

# Apoptosis y Patología Autoinmune

---

**Karin Kalbhenn T.**

Becada Inmunología Clínica  
Hospital Clínico Universidad de Chile

## Introducción

La muerte celular programada o apoptosis es un tema de la inmunología del que prácticamente no se hablaba hasta el año 1992, a pesar de existir publicaciones desde la década de los 60. Desde ese año y en forma paulatina este tema ha ido cobrando relevancia, hecho evidenciado por el creciente número de trabajos científicos sobre la materia, los que han aumentado en forma exponencial en estos últimos años (1). Este gran interés se debe a la importancia que se le atribuye en la mantención de la homeostasis de diferentes organismos, y a la clara asociación entre alteraciones de este proceso y algunas patologías en humanos. Aún queda mucho por comprender de los mecanismos íntimos y de las señales moleculares involucradas en la apoptosis. Existen grandes interrogantes por dilucidar con respecto a su importancia en clínica, y seguramente en terapéutica.

## Fundamentos y definición

Apoptosis es un término a menudo usado como sinónimo de "muerte celular programada". Es un proceso fisiológico, activo y genéticamente controlado, que se ha mantenido durante la evolución (2). Este proceso de autodestrucción o "suicidio celular" tiene un rol crucial durante la embriogénesis, remoción de células no deseadas o dañadas, desarrollo y defensa inmune, protección antitumoral, participando en la homeostasis del organismo, entre otras cosas (3). Compuesto por activadores, inhibidores y efectores, se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y eventos bioquímicos bien definidos, que pueden completarse en un lapso de 30 a 60 minutos desde su inicio.

Estos eventos son iniciados por una familia de cisteína proteasas (caspasas), activadas por una

variedad de señales. Comprenden fragmentación del DNA, evento bioquímico que caracteriza a la apoptosis, en fragmentos de 180-200 pares de bases (4), condensación de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear (núcleo picnótico). Además, contracción del volumen celular, con pérdida de uniones intra e intercelulares y formación de fragmentos celulares o cuerpos apoptóticos. Finalmente se produce la fagocitosis de estos últimos, evitándose en todo este proceso la inflamación, hecho que la diferencia de otros tipos de muertes celulares, como la necrosis (2).

*Caenorhabditis elegans* es el nematodo que ha permitido un gran número de investigaciones científicas para dilucidar el proceso de muerte celular programada, debido a que, durante su desarrollo, 131 de sus 1.090 células mueren vía apoptosis, en una secuencia precisa y bien definida (5). En este nematodo se identificaron tres genes principales que participan en este proceso, denominados "ced" (del inglés *C elegans death*); Ced-3, Ced-4 y Ced-9 (1, 6). A comienzos de los 90 se describieron en mamíferos, genes homólogos a "ced", como la enzima convertidora de la interleuquina-1 (ECI) con Ced-3, Bcl-2 con Ced-9 y otros. Estas investigaciones renovaron el interés a nivel mundial en la apoptosis.

## Vía apoptoica

El proceso de la apoptosis se divide en etapas: primero el estímulo que gatilla la respuesta de muerte celular, después la vía por la que el mensaje es traducido por la célula, componentes reguladores y por último los efectores del mecanismo que llevan a la muerte celular (3, 9). Este proceso, eso sí, no termina hasta que la célula apoptótica es removida por un fagocito profesional.

## 1. Vías de activación

Las principales señales de activación son tres: receptores de membrana o receptores de la muerte, factores de crecimiento y daño a estructuras intracelulares, principalmente DNA.

—**Los receptores de la muerte:** pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R). Son proteínas de membrana tipo I, y comparten motivos estructurales extracelulares, ricos en cisteína. También comparten algunos motivos estructurales conservados, dentro de las “regiones de señalización” intracelulares. Estos son los llamados “dominios de la muerte”, que corresponden a una zona de interacción proteína-proteína (5, 8). Incluyen Fas/TNF-R/CD40/CD30 y otros.

—**Los factores de crecimiento:** participan principalmente por su privación, es decir que la falta o disminución de algunas citoquinas llevan a la muerte de poblaciones celulares. Un ejemplo es la Inmunodeficiencia Combinada Severa ligada a X, donde un defecto en la cadena común  $\gamma$  del receptor de la IL-2 impide a los linfocitos recibir las señales de las IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 y la IL-15, muriendo vía apoptosis.

