen: el citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) y Omi/HTRA2 (proteína A2 requerida para las altas temperaturas). Quizá la más importante de estas proteínas proapoptóticas sea el citocromo c, el cual se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que

media la activación autocatalítica de caspasa 9 (3, 5, 6), y esta a su vez activa a la principal caspasa efectora, caspasa 3 (7).

La **vía extrínseca** es mediada por la activación de receptores, como la unión de un ligando de muerte (FasL) a su receptor específico (Fas) en la superficie celular. Los ligandos de muerte son constitutivamente homotriméricos; la unión a sus receptores conduce a la formación de un complejo homotrimérico mínimo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y caspasa 8, formando el complejo DISC (ver más adelante). La formación de DISC conduce a la activación de caspasas iniciadoras tales como caspasa 8, la cual posteriormente rompe y activa a la caspasa efectora, caspasa 3. La función de DISC en la activación de caspasa 8 se piensa que es análoga a la activación de caspasa 9 por el apoptosoma, aunque se desconocen los detalles del mecanismo molecular. Ambas vías pueden entrecruzarse a través de la degradación de Bid mediada por caspasa 8, el cual conduce entonces a la activación de la vía mitocondrial (5-8).

La apoptosis inducida por Fas puede seguir dos vías. En las células tipo I, como los timocitos in vitro, la apoptosis inducida por Fas es refractaria a Bcl-2, debido a una degradación suficiente de caspasa 8 y activación de caspasa 3 y 7. En las células tipo II, como hepatocitos, Bcl-2 bloquea la muerte celular mediada por Fas y es requerida una amplificación mitocondrial en donde la caspasa 8 media la degradación de Bid (miembro de la familia Bcl-2) resultando en su traslado hacia la mitocondria y la liberación de citocromo c, para generar suficiente actividad caspasa efectora y provocar la muerte de tales células (3). Otro grupo de receptores de muerte se ha caracterizado y muestran diferentes ligandos de muerte conocidos como Apo2L, y los TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF). Las células cancerígenas, pueden mostrar una sensibilidad relativa hacia la apoptosis mediada por TRAIL. La formación del complejo DISC y la degradación de Bid es similar a la vía Fas (3).

Dominios de muerte

Las proteínas involucradas en la apoptosis forman una red herméticamente regulada, en la cual la mayoría de las interacciones resultan de los dominios evolutivamente conservados que pueden ayudar para su identificación, e incluyen: (i) dominio de reclutamiento asociado a caspasas (CARD); (ii) dominio efector de muerte (DED); (iii) dominio de muerte (DD); (iv) dominio BIR del inhibidor de las proteínas de la apoptosis (IAP), y (v) dominios con homología a Bcl-2 (BH) de la familia de proteínas Bcl-2. La producción de esta red de interacciones de proteínas determina si ciertos efectores de la apoptosis son activados en cantidad suficiente para acometer la muerte de la célula. Las más prominentes decisiones de muerte celular son ejecutadas por (a) la familia de caspasas o proteasas de muerte celular, mencionadas anteriormente, y (b) las endonucleasas apoptóticas que contienen el dominio CIDE (2).

Organismos superiores como los humanos y el ratón, poseen familias de genes que codifican para múltiples proteínas que contienen uno o más de los dominios antes señalados. Esta familia de proteínas incluye: (i) ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF); (ii) receptores de TNF (TNFRs); (iii) dominios TIR (receptor IL-1 y *Toll*); (iv) dominios pirinas (también llamados PAAD; AIM, ausente en melanoma; ASC, proteína asociada con la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasas y otro semejante a DD), Pyk o DAPIN (dominio en apoptosis y respuesta a interferón); (v) TRAFs (factores asociados a TNFR); (vi) familia de proteínas IKB y REL (NF- κ B), y (vii) dominios BAG (genes antagónicos asociados a Bcl-2) (2). A continuación se discutirán cada uno de estos dominios y su papel en el proceso de muerte celular.

a. Dominios de reclutamiento de caspasas (CARDs)

El CARD es un módulo de interacción de proteína compuesto de un haz de seis α -hélices. Este dominio está comúnmente implicado en la

regulación de caspasas que contienen CARDs, incluyendo en humanos las caspasas 1, 2, 4, 5, y 9. Sin embargo, los CARDs se encuentran comúnmente involucrados en la regulación del factor de transcripción NF- κ B coincidiendo con un estrecho enlace entre apoptosis, inflamación y mecanismos de defensa del hospedador. Los CARDs se asocian con otros dominios CARDs formando dímeros con complementariedad de superficie que dicta especificidad. En el humano, seis de las caspasas hasta ahora descritas poseen dominios CARD. Se han reportado otras proteínas que presentan solamente un dominio CARD (por ejemplo, la proteína *Iceberg*), o donde CARD se combina con un máximo de cuatro dominios adicionales, incluyendo dominio de unión a nucleótidos, NACHT o NB-ARC (como Apaf-1), dominios pirinas, repeticiones ricas en leucina (LRRs), repeticiones WD, SH3 (homóloga 3 a Src), POI, guanilato quinasa asociadas a membrana (MAGUK). BIR, Ring y DDs (2, 3, 5).

En general el mecanismo por el cual los CARDs participan en la activación de caspasas involucra el ensamblaje de complejos multiproteicos. El complejo puede facilitar la dimerización o servir como un andamio sobre el cual las proteasas o proteínas quinasas se reúnen y activan, a través de mecanismos inducidos por proximidad. Algunos complejos se ensamblan espontáneamente, mientras que otros requieren inductores endógenos o exógenos (2, 6).

b. Dominios efectores de muerte (DEDs)

El DED es otro módulo de interacción homotípica, similar a los CARD; están compuestos por seis α -hélices, semejantes a otros miembros de la superfamilia de dominios de muerte. La dimerización de los DEDs, es mediada primariamente por interacciones electrostáticas. Las proteínas que contienen DED han sido implicadas en la regulación de la apoptosis a través de interacciones con caspasas que contienen DED (caspasas 8 y 10). Los DEDs pueden encontrarse solos o en combinación con otros dominios de proteínas, los pares en tándem de DEDs encontrados en el pre-dominio de caspasas 8 y

10, proveen la base para una red de interacciones que suprimen o promueven la activación de estas proteasas (2, 9, 10). Los mecanismos de activación de caspasas que contienen DEDs fueron revelados en estudios de inducción de la apoptosis del receptor Fas, de la familia del TNF, también llamados APO1 o CD95. La unión de este receptor en la superficie celular resulta en la agrupación y reclutamiento de los dominios citosólicos de procaspasas que contienen DED, formando un complejo señalador inductor de muerte (DISC) que desencadena la activación de caspasas y conduce a la apoptosis. El DED en procaspasa 8 y 10, se une a DED complementario de FADD, una proteína adaptadora bipartita que contiene a DED y un dominio estructuralmente relacionado que se enlaza a FADD directa o indirectamente hacia la cola citoplasmática de ciertos receptores de muerte de la familia TNF (2, 11, 12).

