

La apoptosis y su importancia biomédica

Clara Ortega-Camarillo,* Margarita Díaz-Flores,* Alejandro Avalos-Rodríguez,**
Marcela Vergara-Onofre,** Ana María Rosales-Torres**

Recepción: 6 de noviembre de 2000; aceptación: 18 de abril de 2001

Resumen

En este trabajo, revisaremos las características morfológicas y las fases en que se ha dividido a la apoptosis, así como la importancia de su presencia en algunas enfermedades.

La apoptosis y la necrosis son dos mecanismos mediante los cuales puede ocurrir muerte celular. La apoptosis constituye una medida fisiológica de remoción celular, bajo control genético, que se caracteriza por colapso celular, condensación de la cromatina y fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas por células vecinas o macrófagos, previniendo así una reacción inflamatoria. La apoptosis se ha propuesto como un evento crítico para mantener la homeostasis tisular que asegura el estado de salud de los organismos.

La necrosis implica la ruptura de la membrana e hipoxia, lo que conduce a la disminución en las concentraciones de adenosin trifosfato (ATP), colapso metabólico, edematización y disolución de la célula originando un proceso inflamatorio.

Palabras clave: Apoptosis, TNF, Fas, caspasas, Bcl-2, citocromo C, mitocondria.

Summary

Cell death can occur through apoptotic or necrotic death pathways. Membrane disruption leads to inflammation, a typical feature of necrosis. Apoptosis constitutes a genetically controlled physiologic process of cell removal. It is characterized by cell shrinkage, chromatin condensation, and DNA cleavage. Apoptotic cells are rapidly recognized and engulfed by phagocytes thus inhibiting an inflammatory response following necrosis. Apoptosis has been proposed as a basic event to protect tissue homeostasis. This paper analyzes the genetic, biochemical, and morphologic characteristics related to apoptosis, as well as its relationship to certain illnesses.

Key words: Apoptosis, TNF, Fas, caspases, Bcl-2, cytochrome C, mitochondria.

*Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

**Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Clara Ortega Camarillo. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica. Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Apartado Postal 12-855, México D.F.

Introducción

La supervivencia de un organismo multicelular depende de un sofisticado balance entre la vida y la muerte de sus células. Esta última puede ocurrir mediante dos procesos esencialmente diferentes llamados: necrosis y apoptosis. La necrosis es el resultado del daño celular masivo caracterizado por la liberación de enzimas lisosomales. Este proceso puede ser generado por diversos factores destacando: deficiencias del aporte nutricional, respiratorio o circulatorio, agentes físicos (calor, frío, radiaciones, traumatismos), agentes químicos (sustancias tóxicas), y agentes biológicos (microorganismos).¹ El término de apoptosis describe una forma característica de muerte, gobernada por un programa genético común en varios tipos celulares.²⁻⁴ Los genes que controlan la apoptosis muestran un alto grado de conservación en diversos animales, desde los nemátodos hasta los vertebrados superiores, lo que sugiere que evolutivamente este proceso apareció con el surgimiento de los animales multicelulares más primitivos. La apoptosis, usualmente afecta a células individuales, más que a todas las células de un tejido. Actualmente, este proceso se considera como una medida fisiológica de remoción celular, en la cual las células muertas experimentan cambios sutiles en la fisicoquímica de sus membranas que conducen a su reconocimiento y fagocitosis por células normales adyacentes (Figura 1).⁵

La evidencia acumulada hasta ahora, sugiere que la gran mayoría de las células animales son capaces de seguir esta vía de muerte, aun aquellas en las que no se activa el programa de muerte. Este hallazgo implica que el programa genético de autodestrucción forma parte del repertorio de respuestas celulares a señales externas o a cambios en las condiciones celulares internas.⁶ Existen básicamente dos procesos por los cuales las células activan su programa de muerte. El primero, al que se le conoce como *muerte celular programada*, constituye un mecanismo fundamental en la organogénesis durante el desarrollo embrionario y la metamorfosis, ejemplo de ello es la remoción de tejido durante la formación de los dedos del feto y la eliminación de la cola del renacuajo en la metamorfosis de la rana.¹ El segundo, conocido como apoptosis, implica la destrucción de las células que