—**Daño a estructuras intracelulares, principalmente por injuria al DNA:** es dependiente de la fosfoproteína nuclear p53, gen supresor de tumores. El gatillo para esta ruta incluye, además de la injuria al DNA, activación inapropiada de oncogenes, algunas citoquinas o su privación, hipoxia e infarto (3, 9, 11). Alteraciones en esta vía son críticas en el desarrollo de neoplasias, siendo el p53 el gen más frecuentemente mutado en ellas. La p53 está permanentemente inactivada por unión a Mdm-2; al producirse daño del DNA, la primera se fosforila, evitando la interacción entre ambas proteínas e impidiendo la proliferación de células mutadas.

—**Otras vías importantes:** injuria a membranas celulares, principalmente por alteración de la membrana mitocondrial y traslocación del citocromo c (12,13). Daño a la membrana plasmática, por diversos mecanismos, que lleva a la activación de la esfingomielina, generando ceramida de los lípidos de membrana. La ceramida actúa como segundo mensajero en la activación

de la cascada enzimática que lleva a la apoptosis celular.

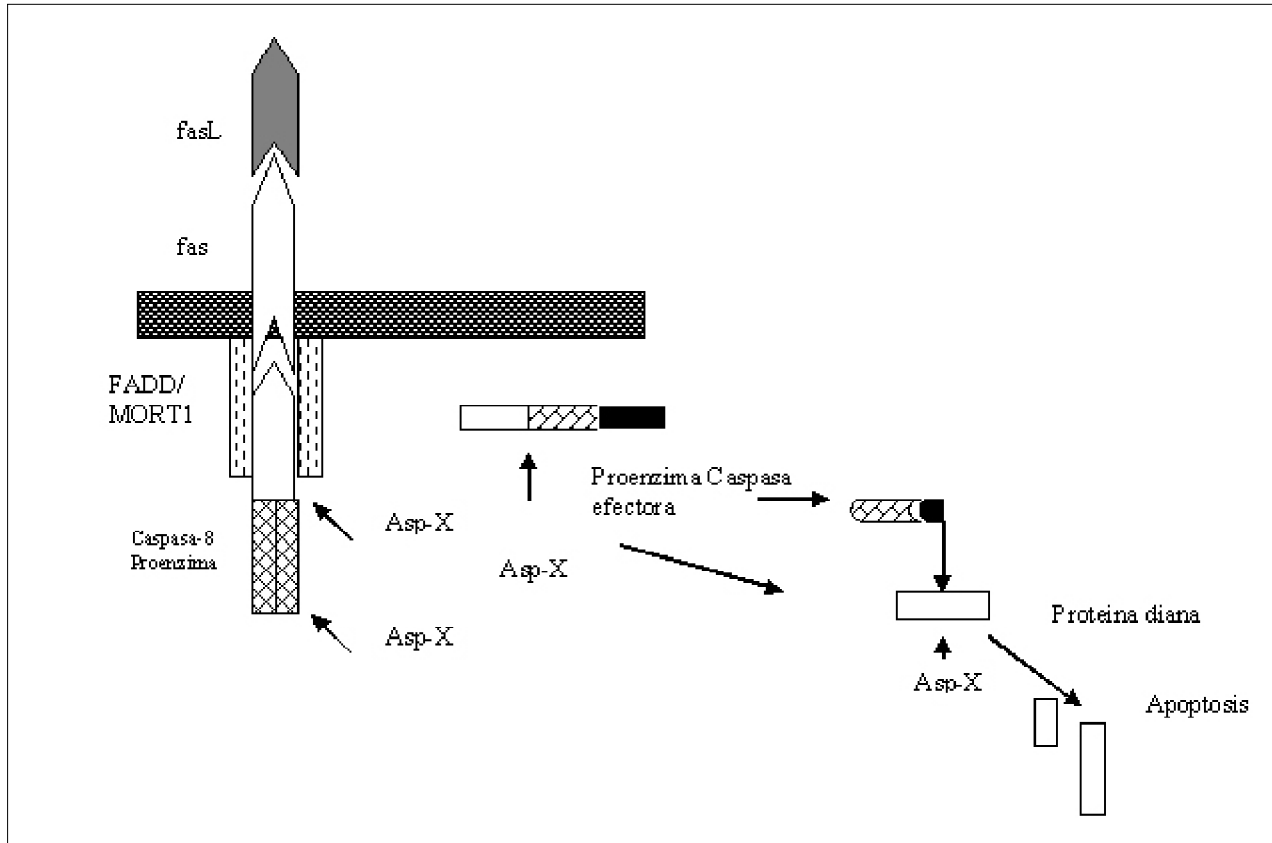
## 2. Regulación

La regulación de la muerte celular programada es compleja y efectiva. Este concepto implica que poblaciones celulares muestren tendencia a sufrir apoptosis y deban protegerse específicamente de ella (6). La mayoría, si no todas las células, expresa o posee las enzimas efectoras de la apoptosis (las caspasas), por lo que deben protegerse y regularlas en forma efectiva. En el control de la maquinaria efectora está implicada una familia de proteínas cuyo prototipo es Bcl-2 (14), gen identificado por primera vez como parte de una traslocación cromosómica en un linfoma de células B, en el que actúa como oncogén. Esta familia proteica Bcl-2/Bax posee miembros pro supervivencia (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Md-1, etc.) y miembros proapoptóticos divididos en dos grupos que difieren entre sí por su parecido molecular con Bcl-2 (Bax, Bak, Mtd, etc., y Bik, Bid, Bad, Harakiri, etc.), lo que la convierte en árbitro de la supervivencia celular y es esencial para la manutención de la homeostasis de los organismos vivos. La vía principal de regulación es mediante el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, evitando o promoviendo la liberación del citocromo-c al citosol, el que participa en la activación de la caspasa-9. La transcripción de genes para moléculas pro sobrevivencia es inducida por algunas citoquinas, como IL-2, IL-3, IL-4, etc., y por señales de moléculas coestimuladoras. La privación de estas citoquinas lleva a la disminución de Bcl-2, con el consiguiente aumento de la muerte celular.