Se han identificado múltiples moduladores de la apoptosis que contienen DEDs, algunos de los cuales aumentan y otros inhiben la activación de caspasa 8; entre estos la proteína FLIP que contiene DEDs ha surgido como un importante modulador de la activación de caspasa 8 y la apoptosis. FLIP comparte una extensa similitud en la secuencia de aminoácidos con las procaspasas 8 y 10, que contienen dos regiones N-terminal DED, seguido por un dominio pseudo caspasa que carece de los residuos críticos requeridos para la actividad proteasa, incluyendo la cisteína catalítica. En la mayoría de los casos FLIP se asocia con procaspasa 8, perturbando la señalización del receptor de muerte al competir con las procaspasas 8 y 10 por el enlace a FADD. Diversos virus contienen genes que codifican para homólogos de FLIP; estas proteínas virales típicamente contienen solamente los DEDs y actúan como supresores de la activación de caspasa 8 dependiente de la familia de receptores TNF. Presumiblemente esto podría permitir que las células infectadas con virus sobrevivan el ataque por el ligando de Fas (FasL) expresado por linfocitos T citotóxicos (CTLs) (2, 6, 13).

c. Dominios de muerte (DD)

Los DD son otro módulo de interacción perteneciente a la misma superfamilia, que incluye los CARDS y los DEDs. Los DD se unen a otros DD y están implicados comúnmente en la activación de NF- κ B o caspasas, y típicamente involucra interacciones con miembros de la familia TNF de receptores de citocinas. Los mamíferos engloban numerosas y diversas proteínas que contienen DD. En humanos se reconocen al menos 33 genes que codifican para DD; asimismo, de los cerca de 30 miembros conocidos de la familia de receptores TNF, ocho tienen DD en su cola citoplasmática. Los receptores de TNF poseen de una a cuatro copias de un dominio conservado rico en cisteína (CRD), típicamente precedido por un péptido líder hidrofóbico y seguido por un dominio transmembranal, típico de proteínas transmembranales tipo I. Varios de los receptores de la familia TNF contienen DD y son usados para la activación de caspasas como mecanismo de señalización e incluyen: TNFRI (CD120a), Fas (APO1. CD95), DR3 (APO2. Weasle), DR4 (TRAIL-RI), DR5 (TRAIL-R2) y DR6 (2, 5, 11).

Los receptores de la familia TNF: TNFRI, DR3 y DR6 se unen a una proteína adaptadora TRADD, a través de su DD. El DD de TRADD es capaz de enlazar ciertas proteínas que contienen DD, incluyendo la proteína adaptadora FADD. La proteína FADD contiene dos módulos de interacción: un DD y otro DED. Además, FADD es la única proteína que en humanos contiene ambos, por lo que funciona como un puente crítico entre estas dos familias de dominios. FADD une los receptores de muerte de la familia TNF a caspasas, usando su DD para unirse a TRADD o para interactuar directamente con el DD citosólico de los miembros de la familia TNFR de Fas y usando su DED para enlazar las caspasas que contienen DED. Por tanto, esta proteína juega un papel central en la unión de las caspasas a los receptores de muerte de la familia TNF (2). Adicionalmente, otra proteína conocida como RAIDD, es la única proteína que en humanos contiene DD y CARD. Esta proteína se une al DD de TRADD y al CARD de procaspasa 2 y puede

así servir como proteína adaptadora para enlazar procaspasa 2 hacia los receptores de la familia TNF (2, 6).

Los DD no solamente están involucrados en la activación de caspasas; algunos DD suprimen indirectamente la apoptosis a través de su efecto sobre factores de transcripción, que tienen un papel importante en la defensa del hospedador (receptores *Toll*, TLRs) y la supervivencia celular; ejemplo de ello es la proteína RIP, que se une a TRADD y activa quinasas que inducen la degradación de IK β , liberando a NF- κ B a fin de que pueda ser trasladada hacia el núcleo y funcione como un factor de transcripción de diferentes genes antiapoptóticos, incluyendo a FLIP, o bien a ciertos miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y Bcl-2 (5, 14).

d. Dominios BIR de las proteínas inhibidoras de la apoptosis

Un pliegue de unión a zinc, conocido como dominio BIR (*Baculovirus iap repeats*), está presente al menos en una copia en las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), una familia de supresores de la apoptosis conservadas evolutivamente. A diferencia de la superfamilia de dominios DO-DED-CARD, que funcionan con motivos de interacción homotípicos, los dominios BIR están involucrados en interacciones proteína-proteína, pero ellos interactúan principalmente con otro tipo de proteínas, mas prominentemente las caspasas y una diversa familia de agonistas IAP (5). En el genoma humano se han identificado ocho genes que codifican proteínas que contienen el dominio BIR, que incluyen: NAIP, C-IAP1, C-IAP2, XIAP, SURVIVIN, APOLLON, ML-IAP e ILP2. Diferentes IAPs se unen directamente y suprimen la actividad de las caspasas, así funcionan como antagonistas endógenos de las proteasas de muerte celular. En humanos XIAP, C-IAP1, C-IAP2 e ILP2, suprimen la actividad de ciertas caspasas. Algunas IAPs usan BIRs específicos para inhibir caspasas particulares. XIAP, por ejemplo, se une a caspasas efectoras 3 y 7, a través de su dominio BIR2, mientras que

la proteasa iniciadora, caspasa 9, lo hace a través de su dominio BIR3. Los IAPs son inhibidores selectivos de caspasas, aunque carecen de actividad contra muchos miembros de la familia de caspasas y sus proteasas de muerte celular. Así, la sobreexpresión de IAPs puede bloquear algunas vías de la apoptosis pero no otras (2, 4, 9). Otro ejemplo es la proteína *survivin*, que se une a la forma procaspasa 9 en combinación con otra proteína, la HBXIP (proteína de interacción con la proteína X del virus de la hepatitis B), y suprime la activación de esta caspasa en la vía mitocondrial conduciendo a apoptosis (2).