representan una amenaza para la integridad del organismo. Esto queda demostrado en las células que presentan daños en su ADN que pueden repercutir en el desarrollo embrionario, pues aumentan la producción de p53, potente inductor de la apoptosis.^{7,8} En particular, es importante para el sistema inmune, durante el proceso de selección de linfocitos T en el timo,⁹ en la eliminación de células autorreactivas después de que se ha completado la respuesta inmune y en la muerte de los neutrófilos maduros.¹⁰⁻¹² También se observa en los casos de atrofia de la próstata, después de la castración y en la glándula mamaria posterior al amamantamiento.⁹

La cantidad de estudios sobre los mecanismos moleculares que intervienen en la presentación de la apoptosis es cada vez mayor. En ellos se le propone como un evento crítico para proteger la homeostasis tisular que asegura el estado de salud de los organismos, de manera que la supresión o sobreexpresión de la apoptosis está asociada con la presentación de algunas enfermedades como el cáncer.^{13,14}

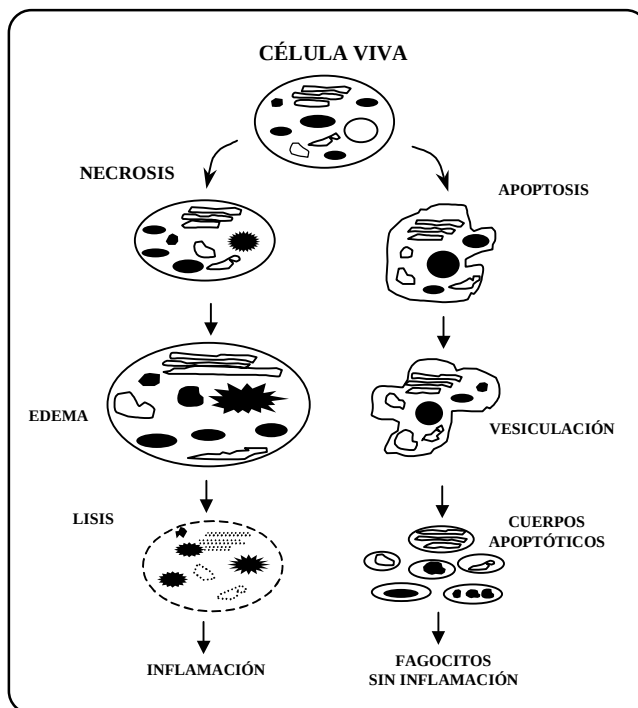


Figura 1. Secuencia de los eventos morfológicos que ocurren durante la muerte celular por necrosis y por apoptosis.

El objetivo de este trabajo es revisar las características morfológicas, los aspectos bioquímicos y genéticos de la apoptosis, así como su participación en la etiología del cáncer, enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y sida.

Caracterización morfológica

Uno de los primeros cambios morfológicos que presentan las células al inicio del proceso apoptótico, consiste en una condensación del citoplasma y reducción del volumen celular acompañado de cambios en la estructura del núcleo. La cromatina se condensa y forma cúmulos densos adosados a la membrana; esto es seguido de invaginaciones de la membrana nuclear y termina con la fragmentación del núcleo en estructuras membranosas con cantidades variables de cromatina.³ De manera análoga, la membrana celular experimenta invaginaciones que terminan por fragmentar a la célula formando racimos de vesículas de tamaño variable que contienen orgánulos intactos que no se fusionan con los lisosomas. A estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos, los cuales son rápidamente fagocitados por células vecinas. Por lo tanto, una de las consecuencias fisiológicas más relevantes de la muerte por apoptosis es que no se libera material intracelular al medio intersticial.¹⁵ Es importante destacar que este tipo de muerte está restringida a células individuales y nunca resulta en la muerte de células vecinas en las que no se haya activado el programa de muerte.^{3,5} El proceso de apoptosis ha sido subdividido en 3 fases diferentes: inductora, efectora y de degradación (Figura 2).⁵