## 3. Efectores

Las caspasas (del inglés *cysteine aspartic acid-specific proteases*) son una familia de proteasas citosólicas que participan en una cascada enzimática, desencadenada en respuesta a señales proapoptóticas, y llevan a la muerte celular. Las caspasas son siempre las efectoras de la apoptosis, independiente del estímulo o evento que la desencadena, y comparten secuencias aminoácidas, estructurales y de especificidad por el sustrato. Todas estas proteasas citosólicas escinden sus sustratos después de residuos de aspartato, lo que les confiere especificidad. Esta característica evita una digestión enzimática





**Figura 2.**

2. La desregulación de la apoptosis participa en la patogenia y/o mantención de diversas enfermedades.

Por inhibición:

- Autoinmunes por supervivencia de linfocitos autorreactivos,
- Cáncer (colon, próstata, linfomas, etc.),
- Enfermedades inflamatorias, etc.

Por sobreexpresión:

- SIDA
- Enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, ELA, Parkinson y otras.
- Riñón poliquístico.
- Enfermedades hematopoyéticas: anemia aplásica, síndrome mielodisplásico y otras.

3. Efecto proapoptoico de drogas y agentes toxicológicos utilizados en diversas patologías malignas y autoinmunes, como son, por ejemplo los glucocorticoides, azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, etc. Los glucocorticoides en particular han sido demostrados como inductores de

apoptosis en LT autorreactivos en neuritis autoinmune experimental y LT $\gamma\delta$  en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Se ha demostrado la asociación de la disminución del tamaño en la hiperplasia prostática benigna, el uso de Finasteride y muerte celular (20, 21).

### Apoptosis y enfermedades autoinmunes

La primera prueba clara para demostrar que el fracaso de la muerte celular inducida por activación da lugar a autoinmunidad fueron los estudios realizados en dos cepas de ratones singénicos homocigotos llamados linfoproliferativos (lpr) y enfermedad linfoproliferativa generalizada (gld). Estos ratones mueren a la edad de seis meses por una grave enfermedad sistémica, con múltiples autoanticuerpos y nefritis (síndrome Lupus like). El defecto lpr corresponde a la mutación del gen del receptor de membrana de la principal vía de la muerte celular, Fas (CD95), y el defecto gld se debe a una mutación puntual del gen para FasL (CD95L).