e. Dominios CIDE y endonucleasas apoptóticas

La fragmentación del ADN es frecuentemente considerada un sello de la apoptosis, reflejando la activación de endonucleasas que degradan el ADN entre los nucleosomas. Un dominio es encontrado en las endonucleasas apoptóticas CAD (desoxiribonucleasa activada por caspasa o factor de fragmentación del ADN, DFF40) y sus homólogos conocidos como CIDE o dominio CIDE-N. La endonucleasa CAD es liberada después de la degradación de la chaperona ICAD por las caspasas, vinculándose así la activación de endonucleasas hacia la activación de las proteasas de muerte celular. Cinco miembros de la familia CIDE son evidentes en los transcriptomas humanos (2). Adicionalmente a la familia de endonucleasas CIDE, se ha identificado que dos proteínas que están secuestradas en la mitocondria pueden contribuir directa o indirectamente a la digestión del ADN: EndoG, una endonucleasa evolutivamente conservada y AIF, una flavoproteína que promueve el rompimiento a gran escala del ADN genómico durante la apoptosis (2, 3).

Familia de proteínas Bcl-2

La familia de proteínas Bcl-2 son reguladores críticos de la apoptosis, dentro de sus funciones se incluyen los pasos de muerte celular dependientes de la mitocondria (3). Las proteínas de la familia Bcl-2 derivan su nombre del linfoma de células

B2. Los miembros de esta familia usualmente son divididos en grupos diferentes basados en la presencia o ausencia de las secuencias o dominios de homología Bcl-2. En la Tabla 1 se resumen los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 (5, 6).

Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bak y otros miembros diversos de la familia Bcl-2 tienen un tramo de aminoácidos hidrofóbicos cerca de su C-terminal que las ancla en membranas internas celulares, predominantemente en la membrana externa de la mitocondria y en el retículo endoplasmático. Por el contrario, otros miembros

Tabla 1. Clasificación de los miembros de la familia Bcl

Grupo	Dominios	Miembros
(i)	Familia con multi-dominio, los cuales contienen BHI, BH2, BH3 y BH4	Bcl-2, BclX, Mcl-1, Bcl-W, Bfl-1, Bcl-B, Diva; Bax, Bak, Bok y Bcl-Rambo
(ii)	Proteínas con dominios BH2 y BH3	Bcl-G _L y Bfk
(iii)	Proteínas que contienen el dominio BH3- <i>only</i>	Bad, Bid, Bim, Spike, Bmf, Bik, Noxa, Puma, Hrk y Spike. (iv) proteínas con dominios tipo BH3, Nip3; Nix; Map1 y pl93
(v)	Proteína que contiene un dominio BH2 putativo	Bcl2L12

de la familia de proteínas Bcl-2 tales como Bid, Bim y Bad carecen de estos dominios de anclaje a la membrana, pero son trasladadas a la mitocondria en respuesta a estímulos específicos (2, 3, 5). Estas proteínas de la familia Bcl-2 se piensa que regulan directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo o inhibiendo el flujo de proteínas apoptogénicas de estos organelos. Estas proteínas tipo poro α -hélice incluyen proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1, Bcl-W y posiblemente Bcl-B) y proteínas apoptóticas (Bax, Bak, Bok y Bid). Bax y Bak cuando se activan, oligomerizan en la membrana mitocondrial, dando como resultado la liberación de citocromo c y otras proteínas de estos organelos, que contribuyen a la activación

de caspasas y otros mecanismos de muerte celular. Por el contrario, las proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL, bloquean la oligomerización de Bax y Bak, preservando la viabilidad celular. Las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 no se insertan solamente en la membrana mitocondrial, también lo hacen en la membrana del retículo endoplasmático (RE). La sobreexpresión de Bcl-2 parece causar una perturbación del Ca²⁺ libre secuestrado en el retículo y reducir la cantidad de Ca²⁺ liberado del retículo en respuesta a algún tipo de estímulo de muerte celular y drogas (2, 7).

El dominio BH3 media la dimerización entre las proteínas de la familia Bcl-2 y se inserta sobre una grieta hidrofóbica de la superficie de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL. En mamíferos, los miembros de la familia que presentan BH3-*only* son uniformemente proapoptóticos. La actividad inductora de muerte celular de la mayoría de las proteínas con dominio BH3 depende de su habilidad para dimerizar con miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y así funcionan como inhibidores transdominantes de proteínas inhibidoras tales como Bcl-2 y Bcl-XL. Alternativamente, ciertas proteínas BH3-*only*, en particular Bid y Bim, pueden unirse a proteínas multidominio proapoptóticas (tales como Bax y Bak) y funcionar como agonistas de muerte o dimerizar con miembros de la familia antiapoptóticos (tales como Bcl-2 o Bcl-XL) y funcionar como antagonistas de la apoptosis. La unión de Bid a Bax o Bak promueve su inserción en la membrana y su oligomerización, resultando en un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y liberación de proteínas apoptogénicas en el citosol (5).

Las isoformas de Bim que contienen BH3-*only* se asocian con los microtúbulos a través de la unión directa a la cadena ligera de dineína (CLC). La interrupción de estas interacciones proteínicas libera las isoformas de Bim asociadas con los microtúbulos, permitiendo su dimerización a través de sus dominios BH3 con proteínas de la familia Bcl-2 antiapoptóticas en la superficie de la mitocondria. Las proteínas Bad con un BH3-*only* se traslada entre el citosol y la mitocondria,

dependiendo de si esta fosforilada. Diferentes proteínas quinasas, incluyendo Akt (también llamada proteínas quinasa B, PKB), PKA (proteína quinasa dependiente de AMP cíclico), Raf1, Rsk1 y Pak1 (quinasa I activada por p21), se han reportado como fosforiladoras de Bad, inactivando así a la proteínas, de modo que no puedan dimerizarse y antagonizar con Bcl-2 y Bcl-X. La expresión de algunas proteínas de la familia Bcl-2 proapoptóticas es controlada a nivel del empalme (*splicing*) del ARN mensajero. Señales específicas cambian el patrón de empalme, para producir versiones de las proteínas con actividad proapoptóticas. Las perturbaciones en la expresión y las modificaciones postransduccionales de las proteínas de la familia Bcl-2 han sido asociadas con muchas patologías (5).