Fase de inducción

Durante la fase de iniciación o de inducción, las células reciben el estímulo de muerte. La apoptosis puede ser inducida por diversos estímulos como son: ausencia de factores de crecimiento, factores tróficos, glucocorticoides, radiaciones γ y activación de receptores de muerte. La vía de activación probablemente difiera de acuerdo al tipo celular, pero la respuesta en esencia es la misma, y en la mayoría de los casos el estímulo inicial converge en una vía efectora común.⁵

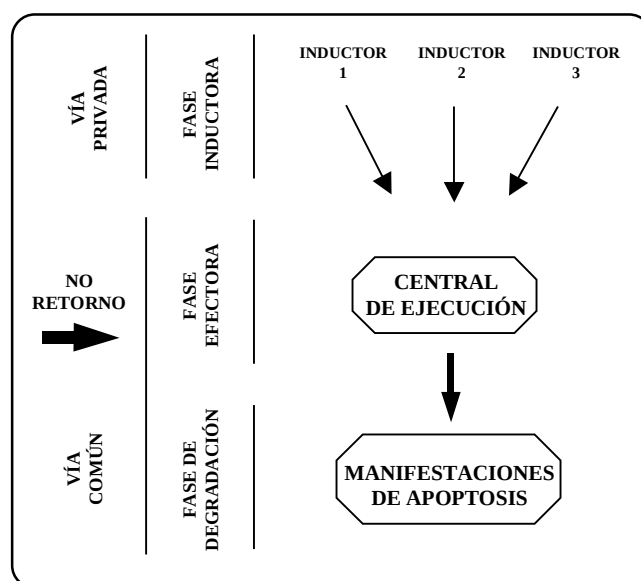


Figura 2. Vista esquemática de las tres fases de la apoptosis. Durante la fase de iniciación, distintas vías, activan un ejecutor central. Estas vías son privadas dado que dependen de un disparador inicial. La vía común comprende dos fases distintas: la efectora durante la cual se activa el ejecutor central y que responde a mecanismos de regulación, y la fase de degradación, en la que la apoptosis se vuelve manifiesta, tanto a nivel morfológico como de catabolismo bioquímico.

Una de las principales vías que inician la apoptosis en las células de los mamíferos son los receptores de superficie celular que transmiten las señales de apoptosis y son activados por ligandos de muerte específicos. Los receptores de muerte pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y el receptor del factor de necrosis neural, respectivamente (TNFRI/NGFR), que contienen un dominio extracelular rico en cisteínas y una secuencia homóloga citoplásmica llamada dominio de muerte. Los receptores de muerte mejor caracterizados son Fas y TNFRI¹⁶ (Cuadro I).

El Fas se expresa en diversos tejidos como: timo, pulmón, hígado, corazón, riñón, ovario y linfocitos maduros.¹⁷ La interacción receptor-ligando (Fas/FasL) participa en procesos fisiológicos entre los que se incluyen la delección periférica de células T maduras al final de la respuesta inmune; en la muerte de las células infectadas por virus o cancerígenas por células T citotóxicas y células naturales asesinas, y en la eliminación de células inflamatorias en sitios inmunológicamente privilegiados como los ojos.¹⁷

Cuadro I. Receptores de muerte y sus ligandos¹⁶

Receptor	Sinónimo	Ligando
Fas	Apo1 CD95	FasL
TNFR1	p55 CD120a	TNF Linfotoxina α
DR3	Apo3 WSL-1 TRAMP LARD	Apo3L (TWEAK)
DR4 y DR5	Apo2 TRAIL-R2 TRICK-2 KILLER	Apo2L (TRAIL)

Igual que otros miembros de la familia TNF, FasL es una molécula homotrimérica, por lo que se sugiere que cada trímero de FasL se une a tres moléculas de Fas. Esta unión promueve la oligomerización del receptor, e inmediatamente después la proteína adaptadora llamada FADD (dominio de muerte asociado a Fas o Mort I), se asocia al dominio de muerte del receptor.

