

Apoptosis y Sistema Nervioso

CARLOS COSENTINO

*Instituto de Ciencias Neurológicas "Oscar Trelles Montes" y Facultad de Medicina
Universidad Nacional Mayor de San Marcos*

RESUMEN

Se realiza una revisión sobre el tema de muerte celular programada o apoptosis con énfasis en su relación al desarrollo del sistema nervioso y su implicancia en algunas enfermedades neurológicas

Palabras Claves: Muerte celular programada, apoptosis neuronal, factores neurotróficos.

APOPTOSIS AND THE NERVOUS SYSTEM SUMMARY

A review on programmed cell death or apoptosis is made. A special emphasis is put on its relationship with nervous system development and some neurological disorders.

Key words: Programmed cell death, neural apoptosis, neurotrophic factors.

INTRODUCCION

En 1964, Lockshin y Williams estudiaron el proceso a través del cual ciertas células de insecto morían durante la metamorfosis en una secuencia aparentemente predeterminada, proceso al que llamaron "muerte celular programada" (1). Posteriormente se determinó que este evento requería la síntesis de proteínas, sugiriéndose que la propia célula participaba activamente en su muerte. En efecto, cada célula poseería a partir de su material genético, un programa de muerte que al ser desencadenado de manera espontánea o inducida conduce a la desaparición de la célula. En 1972, Kerr y cols. propusieron el término apoptosis para describir este fenómeno (2).

En el hombre la apoptosis ocurre durante muchos eventos fisiológicos, tales como la embriogénesis, el desarrollo y mantenimiento normal de órganos y tejidos y durante el envejecimiento. Y aunque esta noción de muerte celular programada es bastante antigua no es sino recientemente que se la involucra en numerosas patologías como enfermedades autoinmunes, el SIDA y varias del sistema nervioso (3-5)

APOPTOSIS Y GENÉTICA

La apoptosis es un fenómeno universal que ocurre prácticamente en todas las especies: en la *Drosophila* y el nemátodo *Caenorhabditis elegans* este mecanismo ha sido bien estudiado (6-7). De las más de mil células somáticas formadas durante el desarrollo del *C. elegans*, aproximadamente un 10% sufrirán apoptosis, de las cuales la gran mayoría corresponden a células nerviosas. Se han identificado hasta catorce genes implicados en este proceso, destacando tres: el *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (8). Los dos primeros son conocidos también como genes proapoptóticos. La estructura del producto *Ced-4* sugiere que se trataría de una proteína relacionada al calcio aunque no se ha identificado aún su homólogo en mamíferos. El *Ced-3* es una proteasa relacionada a la cisteína que comparte características morfológicas y funcionales con el grupo de enzimas que convierte a la interleucina-1β (EC1) de los mamíferos. Estas proteasas, especialmente la CPP32, juegan un papel importante en la inducción de apoptosis (9). Así, varios estudios han mostrado que mientras la sobre-expresión de los genes EC1 favorece la apoptosis, la inyección de un inhibidor viral de estos genes, a nivel de las neuronas del ganglio dorsal espinal del pollo disminuye la muerte celular inducida por privación de factores neurotróficos (10).

El gen *ced-9* inhibe la acción de los dos anteriores (gen antiapoptótico) y se ha determinado una homología con el gen *Bcl-2* de los mamíferos (B cell lymphoma-leukemia 2). Este último ha sido identificado en linfomas foliculares del tipo B caracterizados por una traslocación del gen del cromosoma 18 al 14. Esto condiciona un incremento de la transcripción de la proteína *Bcl-2* en los linfocitos tumorales

Correspondencia:

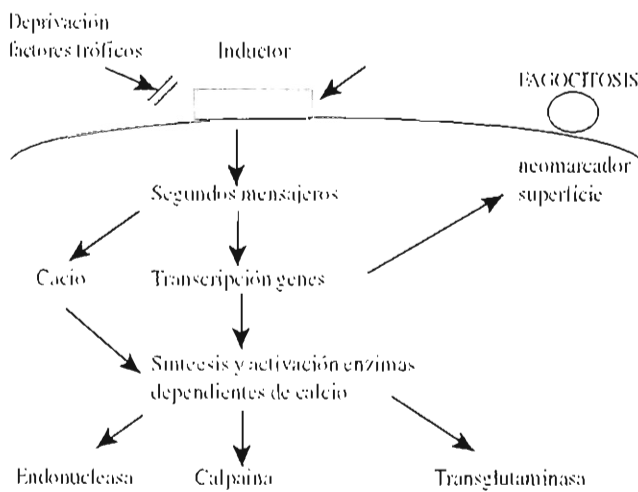
Dr. Carlos Cosentino Esquerre
Instituto de Ciencias Neurológicas "O. Trelles M."
Ancash 1271, Lima 1-Perú

sobreviviendo por tiempos anormalmente prolongados. Bel-2 es una proteína localizada en las membranas mitocondrial, nuclear y retículoendoplásmica. Se expresa fuertemente en tejidos fetales y adultos en vías de división/diferenciación y muy poco en tejidos maduros; su rol en el control de la apoptosis en el sistema nervioso fue establecido hace pocos años. Las neuronas simpáticas con un Bel-2 sobre-expresado y sometidas a privación de factor de crecimiento neural (NGF) sobreviven 16 días más que las neuronas sometidas a situaciones similares sin poseer un Bel-2 sobre-expresado (11).

MECANISMOS DE APOPTOSIS

Los criterios morfológicos son los determinantes en la definición de apoptosis ya que los marcadores genéticos y bioquímicos varían de una célula a otra. El mecanismo por el cual se desencadena la apoptosis es variado y depende de la línea celular (Figura N° 1).

Fig. 1 Mecanismos Intracelulares de la Apoptosis



Se han identificado sustancias como el factor de necrosis tumoral (TNF), ciertas interleuquinas (IL-1 y -4) y hormonas esteroideas que actuarían como inductoras; sin embargo, y como ya se señaló, la privación de factores neurotróficos también desencadena apoptosis (12). Estas sustancias inductoras interactúan con un receptor específico de la membrana desencadenando a nivel intracelular la activación de segundos mensajeros y ciertos genes que incrementan la concentración de calcio intracelular, la síntesis de macromoléculas y la activación de proteínas como la calpaina y endonucleasas. Luego que la "orden" de apoptosis ha sido dada, ocurre una condensación y luego una fragmentación del ADN, generando segmentos de alrededor de 100 pares de bases que al someterlos a una electroforesis en gel adoptan un aspecto característico en "escalera". Estos fragmentos son el resultado de la digestión del ADN genómico por las endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} (13). Luego, ocurre un fenómeno de marginación del ADN hacia la membrana nuclear. El citoplasma se condensa preservándose la mayor parte de organelas. Las membra-

nas celular y nuclear se invaginan y fragmentan, procesos mediados posiblemente por proteasas del tipo calpaina, y se generan los "cuerpos apoptóticos" que viene a ser material citoplasmático y nuclear englobados en porciones de membrana. Debe señalarse que las células ameboides pueden presentar características de apoptosis lo que sugiere que la degradación del ADN no es una condición indispensable a este tipo de muerte celular (14). Finalmente, estos cuerpos apoptóticos son reconocidos y fagocitados por los macrófagos sin la liberación de enzimas proteolíticas o radicales libres, por ende no hay reacción inflamatoria ni modificación de la arquitectura tisular. Por ello, la apoptosis se diferencia substancialmente de la muerte celular por necrosis. Se compara estos dos procesos en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1.- Comparación entre eventos celulares vistos en Apoptosis y necrosis

Características	Apoptosis	Necrosis
Factor desencadenante	Fisiológico	Noxa conocida
Distribución celular	Células aisladas	En áreas
Tamaño celular	Disminuido o sin cambios	Incrementado
Integridad membrana celular	Conservada	Pérdida precoz
Compromiso de organelas	Tardío	Precoz (+++)
Núcleo	Condensación y marginación de cromatina	Edema (piñonosis)
ADN	Fragmentado	Intacto
Infiltrado inflamatorio	Ausente	Presente
Fagocitosis	Presente	Ausente
Fragmentación celular	Presente	Ausente (bolsa) (cuerpos apoptóticos)

La velocidad a la que se producen los fenómenos antes descritos varían de una especie a otra y de un tejido a otro dentro de una misma especie, variando de algunos segundos para los linfocitos a algunos minutos u horas para las neuronas.