Caspasas

Estas proteasas están presentes como zimógenos inactivos en todas las células animales. Pero pueden ser disparadas para asumir un estado activo, lo cual generalmente involucra su procesamiento proteolítico, en un residuo conservado de ácido aspártico (Asp). Después de la activación, los miembros de esta familia de cisteína proteasas intracelulares, degradan sus sustratos en residuos de ácido aspártico, lo que le da su pseudónimo de “caspasas” (cisteinil-**asp**artato proteasas). Basados en la observación que (i) las caspasas rompen sus sustratos en el residuo Asp y que (ii) las caspasas son activadas por el procesamiento proteolítico en el residuo Asp, es claro que las proteasas colaboran en una cascada proteolítica que conlleva a su activación (2, 8, 9).

Hasta ahora se ha determinado que el genoma humano codifica para 12 caspasas. Las caspasas pueden ser agrupadas de acuerdo a su especificidad o a su similitud en la secuencia de aminoácidos; sin embargo, desde un punto de vista funcional las caspasas pueden ser vistas como caspasas “iniciadoras” que degradan proformas inactivas de las caspasas efectoras, activándolas a su vez, o bien como caspasas “efectoras” que degradan otros sustratos proteicos dentro de la células para disparar los procesos apoptóticos (1,

8, 9, 13). La activación de las caspasas no resulta en una degradación masiva de las proteínas celulares, más bien ellas rompen selectivamente un grupo estricto de proteínas diana, usualmente en una o pocas posiciones de la secuencia primaria (siempre después de un residuo aspartato). La degradación proteolítica por las caspasas puede conducir a diferentes resultados dependiendo de la naturaleza del sustrato y la posición exacta del sitio de ruptura en la secuencia primaria. La forma más sencilla y probablemente la más frecuente, resulta en la pérdida o ganancia de actividad biológica (5). Los principales sustratos de las caspasas efectoras incluyen: proteínas quinasas (en las cuales las caspasas separan el dominio regulador autorepresivo, del dominio catalítico) y otras proteínas transductoras de señales, tales como proteínas de la matriz nuclear y del citoesqueleto, enzimas modificadoras de la cromatina (por ejemplo, la polimerasa poli ADP ribosa, PARr), proteínas reparadoras del ADN y subunidades inhibitoras de ciertas endonucleasas, que son en parte responsables de la digestión del genoma. Estos eventos de degradación proteolítica son irreversibles y conducen a la muerte de la célula (6, 14).

Las caspasas son requeridas para inducir la apoptosis, así como para el procesamiento proteolítico de ciertas citocinas proinflamatorias. El pliegue de estas cisteína proteasa que constituye el dominio caspasa, esta típicamente compuesto de subunidades catalíticas largas y pequeñas de aproximadamente 20 y 10 kDa cada una. Las subunidades son generadas luego de una degradación catalítica de la proproteína precursora, y su ensamble posterior en un heterotetrámero, con dos sitios activos formados por la unión de las subunidades largas y pequeñas (14, 15).

Dos caspasas cuyo dominio precursor (pre-dominio) contiene un par de DEDs en tándem se encuentran en humanos: caspasa 8 y 10. Ambas son activadas típicamente en el contexto de la traducción de señales desencadenadas por la familia de citocinas TNF (2). Cinco caspasas humanas contienen pre-dominios N-terminal con un CARD (dominio de reclutamiento de caspasa).

Dos de estas, caspasa 2 y 9, están implicadas en la regulación de la apoptosis. La caspasa 2 está putativamente involucrada en el estrés en el aparato de Golgi y la activación de caspasas 2 y 9 poseen funciones en la vinculación de la mitocondria con la red de proteasas caspasas. Sin embargo, tres de estas caspasas que tienen dominios CARD son mejor conocidas por sus roles en la degradación y activación de citocinas proinflamatorias (pro-IL-1 y pro-IL-18), que por su papel en la apoptosis. En humanos pertenecen a este grupo las caspasas 1, 4 y 5 (2).

a. Activación de las caspasas iniciadoras

El entendimiento de como las caspasas iniciadoras son activadas está lejos de ser completado. Las caspasas iniciadoras no existen constitutivamente como homodímeros del zimógeno o la enzima activada. La caspasa 9 antes y después del procesamiento proteolítico, está presente predominantemente como un monómero. Por otro lado, se ha reportado que la caspasa 8 se encuentra en un equilibrio entre monómeros y dímeros. Estas diferencias físicas determinan su variación funcional. La activación de dos de las principales caspasas iniciadoras, tales como caspasa 8 y 9, es llevada a cabo a través de la formación de complejos multiproteicos denominado DISC para caspasa 8, y apoptosoma para la caspasa 9 (9, 13).

a.1. Complejo de señales inductoras de muerte (DISC)

La vía extrínseca de muerte celular esta mediada por los receptores transmembranales tipo I de la superfamilia de receptores del TNF. El subgrupo de receptores TNF que contienen dominios de muerte entre la región intracelular, han sido llamados “receptores de muerte” (DRs). Los DRs acoplan ligandos triméricos, los cuales organizan los receptores en trímeros y estimulan el ensamble de un complejo intracelular conteniendo la proteína DD asociada a FAS, FADD y la procaspasa 8 iniciadora (Flice, MACH-I). El ensamble del receptor activado, FADD, y la procaspasa 8 es

comúnmente conocido como DISC. FADD es el núcleo de este ensamble y es responsable de detectar los estímulos de muerte hacia el receptor y reclutar la procaspasa 8 en el DISC naciente. El C-terminal de DED y DD adopta una estructura de seis α -hélices, que caracteriza a la familia de “motivos de muerte”. El DD de FADD es responsable de su unión al receptor, mientras que DED contiene el sitio responsable de la unión de procaspasa 8 y/o 10 (16).