La proteína FADD se une a través de su propio dominio efector de muerte a la procaspasa 8 que conduce a su activación. La caspasa 8 (conocida como FLICE o MACH) es la responsable de activar a otras caspasas como la 9¹⁶ (Figura 3).

En el caso del TNF, los receptores de esta citocina se encuentran presentes en todas las células del cuerpo, activando el programa de muerte cuando la transformación hacia una célula tumoral o una infección viral producen un cambio interno en la célula que permite que el programa de muerte tenga efecto.¹⁸

En algunos tipos celulares el TNF puede inducir apoptosis por dos vías: la primera es a través de la asociación con el receptor de muerte y la subsecuente activación de la caspasa 8.¹⁶ La segunda al inducir cambios en el potencial de la membrana mitocondrial con la producción de radicales libres, ceramidas vía hidrólisis de la esfingomielina¹ y la activación de una proteasa semejante a la caspasa 3.^{19,20}

Otro de los mecanismos de activación del programa de muerte es el encendido de tipo constitu-

tivo como parte de las características del estado de maduración o diferenciación de un linaje celular. En estos casos la muerte se previene por la acción de factores de sobrevivencia llamados tróficos, que de estar presentes en el medio interfieren en la ejecución del programa de muerte. Tal es el caso de las neuronas dependientes del factor de crecimiento neuronal (NGF) o de los timocitos dependientes de la interleucina 3 (IL-3). El sistema NGF

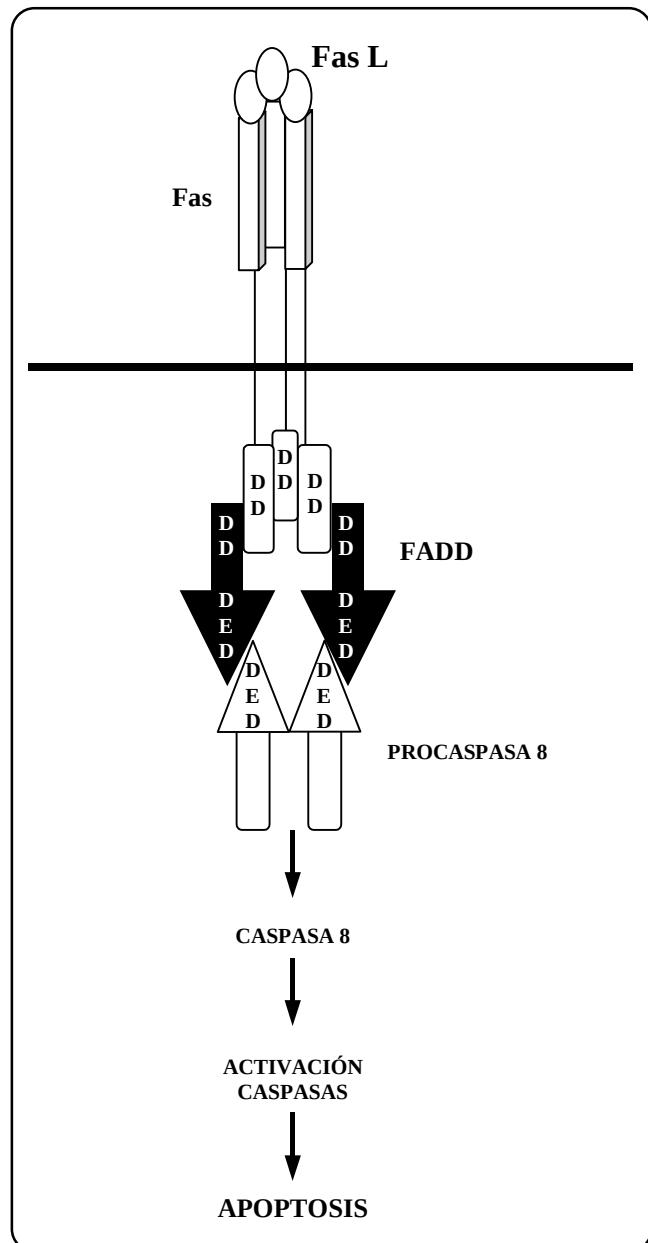


Figura 3. Mecanismo de señalización vía Fas/FaL. DD dominio de muerte; DED dominio efector de muerte; FADD dominio de muerte asociado a Fas.