Los defectos de esta vía llevan a la incapacidad del organismo para eliminar las células T activadas, deleción de clones autorreactivos en la periferia, y producen acumulación de células T doblemente (-) en los órganos secundarios.

En el año 1994 se logró asociar patología en humanos a defectos en la vía Fas/FasL (CD95-D95L) con el estudio de pacientes con patología linfoproliferativa. En el **Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune**, que aparece en la infancia temprana, se demostraron mutaciones en los genes de Fas (**ALPS-Ia**) y de FasL (**ALPS-Ib**). En otro grupo de estos pacientes no se encontró mutación en alguno de estos dos genes, por lo que se supone que existe una falla a otro nivel de esta vía (**ALPS-II**) (22).

En esta patología, tras producirse la activación linfocitaria normal, la expansión clonal es ilimitada, lo que lleva a un crecimiento linfocitario descontrolado, que se traduce en linfadenopatías prominentes, hepatoesplenomegalia y manifestaciones autoinmunes hematológicas.

Otro rol de la apoptosis en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes se ha observado en Lupus Eritematoso Sistémico (LES), cual es el reservorio único de autoantígenos que representan las células deletadas por apoptosis o cuerpos apoptóticos. En ellos se exponen epítopes crípticos y neoepítopes. Ejemplo de autoanticuerpos crípticos son los fosfolípidos aniónicos, principalmente fosfatidilserina, que por reordenamiento de la membrana plasmática durante este proceso pueden llevar al desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos. Además, en pacientes con LES se han detectado nucleosomas circulantes producto de la fragmentación del DNA. La producción de anticuerpos antinucleosomas precede a los anti-DNA de doble hebra y a los antihistonas que llevarían a la autoinmunidad. Otro hecho es la presentación en la membrana de queratinocitos (24), fibroblastos y linfocitos susceptibles de sufrir apoptosis gatillada por luz UV de autoantígenos ENA, como La, Ro, Sm y RNP, lo que se asocia a la patogénesis y exacerbaciones clínicas de estas enfermedades. La formación de neoepítopes se debe a la modificación de péptidos propios por fosforilación, fragmentación, y otros hechos durante la formación de los cuerpos apoptóticos.

En el Lupus Eritematoso Sistémico se han descrito diversas alteraciones en la apoptosis, principalmente en relación a la vía Fas-FasL:

- Modulación de la vía por secreción de Fas soluble, por sobreexpresión de FasL de membrana y soluble que contribuye además a la injuria, por inducción de muerte celular de blancos o tejidos susceptibles, y por autoanticuerpos anti FasL. Estos últimos autoanticuerpos se han encontrado en 30% de los pacientes portadores de LES, que por neutralización de FasL permiten el escape de linfocitos autorreactivos en la periferia, siendo, por lo tanto, los únicos anticuerpos antilinfocitarios prosobrevida.
- Por alteración de la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos con sobreexposición de autoantígenos (23-25).

En el Síndrome de Sjögren:

- Existe una apoptosis acelerada de linfocitos T periféricos en relación a controles sanos, lo que se debería a hiperexpresión de Fas y baja concentración de Bcl-2 en ellos.
- Por otro lado, existe una expresión disminuida de FasL y aumento de la concentración de Bcl-2 en linfocitos infiltrantes.
- Las glándulas salivales tienen además una apoptosis excesiva debida a expresión de Fas y FasL en células acinares y ductales de glándulas salivales (26, 27).

En Artritis Reumatoidea (A.R.) se han descrito:

- Coexistencia de proliferación sinovial dependiente de factor de necrosis tumoral y apoptosis dependiente de Fas.
- Se han detectado niveles de Fas soluble en líquido sinovial de pacientes con AR severa.
- Los linfocitos de pacientes con AR tienen mayor porcentaje de Fas en su membrana (28, 29).