Aunque DISC puede comprender factores adicionales y proteínas reguladoras (tales como FLIPs), contiene tres componentes esenciales e indispensables: un receptor de muerte como Fas/CD95; FADD y caspasa 8 o 10. Los aminoácidos superficiales en FADD que son requeridos para la unión del DD de Fas/CD95 mapean mayormente en la superficie contigua del DD de FADD. Diversos aminoácidos en el lado opuesto de esta superficie así como algunos en DED de FADD, también contribuyen a la interacción del receptor de muerte. La región de interacción de FADD con procaspasa 8 también ha sido identificada. Se sabe que FADD se asocia por sí misma, aunque se han reportado regiones que contrarrestan esta asociación. Este complejo de interacciones intermoleculares ha hecho que el modelado de DISC sea una tarea difícil.

La proteína inhibidora de FLICE (c-FLIP) es una proteína que contiene DED y que actúa como el mayor regulador de la apoptosis que puede cambiar las señales de vida o muerte. Aunque más de 10 isoformas de mensajeros de ARN de FLIP han sido descritas, solamente dos de estas parecen ser significativas a nivel proteínico, específicamente: la c-FLIP-larga (cFLIP_L) de 55 kDa y 480 aminoácidos, y la cFLIP-corta (c-FLIPs) con 28 kDa y 221 aminoácidos. Las dos isoformas poseen un dominio DED en la región N-terminal, y son muy similares a los DED de procaspasa 8. La c-FLIP posee adicionalmente en su extremo C-terminal un dominio catalítico homólogo al de caspasa 8, pero desprovisto de actividad enzimática. Ambas proteínas pueden ser reclutadas en el DISC, uniéndose al complejo Fas-FADD e inhibiendo el reclutamiento de caspasa 8 hacia DISC, previniendo así la inducción de

apoptosis mediada por los receptores de muerte (12).

a.2. Ensamble y estructura del apoptosoma

La palabra apoptosoma fue inicialmente usada para describir la maquinaria celular que es responsable de la activación de procaspasa 9, una caspasa iniciadora de la vía intrínseca de la apoptosis. El apoptosoma comprende siete moléculas de Apaf-1 y la proteasa caspasa 9. Las Apaf-1 se encuentran arregladas simétricamente en una estructura parecida a una rueda. El ensamble del apoptosoma requiere citocromo c y nucleótido. La procaspasa 9 es reclutada y activada por el apoptosoma, la cual permanece asociada con el apoptosoma y exhibe una actividad catalítica que es tres órdenes de magnitud más alta que la actividad de la caspasa 9 aislada, sugiriendo el concepto de holoenzima. Apaf-1 contiene un CARD en la región N-terminal, la cual es responsable del reclutamiento de la procaspasa 9, un dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) y 13 WD40 repetidas, las cuales se piensa que interactúan con citocromo c. La estructura de Apaf-1 conforma así una típica ATPasa de la familia AAA+, la cual pudiera no poseer una homología de secuencia significativa, pero exhibe el mismo plegamiento y contiene las mismas secuencias consenso (17, 18).

La complejidad cinética y la regulación inicial del ensamblado del apoptosoma, se han comenzado a apreciar. En efecto, el dATP o el ATP son requeridos para la formación del apoptosoma. La unión del nucleótido parece sufrir un cambio dinámico durante el ensamble del apoptosoma. La unión de citocromo c al Apaf-1 monomérico induce la hidrólisis de dATP hacia dADP, con la consecuente liberación de dATP. Se piensa que la hidrólisis de dATP y el subsecuente reemplazamiento de dADP por dATP, son dos pasos requeridos en el ensamblaje del apoptosoma, que pudieran ser regulados por otros factores celulares, tales como factores intercambiadores de nucleótidos y/o proteínas activadoras de ATPasa (18, 19).

En ausencia de una señal apoptótica, Apaf-1 existe en una forma bloqueada autoinhibida. Luego

de una señal apoptótica, la unión de citocromo c a Apaf-1 libera el bloqueo conduciendo a una forma semiabierta, aún autoinhibida. Seguidamente ocurre la hidrólisis del nucleótido unido a dADP. El intercambio de nucleótidos conduce a la oligomerización y formación del apoptosoma. Habiéndose conformado el anillo de siete miembros como una plataforma de reclutamiento, el apoptosoma ahora activa a la procaspasa 9. Al igual que otras caspasas, la caspasa 9 es un dímero en su forma activa. Sin embargo, a diferencia de las caspasas efectoras, el zimógeno de caspasa 9 es primariamente un monómero a concentración fisiológica, una propiedad que comparte con otras caspasas iniciadoras. Cuando se ha formado el apoptosoma y no se ha cubierto el sitio de unión de caspasa 9 sobre Apaf-1 (CARD), se puede asociar el zimógeno con el complejo activador (10). En solución, la procaspasa 9 es un monómero con un sitio catalítico inactivo. En un primer paso de activación, la procaspasa 9 se une al eje central del apoptosoma a través de interacciones CARD-CARD. En este punto, el monómero de procaspasa 9 unida, es móvil e inactivo. Una segunda molécula de procaspasa 9 en solución puede asociarse con la procaspasa 9 unida para formar un dímero que contiene un sitio catalítico activo. La degradación proteolítica genera entonces el dímero de caspasa 9 maduro (20).

Inhibidores de la apoptosis (IAPs).

La familia de proteínas conservadas IAP pueden potencialmente inhibir la actividad enzimática de las caspasas activas y remover permanentemente las caspasas a través de la vía proteosomal mediada por ubiquitinación (3). Existen varias proteínas IAP en mamíferos, XIAP (IAP ligada a X), c-IAP1, cIAP2, ML-IAP (IAP de melanoma/livín), ILP2 (proteína 2 tipo IAP), NAIP (proteína inhibidora de apoptosis neuronal). En mamíferos, las caspasas 3, 7 y 9 son objeto de inhibición por IAPs. Aunque caspasa 9 se une a diferentes IAPs, es primariamente inhibida por XIAP. Caspasa 3 y 7 son inhibidas por XIAP y en menor proporción por c-IAP1, c-IAP2 y NAIP (7, 15). La principal característica de las IAPs es el dominio repetido

IAP baculoviral (BIR) de dedos de zinc de aproximadamente 80 aminoácidos. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 contienen tres dominios BIR con diferentes funciones (2, 15). El mecanismo molecular de inhibición mediada por IAP de las caspasas efectoras es llevado a cabo a través de un péptido enlazador corto que precede al dominio BIR2 de XIAP, y que forma interacciones idénticas con caspasa 3 o 7. Comparado con los péptidos inhibidores covalentes, el péptido enlazador de XIAP ocupa el sitio activo de caspasa 3 y 7 de una orientación reversa, que bloquea la entrada al sustrato (9, 15).