participa en la maduración neuronal y durante la selección de sinapsis funcionales en el sistema nervioso, mientras que el sistema IL-3 es importante durante la maduración hematopoyética.²¹ En su inicio la apoptosis requiere de genes inductores (Cuadro II), esto ha sido comprobado con los estudios realizados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) y en la mosca *Drosófila melanogaster* de los que se han aislado genes específicos, indispensables para la inducción de la muerte celular programada.²⁰ Se conocen tres genes que participan en la ejecución de las células: *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (*cell death abnormal*). Los elementos proteicos de *ced-3* y *ced-4* son necesarios para la ejecución de la muerte celular, mientras que el producto del gen *ced-9* actúa como regulador negativo de *ced-3* y *ced-4*, previniendo la muerte.^{21,22} Las investigaciones realizadas en estos organismos han permitido comprender los mecanismos involucrados en la regulación de la apoptosis en los mamíferos ya que representa un proceso altamente conservado a través de la evolución. Diversos mediadores centrales de la apoptosis en los mamíferos tienen formas moleculares y mecanismos de señalización similares a *ced-3*, *ced-4* y *ced-9*.²²

En los mamíferos, el equivalente de la familia *ced-3* del nemátodo *C. elegans* son las caspasas, proteasas con una cisteína en su sitio activo.^{23,24} Las caspasas están presentes en el citoplasma de la mayoría de las células en forma inactiva como proenzimas. Existen por lo menos tres vías por las cuales las caspasas pueden ser activadas. La primera requiere de otras caspasas; la segunda, a través de receptores de muerte de la familia del TNFR/NGFR y la tercera involucra la traslocación del citocromo C, desde la mitocondria hasta el citoplasma.²⁵ El homólogo de *ced-4* que induce apoptosis en el humano es el llamado *factor activador de proteasas apoptóticas* (Apaf-1). Apaf-1 puede interactuar con el citocromo C e iniciar la cascada de activación de las caspasas, o bien unirse a algún miembro de la familia Bcl-2 (homólogo de *ced-9*) y prevenir la apoptosis al evitar la activación de las caspasas.²²

Uno de los primeros genes que se demostró actuaba como regulador de la apoptosis fue *bcl-2*, que se identificó inicialmente asociado al desarrollo de leucemias granulocíticas de células B de

Cuadro II. Algunos genes que participan en la regulación de la apoptosis^{14,15,21}

Inhibidores	Promotores
<i>bcl-2</i>	<i>ced-3</i>
<i>ced-9</i>	<i>ced-4</i>
<i>bcl-x_L</i>	caspasas
	fas-fas ligando
	factores de transcripción
	p53
	c-myc

donde deriva su nombre.²⁶ Posteriormente, un gran número de proteínas relacionadas con el Bcl-2 (al menos 15) han sido identificadas en el mamífero. Todos los integrantes poseen uno de los cuatro residuos conservados conocidos como dominios de homología del Bcl-2 (BHI a BH4). El Bcl-2 y el Bcl-_{xL}, que actúan como inhibidores de la apoptosis poseen BHI y BH2, y los promotores de la apoptosis como Bax, Bak y Bok contienen BHI, BH2 y BH3. Existen otras proteínas que contienen solamente BH3, y que se conocen como proteínas de muerte.²⁷ La proteína Bcl-2 es una molécula integral de membrana de 26 KD que ha sido localizada en la membrana externa de las mitocondrias, en el retículo endoplásmico liso y en la envoltura perinuclear, donde se ha sugerido que reprime a la apoptosis al regular el flujo de calcio.^{7,17,28-30}

Los miembros de la familia Bcl-2 promueven o inhiben la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos como ausencia de factores de crecimiento, secuestro de Apaf-1, o bien al obstruir la salida de citocromo C desde la mitocondria.²²

Los genes involucrados en la diferenciación y proliferación celular también son importantes reguladores del proceso apoptótico. Por ejemplo, el protooncogen *c-myc* y el supresor de tumores *p53*. El *c-myc*, es capaz de inducir apoptosis cuando se expresa aberrantemente,^{17,21,31} por lo que se infiere que normalmente funciona como inductor de proliferación celular.