APOPTOSIS Y DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

En el hombre, la apoptosis interviene sobretudo en dos tipos de células: los linfocitos, a lo largo de toda la vida, y en las neuronas durante el período perinatal. Durante el desarrollo del sistema nervioso la apoptosis controla por ejemplo el número de neuronas y la precisión de conexiones sinápticas eliminando las conexiones imperfectas, es así que durante la sinaptogénesis aproximadamente el 50% de neuronas mueren por un mecanismo de apoptosis (15). Esta eliminación de neuronas es esencial para la correcta maduración y funcionamiento del sistema nervioso. Asimismo, durante una fase de este desarrollo neural, muchas neuronas pueden desarrollar apoptosis si se someten a una privación de factores tróficos siendo resistentes a esta privación antes o después de pasar esta fase crítica. La presencia de esta "ventana" durante el desarrollo sugiere que diversos genes propapóticos se expresarían en las neuronas en circunstancias determinadas. Algunos de estos factores identificados son el factor de

crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDGF) y las neurotrofinas 3 y 4 (15). En la actualidad existen más de cuarenta genes pro y antiapoptóticos en relación al sistema nervioso aunque la mayor parte con mecanismos de acción desconocidos (*). Algunos de estos genes son: *c-myc*, *c-jun*, *FAS/Apo 1*, *Bax*, entre otros. Como se señaló anteriormente, se ha demostrado que la expresión del gen *Bcl-2* inhibe la apoptosis de neuronas sometidas a privación de factores de crecimiento, así como también por radicales libres e ionóforos cálcicos aunque el mecanismo intrínseco por el cual el producto del gen *Bcl-2* inhibe la muerte neuronal está aún en investigación. Otro hecho importante es lo que ocurre con los oligodendrocitos del sistema nervioso central que al verse separados de las regiones libres de mielina de los axones a los que tienen que recubrir mueren por un mecanismo de apoptosis. Se postula la existencia de señales derivadas del propio axón las que promoverían la sobrevivencia de las células oligodendrogiales (15).

APOPTOSIS Y ENVEJECIMIENTO

Durante el envejecimiento dos fenómenos son constantes: la disminución del potencial proliferativo de las células y la desaparición de las mismas. Un mecanismo es la privación de factores de crecimiento lo cual está bien determinado en el sistema nervioso central. Otro mecanismo es cuando se perturban o se interrumpen las vías de señalización que generan división celular; por ello el defecto de transmisión de señales extracelulares, particularmente de señales proliferativas, representa un riesgo mortal a la célula. Se ha evidenciado disfunciones relacionadas al envejecimiento en algunos receptores de membrana como el receptor para el antígeno de linfocitos T y el APO-1/Fas los que, junto a defectos de ciertas proteínas como la proteínquinasa C y la tirosinquinasa, tienen la propiedad de inducir apoptosis (16). Durante el envejecimiento además, es posible que ciertos genes que controlan los mecanismos de proliferación modifiquen su expresión y desplacen el equilibrio entre la proliferación-muerte celular en favor de la apoptosis. Así los protooncogenes *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* y *p53*, importantes en la regulación del ciclo celular, son también conocidos genes apoptóticos. Entonces, la maquinaria apoptótica podría estar activa durante el proceso del envejecimiento y contribuir al exceso de muerte celular, fenómeno característico de esta etapa de la vida.

APOPTOSIS Y ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS

Hasta la fecha no existe en ningún caso pruebas irrefutables que la apoptosis juegue un rol fundamental en las enfermedades neurológicas especialmente en las del tipo degenerativas. Sin embargo diversas evidencias circunstanciales en favor de ese papel se vienen acumulando rápidamente en los últimos tiempos.