La inhibición mediada por IAP de caspasas puede además ser antagonizada por una familia de proteínas que contienen un motivo tetrapéptido de unión a IAP. En mamíferos se ha encontrado miembros de esta familia en las proteínas mitocondriales SMAC/DIABLO (segundo inhibidor derivado de la mitocondria/homólogo murino). Estas proteínas contienen un tetrapéptido N-terminal Ala-Val-Pro-Ile, el cual se une a la hendidura de superficie sobre el dominio BIR3 de XIAP. Durante la apoptosis, SMAC/DIABLO es liberado del espacio intermembranal de la mitocondria al citosol, donde interactúa con diferentes IAPs y remueve la inhibición mediada por IAP de caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Otra proteína mitocondrial, HTRA2/OMI, también contiene motivos tetrapéptido repetidos en su N-terminal y puede antagonizar la inhibición mediada por XIAP de caspasa 9 (3, 7, 15).

Mitocondria: el foro de la muerte

La mitocondria juega un papel importante en la muerte celular; además de proporcionar la energía de las células, contiene un arsenal de proteínas con funciones muy relevantes, desde la fosforilación de la ADP hasta la regulación del metabolismo celular. La mitocondria secuestra un coctel potencial de proteínas proapoptóticas, entre las que destaca el citocromo c, el más humilde conductor de electrones. Diferentes estudios en el pasado han demostrado que el citocromo c está lejos de ser inocuo; además de la

fosforilación oxidativa mitocondrial, la proteína es un componente requerido para la activación de caspasa 8 vía el apoptosoma, tal y como se expuso previamente (7).

No se conoce exactamente como el citocromo c cruza la membrana mitocondrial, pero es claro que miembros de la familia Bcl-2 están involucrados en la regulación del proceso. Por ejemplo, la adición de miembros de la familia Bcl-2 proapoptóticos es suficiente para inducir la liberación de citocromo c, mientras que la sobreexpresión de miembros de la familia Bcl-2 pueden prevenirlo (3, 7). Una de las mejores hipótesis que han surgido para tratar de explicar este fenómeno es la siguiente: los miembros de la familia Bcl-2 forman canales que facilitan el transporte de estas proteínas; basados en la similitud estructural de Bcl-XL a la subunidad formadora de poros de la toxina diftérica, se ha sugerido que las proteínas Bcl-2 podrían actuar en la membrana mitocondrial externa, por inserción, seguido de un cambio conformacional dentro de la membrana mitocondrial externa, donde podrían formar canales o incluso largos agujeros. Los miembros de la familia Bcl-2 necesitan poder insertarse dentro de la bicapa lipídica sintética, oligomerizar y formar canales con una conductancia discreta, aunque se desconoce si tienen el tamaño necesario para el paso de las proteínas. Se cree que los miembros de Bcl-2 interactúan con otras proteínas para formar canales. Una posibilidad es que los miembros proapoptóticos recluten otras proteínas de la membrana mitocondrial externa formando un gran canal. Un candidato atractivo de tales proteínas es el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), ya que diversos miembros pueden unirse a esta y regular su actividad como canal (5, 21). También es posible que los miembros de Bcl-2 controlen la homeostasis de la mitocondria. En este modelo las señales apoptóticas actuarían alterando la fisiología de la mitocondria (por ejemplo, por intercambio iónico o fosforilación oxidativa), de tal modo que la organela se hinche resultando en la ruptura física de la membrana externa y liberación de las proteínas intermembranales hacia el citosol (3, 5). El citocromo c es solamente uno de los

habitantes promueve de la mitocondria, también están presentes en la mitocondria y se libera luego de la inducción de la apoptosis: AIF (una flavoproteína muy potente pero con una actividad apoptótica misteriosa y relativa), SMAC/DIABLO y diferentes procaspasas, incluyendo procaspasa 2, 3 y 9. La liberación de múltiples moléculas que promueven la muerte podría ser necesaria para asegurar una muerte tangible y rápida (5).

La actividad de las caspasas es suprimida por inhibidores de la apoptosis (IAPS) y para lograr la apoptosis estas proteínas deben ser suprimidas. Esta función es mediada por SMAC/DIABLO, una proteína que se encuentra en el espacio intermembranal mitocondrial, y cuya liberación es desencadenada por el estímulo apoptótico. Otra proteína que reside en el espacio intermembranal de las células normales, es la serina proteasa HTRA2/DMI, que neutraliza las IAPS luego de su liberación hacia el citosol, permitiendo así la actividad de las caspasas. Adicionalmente, HTRA2/DMI desencadena una inusual forma de apoptosis sin la formación de cuerpos apoptóticos que parece ser mediada por serina proteasas y es independiente del apoptosoma (7, 21).

Mientras todas las proteínas antes descritas forman o promueven la elaboración del apoptosoma, la mitocondria, luego de la inducción de la apoptosis también libera algunas proteínas que actúan directamente en el núcleo para inducir la degradación del ADN y el corte del ADN nucleosomal. Estas proteínas incluyen el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G. La liberación de AIF del espacio intermembranal mitocondrial es iniciado por la degradación de la región N-terminal de AIF, que contiene la secuencia de localización en la mitocondria. El traslado de AIF al núcleo parece ser mediada por la región C-terminal de la proteína, que contiene dos elementos de localización nuclear putativos. AIF induce la fragmentación del ADN de alto peso molecular y la condensación de la cromatina. Sin embargo el AIF citosólico también desencadena la despolarización de la membrana mitocondrial o cambios en la membrana celular, como por ejemplo el traslado de fosfatidilserina. Es importante mencionar que los efectos de AIF

son independientes de caspasas, Bcl-2 o APAF-1 (7, 22).