El gen *p53* denominado *guardián del genoma* regula los componentes de las respuestas de control de lesión en el ADN. El supresor *p53* activa una serie de genes transcritos como *p21* (inhibidor del ciclo celular en G1), la proteína Gadd45 (que interviene en la reparación del ADN); Bax y Fas (inductores de apoptosis) y reprime la expresión de *bcl-2*.^{17,32} La detención del ciclo celular o la inducción de apoptosis dependerá en parte del estado de activación celular. La síntesis constante de *p53* por una lesión no reparada del ADN o la activación de *p53* después de una delección irreversible a la replicación, son factores que llevan a una célula a la apoptosis.^{17,21,33}

Fase efectora

En los últimos años la mitocondria ha recibido una atención especial por su participación en la fase efectora de la apoptosis. El interés se ha centrado alrededor de la apertura de canales o poros de transición mitocondrial y la liberación de diversos factores proapoptóticos, entre ellos el citocromo C. En la mayoría de los sistemas donde ocurre la apoptosis se observa, en la membrana mitocondrial, la formación de un canal de gran conductancia conocido como poro PT. Su estructura y composición no se conocen por completo, pero entre sus constituyentes se encuentran proteínas de la membrana interna como el traslocador de adenina nucleótido (ANT) y proteínas de la membrana externa como las porinas (canales aniónicos dependientes de voltaje o VDAC), que actúan en los sitios de contacto de la membrana interna y externa, creando un canal a través del cual pasan moléculas ≤ 1.5 Kda. La apertura de este canal provoca la desregulación de la mitocondria y la pérdida del potencial transmembranal (Ψ_m), debido a un aumento de la osmolaridad de la matriz, haciendo que ésta se expanda y eventualmente se rompa y libere proteínas activadoras de caspasas, localizadas en el espacio intramembranal hacia el citosol y el desacoplamiento de la cadena respiratoria, que se reconoce como una falla temprana de muerte, donde participan diversos factores como la vía de señalización de la ceramida. Los oxidantes y los aumentos patológicos de Ca^{2+} , citosólico pueden también inducir la ruptura de la membrana externa de la mitocondria.^{27,34}

Por otro lado, informes recientes sugieren que los cambios mitocondriales^{23,27} están bajo el control de los productos génicos de *bcl-2*. Se han establecido modelos con liposomas que llevan los canales VDAC, en los que se demuestra que las proteínas proapoptóticas Bax y Bak aceleran la apertura de los canales VDAC y permiten la salida de citocromo C, mientras que las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L cierran estos canales por unión directa con Bax y Bak.³² La explicación de ello, es que durante la interacción de VDAC con Bax y Bak ocurren cambios conformacionales, formando un megacanal que permite la salida del citocromo C,³¹ que al interactuar con Apaf 1 y procaspasa 9 forman el apoptosoma en los vertebrados, resultando en la activación de la caspasa 9 y posiblemente de la caspasa 3, y de esta manera iniciar la cascada proteolítica esencial para la apoptosis.²³⁻²⁵ Las mitocondrias de algunas células también liberan al factor inductor de apoptosis (AIF), otra proteína activadora de caspasas y la caspasa-3 durante la apoptosis.^{5,27} No obstante, algunos estudios demuestran que la liberación de citocromo C y la activación de las caspasas puede ocurrir antes de que se detecte la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria. Esto sugiere que hay mecanismos diferentes que regulan la permeabilidad de las membranas interna y externa mitocondriales.^{5,27,34}