Observaciones *in vitro* y en animales adultos han mostrado que ciertas lesiones focales del sistema estriado, en donde no se comprometen las aferencias o eferencias axonales, se asocian con una disminución en el número de las células dopaminérgicas de la sustancia nigra como consecuencia de fenómenos apoptóticos. Este hallazgo sugiere que estas neuronas, al igual que otros sistemas neurales, dependerían de sus células diana (en este caso el estriado) para su viabilidad. La

importancia en algunos de los síndromes parkinsonianos, especialmente la enfermedad de Parkinson, queda aún por determinarse.

Asimismo, el rol exacto de la apoptosis en la enfermedad de Alzheimer (EA) no está bien precisado. Sin embargo, desde hace algunos años se conoce que ciertos genes como el *xgp-2*, altamente expresado en la apoptosis de linfocitos y células prostáticas, se encuentra incrementado en cerebros de pacientes con EA. De otro lado, en esta entidad es característico el depósito anormal de proteína β -amiloide en el cerebro que al estar acumulada puede impedir a las neuronas recibir adecuadamente los factores neurotróficos generados en las sinapsis o por células gliales adyacentes. Asimismo, la exposición al β -amiloide parece volver a las neuronas más susceptibles a los efectos citotóxicos de los aminoácidos excitatorios (17) o incluso inducir apoptosis en cultivos de células neuronales (18). El gen *Bcl-2* inhibe la apoptosis en células neuronales tratadas con la proteína β -amiloide y opuestamente la expresión de un gen proapoptótico, el *p75NTR*, incrementa la sensibilidad de las células a la toxicidad del β -amiloide. Puesto que las neuronas colinérgicas de los núcleos encefálicos implicados en la EA expresan de manera elevada este *p75NTR*, surge la interrogante sobre su participación en la etiopatogénesis de esta enfermedad (1).

En relación a la esclerosis lateral amiotrófica del tipo familiar (ELAF) se ha descrito en un subgrupo de pacientes hasta treinta diversas mutaciones en el gen *sod1* que codifica la superóxido dismutasa Cu/Zn. Inicialmente se postuló que en estos pacientes la ELAF resultaba de una actividad disminuida de esta enzima, sin embargo estudios posteriores en ratones transgénicos con una actividad enzimática normal o supranormal mostraron que también eran capaces de desarrollar una degeneración de las motoneuronas a pesar de la expresión de *sod1* (19) sugiriendo que las mutaciones asociadas a la ELAF actuaban como mutaciones de "adquisición de función". Otro hecho en favor de esta hipótesis era que el *sod1* actúa como gen antiapoptótico en ciertos cultivos neuronales mientras que en las mutaciones asociadas con la ELAF actúan como genes neuronales proapoptóticos (20). Si bien es cierto estos hallazgos no implican necesariamente que en la ELAF las motoneuronas mueren por apoptosis, la participación de ciertos genes podría ser contributiva.

En el caso del SIDA, los mecanismos por los cuales se genera la depleción linfocitaria tras la infección por VIH son complejos, sin embargo el papel de la glicoproteína gp120 en inducir apoptosis en las células portadoras del receptor CD4 está bien determinado. Estudios iniciales sugerían que la muerte neuronal en áreas de la corteza cerebral en infección por VIH estaba mediada por esta gp120 al activar receptores NMDA e incrementar las concentraciones intraneuronales de calcio. Sin embargo, trabajos recientes muestran que la gp120 podría no actuar directamente sobre las neuronas sino en la microglía para liberar sustancias tóxicas aún no identificadas (21). Debe admitirse que falta evidencia directa de los mecanismos celulares involucrados en la muerte neuronal inducida por la gp120 (21).