El debilitamiento de las estructuras claves

Una de las consecuencias de la activación del proceso de muerte celular consiste en la fragmentación y debilitamiento de las principales estructuras celulares, las cuales se describen a continuación:

a. Componentes del citoesqueleto

Luego de su activación, las caspasas degradan a la mayoría de los constituyentes del citoesqueleto de la célula; los sustratos incluyen componentes de los microfilamentos de actina, tales como la actina misma y sus proteínas asociadas, incluyendo la miosina, espectrinas, α -actinina, gelsolina y filamina. Asimismo, diferentes proteínas microtubulares son también sustrato de las caspasas, incluyendo la tubulina y las proteínas asociadas a los microtúbulos, tales como Tau, cadena intermediaria de dineina citoplasmática y p150^{Glued}. Adicionalmente, las proteínas de filamentos intermediarios tales como vimentina, queratinas y laminina nuclear son también dianas. La proteólisis de estos constituyentes del citoesqueleto probablemente contribuye al redondeamiento y retracción de la célula, que es observado en los estados tempranos de la apoptosis. Otra consecuencia del debilitamiento del citoesqueleto es el ampollado dinámico de la membrana (otra característica distintiva de la apoptosis) en el cual el citoplasma celular fluye contra áreas no soportadas de la membrana plasmática. En realidad, la disolución de la red de actina típicamente elimina estas características de la apoptosis; parece que el ampollado requiere que al menos algunos filamentos de actina estén intactos. Un sustrato de caspasas que está fuertemente implicado es esta fase de la apoptosis es el efector Rho ROCK1, un regulador de la dinámica del citoesqueleto de actina. La eliminación de la región C-terminal de ROCK1 a través del corte por caspasa resulta en la activación constitutiva de esta quinasa, conduciendo a la

fosforilación de la cadena ligera de miosina y la contracción de las ampollas de actina (6).

a.1. Envoltura nuclear y fragmentación nuclear

Aunque la fragmentación nuclear es la principal característica de la apoptosis, no es claro porque el núcleo se fragmenta y se dispersa a través de los cuerpos apoptóticos durante este modo de muerte celular. Esto puede contribuir a remover eficientemente la cromatina potencialmente inmunogénica. La fragmentación nuclear resulta de la desintegración de la lámina nuclear y del colapso de la envoltura nuclear. El primero de estos eventos involucra la proteólisis de las lamininas A, B, y C por las caspasas. El citoesqueleto de actina tiene también un rol en la fragmentación nuclear. La lámina nuclear está rodeada por una malla de actina, la cual está asociada con la envoltura nuclear. La inhibición tanto de ROCK1, la quinasa de cadena ligera de miosina, o la interrupción de los filamentos de actina evita la fragmentación nuclear asociada con la apoptosis. La degradación de la lámina no es suficiente para causar fragmentación nuclear en ausencia de la fuerza contráctil del citoesqueleto de actina, pero podría debilitar la lamina nuclear, permitiendo que la envoltura nuclear se desgarre, luego de la fragmentación del núcleo. El citoesqueleto basado en microtúbulos ha sido implicado en dispersar los fragmentos nucleares hacia las ampollas de la membrana plasmática (6).

a.2. Separación de la matriz extracelular

Las células en los estados tempranos de la apoptosis típicamente se retraen de las células vecinas y pierden los contactos con la matriz extracelular. Este proceso de separación involucra el desmantelamiento de la célula dependiente de caspasas de los sitios de adhesión focal, o bien de los complejos de adhesión célula-célula y probablemente facilita la remoción de las células apoptóticas por los fagocitos. Diferentes componentes de los sitios de adhesión focal han sido reportados como sustratos de las caspasas.

Incluyendo quinastas de adhesión focal, p130^{cas} y tensina. De manera similar, también se ha observado que diferentes componentes de las uniones adherentes célula-célula son degradados por las caspasas, incluyendo β y γ -cateninas. Los desmosomas, un segundo tipo de sitio de adhesión célula-célula, son también desamblados durante la apoptosis a través de proteólisis dependiente de caspasas de diferentes proteínas asociadas con los desmosomas (6, 20).

b. Apagado de los sistemas que soportan la vida

Las caspasas funcionan como interruptores (*switches*) moleculares para la activación de programas de muerte celular. Estas proteasas actúan sobre muchas proteínas involucradas en las funciones de digestión interna esenciales en la célula; estas proteínas diana funcionan en: transcripción (por ejemplo, el factor nuclear de células T activadas. NF- κ B, p50, p65 y la ribonucleoproteína), traducción (por ejemplo, los factores de inicio de la traducción de eucariotas eIF2a, eIF3, eIF4 y la subunidad β del complejo asociado al polipéptido naciente β NAC), e incluso degradación del ARN ribosomal. Además, el ADN genómico es extensivamente hidrolizado y la red Golgi, RE y mitocondria son fragmentados (6, 20).

b.1. Condensación y degradación del ADN

El patrón de fragmentación del ADN es el resultado de la degradación de la cromatina, mediado por endonucleasas, en los sitios internucleosomales y se acompaña típicamente de la condensación de la cromatina. Este acto ciertamente se opone a cualquier posibilidad futura de división celular, pero su propósito real es hacer que la cromatina sea más manejable para su posterior eliminación por las células fagocíticas. Una falla en la degradación del ADN de las células apoptóticas resulta en la activación del sistema inmune innato, conduciendo a un desarrollo tímico defectivo. Esto sugiere que la degradación del ADN asociado con la apoptosis ayuda a

prevenir la acumulación de ADN que es liberado al espacio extracelular, y que podría provocar una respuesta autoinmune. En realidad, anticuerpos anti-ADN son recurrentemente identificados en diversas condiciones autoinmunes, tales como el lupus eritematoso sistémico. Las células que son deficientes en endonucleasas activadas por caspasas (CAD), exhiben durante la apoptosis una menor degradación del ADN celular autónomo y una menor condensación de la cromatina, lo cual implica un importante rol para estas enzimas. En las células sanas, CAD se encuentra formando un complejo con su inhibidor, ICAD (inhibidor de CAD), el cual reprime la actividad de esta endonucleasa. Sin embargo, durante la apoptosis, ICAD resulta degradado por caspasas, lo cual resulta en la liberación de CAD y fragmentación de la cromatina. Alguna actividad endonucleasa residual permanece en ausencia de CAD, y esto promueve la hidrólisis del ADN en fragmentos de alto peso molecular, un evento que precede la hidrólisis del ADN de bajo peso molecular e indica la existencia de otras nucleasas que son activadas tempranamente en el proceso (6).