En la Esclerosis Sistémica Múltiple (ESM) se ha postulado una etiología autoinmune que involucra una falla genéticamente determinada de la apoptosis:

- Existen LT autorreactivos a antígenos mielínicos en individuos normales que son deletados debido a que la presentación antigénica es realizada por células presentadoras de antígenos (APC) no profesionales (astrocitos y microglia) que carecen de señales coestimuladoras. En ESM las APC no profesionales sobreexpresan

moléculas coestimuladoras y/o tienen niveles disminuidos de FasL (30).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. De Ricki L. Actividad de Apoptosis: la muerte de la célula se establece como campo animado de la investigación. *The Scientist* 1995; 9(3):1-3.
2. Fleisher TA. Apoptosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 78:245-250.
3. Wyllie AH. Apoptosis: on overview. *British Medical Bulletin* 1997; 53(3): 245-254.
4. Thatte U y Dahanukar S. Apoptosis: Clinical Relevance and Pharmacological Manipulation. *Drugs* 1997; 54(4):511-531.
5. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. Caenorhabditis elegans p53: Role in Apoptosis, Meiosis, and Stress Resistance. *Science* 2001; 294(5542):591-595.
6. Adams J y Cory S. The Bcl-Protein Family: Arbiters of cell Survival. *Science* 1998; 1322-1326.
7. Winoto Asta. Cell death in the regulation of immune responses. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9:365-371.
8. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407(6805):789-795.
9. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805): 770-776.
10. Ashkenazi A y Dixit VM. Death Receptors. Signaling and Modulating. *Science* 1998; 281:1305-1308.
11. Bellamy CO. p53 and apoptosis. *British Medical Bulletin* 1997; 53(3):522-538.
12. Green D y Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 1998; 28:1309-1316.
13. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399(6735):483-487.
14. Haimovitz-Friedman A, Kolesnick RN, Fuks Z. Ceramide signaling in apoptosis. *British Medical Bulletin* 1997; 53(3):539-553.
15. Thornberry NA. The caspase family of proteins. *British Medical Bulletin* 1998; 53(3):478-486.
16. Ekert PG y Vaux DL. Apoptosis and the immune system. *British Medical Bulletin* 1997; 53(3):591-603.
17. Sakata K, Sakata A, Kong L, Dang H. Role of Fas/Fas L Interaction in Physiology and Pathology. The Good and the Bad. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87(1):1-7.
18. Elkon KB. Apoptosis and Autoimmunity. *J Rheumatol* 1997; 24(50):6-7.
19. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Inter Med* 2001; 40(4): 275-284.
20. Debatin KM. Cytotoxic drugs, programmed cell death, and the immune system: Defining new roles in old players. *Journal of the National Cancer Institute* 1997; 89(11):750-754.
21. Manami S, Chifuyu U, Noriyuki S, Kaori A, Toru F, Junichi A, Yoshinari T, Hiroshi H. Apoptosis of lymphocytes induced by Glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with SLE. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(5):823-831.
22. Straus S, Sneller M, Lenardo M, Puck J, Strober W. An Inherited Disorder of Lymphocyte Apoptosis: The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *Ann Intern Med* 1999; 130:591-601.
23. Noburu S, Motohide I, Shoji M, Sakae K, Tsuyoshi S. Inhibition of Fas/Fas L-mediated apoptotic cell death of Lymphocytes in vitro by circulating anti-Fas L autoantibodies in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(2):344-353.
24. Grossman D, Kim P, Blanc-Brud O, Brash D, Tognin S, Marchisio P, Altieri D. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest* 2001; 108(7):991-999.
25. Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, Irvine AE, Kennedy RJ, Bell AL. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in SLE. *Ann Rheum Dis* 1999; 58(5):309-314.
26. Ohlsson M, Skarstein K, Bolstad AI, Johannessen AC, Jonsson R. Fas-induced apoptosis is a rare event in Sjogren's syndrome. *Lab Invest* 2001; 81(1):95-105.
27. Tapinos NI, Polihronis M, Tzioufas AG, Skpouli FN. Immunopathology of Sjogren's syndrome. *Ann Med Int* 1998; 149(1):17-24.
28. Nishioka K, Hasunuma T, Kato T, Sumida T, Kobata T. Apoptosis in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(1):1-9.
29. Perlman H, Pagliari LJ, Liu H, Koch AE, Haines GK, Pope RM. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like IL-1 beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(1):21-30.
30. Pendes MP. Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cell as a cause of Multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 351:978-982.