La descripción original de apoptosis (2) fue llevada a cabo en isquemia hepática. Recientemente Linnik y cols. (22) mostraron que la isquemia cerebral también induce apoptosis y que al bloquearla con inhibidores translacionales se disminuye el tamaño del infarto; asimismo la sobre-expresión del *Bcl-2* en el sistema nervioso de ratones

transgénicos conduce a una reducción importante en el volumen de infartos experimentales. Finalmente, estudios bioquímicos y morfológicos a través de microscopía electrónica han evidenciado algunas de las características morfológicas de apoptosis luego de isquemias cerebrales experimentales y la proteína Bax podría ejercer una función proapoptótica.

En estudios experimentales en roedores y humanos, el status epiléptico induce muerte selectiva y retardada de neuronas hipocámpicas a partir de una elevación del glutamato, activación de receptores NMDA y elevación del calcio intracelular (23).

Ninguna de todas estas observaciones prueba el rol de la apoptosis en enfermedades neurológicas, pero al ser tomadas en conjunto, sugieren fuertemente la posibilidad que estudios posteriores determinen el papel exacto de la apoptosis.

No obstante, la meta es desarrollar agentes terapéuticos que incrementen o reduzcan la susceptibilidad de algunas células para la apoptosis. Fármacos que induzcan apoptosis podrían amplificar los efectos de los agentes quimioterápicos en células neoplásicas resistentes; por otro lado los inhibidores de apoptosis podrían ayudar a los pacientes con infección por VIH a disminuir la tasa de depleción linfocitaria (4). Otra alternativa la constituye el empleo de factores neurotróficos y de hecho en la actualidad se viene desarrollando diversos ensayos clínicos terapéuticos en algunas entidades neurodegenerativas, como las enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer (21,24). Posiblemente con el devenir de los próximos años y con el éxito de estos estudios se incrementa de manera importante el arsenal terapéutico para contrarrestar y quizás prevenir el desarrollo de estas entidades.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 1964; 10: 643-649
- 2) Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- 3) Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-1254
- 4) Bredesen DA. Neural Apoptosis. *Ann Neurol* 1995;38:839-851.
- 5) Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462

- 6) Vaux D, Weissman Y, Kim S. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by *bcl-2*. *Science* 1992; 258: 1955-1957.
- 7) Vaux D. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 786-789
- 8) Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449
- 9) Schwartz L, Milligan C. Cold thoughts of death: the role of ICE proteases in neuronal cell death. *Trends Neurosci* 1996; 19: 555-562
- 10) Gagliardini V, Fernandez PA, Lee RK, et al. Prevention of vertebrate neuronal death by the *cmyb* gene. *Science* 1994; 263: 826-828
- 11) Garcia Y, Martinou Y, Tsujimoto Y et al. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the *bcl-2* proto-oncogen. *Science* 1992; 258: 302-304
- 12) Altman J. Programmed cell death: the paths to suicide. *Trends Neurosci* 1992;15: 278-280
- 13) Arends M, Morris R, Wyllie A. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136: 593-608
- 14) Schulze-Osthoff K, Walezack H, Droge W et al. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 1994; 127: 15-20
- 15) Raff M, Barres B, Burne J et al. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993; 262: 695-700
- 16) Phelouzat MA, Quadri RA y Prout J.L. Apoptose et senescence. *Medicine/Sciences* 1995;11:894-900
- 17) Mattson M, Cheng B, Davis D et al. Beta-amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neuroscience* 1992; 12: 376-389.
- 18) Luo D, Copani A, Pike C et al. Apoptosis is induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7951-7955
- 19) Gurney ME, Pu H, Chiu AY et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994; 264: 1772-1775
- 20) Rahizadeh S, Gralla EB, Borchelt DR et al. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3024-3028
- 21) Charriaut-Marlangue C, Aggoun-Zamoni D, Represa A et al. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp120 toxicity. *Trends Neurosci* 1996;19: 109-114
- 22) Linnik M, Zobrist R, Hartfield M. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24:2002-2009.
- 23) Heyd B, Aebischer P. Les facteurs neurotrophiques et leur applications therapeutiques potentielles. *Medicine/Sciences* 1995; 11:299-302
- 24) Yuen E, Mobley W. Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Ann Neurol* 1996; 40:346-354