La condensación de la cromatina en estados tempranos ocurre normalmente en células deficientes de CAD, sugiriendo que CAD no está relacionada con la condensación inicial de la cromatina que es también característica de la apoptosis. La cromatina de los eucariotas está compuesta de proteínas histonas envueltas alrededor del ADN para formar nucleosomas. Investigaciones recientes han sugerido que la fosforilación de la histona 2B (H2B) se correlaciona estrechamente con la condensación de la cromatina apoptótica. La quinasa responsable de esta modificación es la serina-treonina quinasa Mst1, degradada y activada por caspasa 3 durante la apoptosis, permitiendo que esta enzima permanezca en el compartimiento nuclear (6).

b.2. Fragmentación del Golgi y del RE

Otro evento que es característico de la apoptosis es la fragmentación celular de las organelas, tales como el aparato de Golgi y el RE, y el subsiguiente empacado de estas organelas en los

cuerpos apoptóticos. El mecanismo por el cual el aparato de Golgi es fragmentado parece llevarse a cabo por medio de la degradación, mediada por la caspasa 3, de las proteínas de reensamblado y apilamiento del Golgi de 65 kDa (GRASP65), ya que la introducción de una forma de esta proteína resistente a proteólisis retrasa la ruptura del Golgi. En estados tardíos del programa apoptótico, el RE también resulta remodelado extensivamente y redistribuido a las ampollas apoptóticas para formar una membrana alrededor de la cromatina encerrada, un proceso que parece requerir de la actina y del citoesqueleto de los microtúbulos. Aunque no se tienen evidencias de esto, se ha especulado que el bloqueo del tráfico del RE al Golgi podría contribuir en una o más de las alteraciones de la membrana que ocurre en las células apoptóticas debido a la alteración de la composición de carbohidratos de la membrana plasmática (6).

b.3. Fragmentación mitocondrial

La red mitocondrial es extensivamente fragmentada durante la apoptosis, aunque en éste caso las caspasas no son las principales ejecutoras. Bax (proteína X asociada a Bcl-2) y/o Bak (asesina/antagonista de Bcl- 2) son activadas tempranamente en la apoptosis a través de la acción de una o más proteínas *BH3-only*, que resulta en la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria y la liberación de las proteínas del espacio intermembranal. La fragmentación mitocondrial asociada con la apoptosis parece ser causada primariamente por los cambios conformacionales que ocurren en Bax y Bak durante su ensamblaje, con la formación de poros o canales en la mitocondria. Aunque las caspasas no contribuyen con la fragmentación nuclear asociada a la apoptosis, si participan en la subsecuente desregulación de la función durante éste proceso. Las caspasas median la proteólisis de la subunidad p75 del complejo I de la cadena transportadora de electrones, que es requerida de modo parcial para la hinchazón y los cambios morfológicos destructivos que sufren las mitocondrias durante la apoptosis. Adicionalmente, la pérdida del

potencial transmembranal mitocondrial asociado con la apoptosis, la disminución de los niveles de ATP celular y la producción de especies reactivas del oxígeno, también han sido vinculadas a la proteólisis de p75 (6).

Limpieza del detritus celular: eliminación de la cédula apoptótica

El evento terminal de la fase de demolición, es decir, el consumo de la célula muerta por los fagocitos, es quizá el aspecto más importante de todo el proceso. Esto permite la eliminación de las células con su membrana plasmática intacta y evita el daño potencial de la liberación de los constituyentes celulares sobre el medio que los rodea. La generación de sitios de unión para los fagocitos y la liberación de moléculas quimioatrayentes representa el acto final de la célula agonizante. Se han propuesto diversas moléculas que actúan como receptores que específicamente detectan señales de engullimiento de las células apoptóticas por macrófagos, células dendríticas y otras células con capacidad fagocítica. En células sanas, la fosfatidil serina (PS) se encuentra confinada en el interior de la célula plasmática; sin embargo, es traslocada a la parte externa como consecuencia de un estímulo proapoptótico, donde induce fagocitosis. Se han implicado varios receptores fagocíticos para la eliminación de las células apoptóticas. En muchos casos, estos son proteínas que enlazan PS, como la trombospondina (TSP), y la glicoproteína que contiene la denominada grasa láctea globular del factor de crecimiento epidérmico-factor 8 (MFG-E8), o la molécula de adhesión CD36. La exposición de PS puede ser también promovida por la opsonización de las células apoptóticas por factores del complemento, como iC3b, y a su vez este promueve la absorción de la célula apoptótica por integrinas (receptores complementarios de CR3 y CR4). La calreticulina que es expuesta sobre las células agonizantes puede ser unida por CD91, mientras los sitios como la lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL) pueden ser reconocidos por otros receptores *scavenger*, incluyendo el receptor *scavenger* A (SR-A) y la

lipoproteína-1 de baja densidad oxidada (LOX1). Futuros ligandos de las células apoptóticas pueden incluir anexina-1 y la molécula-3 de adhesión intercelular (ICAM3), y los receptores sobre fagocitos que no poseen ligandos conocidos, dentro de los que destacan las lectinas y miembros de la familia de integrinas (6).

Correspondencia: Lisbeth Berrueta, MD, MSc, PhD. Instituto de Inmunología Clínica Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Avenida 16 de Septiembre. Edificio Louis Pasteur. Anexo IAHULA, PO BOX 566. Mérida 5101. Venezuela, e-mail: lberruet@ula.ve.

Referencias

1. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 2009; **138**:838-54.
2. Reed JC, Doctor KS, Godzik A. The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci STKE* 2004; **2004**:1-29.
3. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; **116**:205-19.
4. Conradt B, Xue D. Programmed cell death. *WormBook* 2005; **6**:1-13.
5. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; **407**:770-6.
6. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**:231-41.
7. Gulbins E, Dreschers S, Bock J. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp Physiol* 2003; **88**:85-90.
8. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002; **9**:459-70.
9. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**:725-31.
10. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**:405-13.
11. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; **407**:789-95.
12. Mollinedo F, Gajate C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2006; **9**:51-73.
13. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; **7**:313-9.
14. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**:378-90.
15. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**:897-907.
16. Carrington PE, Sandu C, Wei Y, Hill JM, Morisawa G, Huang T, Gavathiotis E, Wei Y, Werner MH. The structure

of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* 2006; **22**:599-610.

17. Adrain C, Brumatti G, Martin SJ. Apoptosomes: protease activation platforms to die from. *Trends Biochem Sci* 2006; **31**:243-7.

18. Shi Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* 2006; **18**:677-84.

19. Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure* 2002; **10**:285-8.

20. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome:

implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002; **9**:423-32.

21. Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 2008; **22**:1577-90.

22. Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004; **23**:2785-96.