El hecho de que el Bcl-2 se localice en la membrana mitocondrial ha permitido pensar que la función antiapoptótica de Bcl-2 podría relacionarse con el mantenimiento de la integridad de la membrana mitocondrial y, en un sentido más amplio, con la regulación de los procesos de tráfico intracelular. En este contexto, cabe destacar que la cooperación de Bcl-2 con c-myc inhibe la traslocación de *p53* desde el citoplasma al núcleo, durante la fase G0/G1 del ciclo celular, periodo en el que la célula es susceptible a la inducción de apoptosis.³³

También se ha demostrado que Bcl-2 y Abl inhiben la externalización de las fosfatidilserinas.³⁵⁻³⁷ Bcl-2 además participa en el reclutamiento de otras proteínas a la membrana mitocondrial, como Raf-1 (inductor del efecto supresor de Bcl-2) y Apaf-1 (activador de la caspasa 3).^{27,28} Por otro lado, se sabe que Bcl-2 inhibe no sólo a la apoptosis dependiente de la activación de las caspasas sino también a la inducida por agentes oxidantes y la necrosis causada por hipoxia.²⁷

Muchos de los eventos de la apoptosis se acompañan de cambios de gran importancia en el balan-

ce redox, como resultado de la oxidación del glutatión, el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la oxidación de algunos constituyentes celulares, incluyendo lípidos.^{1,5,38} Por lo que algunos autores han sugerido que el estrés oxidativo puede jugar un papel significativo como mediador de la apoptosis.³⁹ Los estudios realizados *in vitro*, utilizando generadores de radicales libres como el peróxido de hidrógeno,⁴⁰ T-butil hidroperóxido,⁴¹ radiaciones ultravioleta⁴² y el factor de necrosis tumoral^{18,43} en cultivos celulares han permitido demostrar que bajo condiciones de estrés oxidativo se induce apoptosis.⁴³ Mientras que la administración de antioxidantes como N-acetil cisteína,^{44,45} vitamina E⁴⁶ y la glutatión peroxidasa⁴⁴ inhiben la apoptosis. Por otro lado, los metales de transición como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} mediante la reacción de Fenton generan al radical más reactivo, el radical hidróxilo, el cual se ha comprobado como un inductor de apoptosis.⁴⁶ También se ha sugerido que el protooncogen Bcl-2, inhibe la muerte celular apoptótica a través de una vía antioxidante.^{44,45,47,48}

Fase de degradación

Esta fase es similar en todos los tipos celulares y está caracterizada por la participación de enzimas catabólicas como las endonucleasas y las caspasas, cuya actividad hidrolítica inicia una serie de alteraciones ultraestructurales en la célula.

Hace algunos años, la presencia de ruptura internucleosomal (180-200 pb) en las células apoptóticas hizo pensar que la fragmentación del ADN era una parte importante del mecanismo de muerte celular y que ocurría en una fase temprana del proceso apoptótico.⁵ De ahí que se estableciera como una marca distintiva de la apoptosis. Hoy en día se sabe que este evento, no ocurre en todas las células que mueren por apoptosis,⁴⁷ una digestión menos acentuada del ADN se observó en varias muestras celulares a las que se les indujo apoptosis.^{5,49} El análisis del ADN, en gradientes de densidad o electroforesis de pulso en gel ha demostrado que durante la apoptosis se generan inicialmente segmentos de 300 kb, los cuales posteriormente son degradados, aunque no en todas las células, en fragmentos de 10 a 50 kb. Finalmente se da la liberación de los oligonucleosomas (180-200 pb) característicos de la apoptosis.^{5,50}

La existencia de líneas celulares que presentan segmentación del ADN de alto peso molecular sin fragmentación de tamaño nucleosomal, sugiere que diferentes sistemas enzimáticos están involucrados en este proceso.^{12,50} Entre las DNAsas que generan fragmentos de ≥ 50 kb se encuentra la DNasa I, las ciclofilinas A, B, C, la Nuc 18, nucleasa que requiere únicamente de Mg^{2+} ^{5,14} y la endonucleasa dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} que genera fragmentos de doble cadena de ADN que al separarlos por electroforesis en gel de agarosa muestran un patrón característico con bandas de 185 a 200 pb o submúltiplos.^{2,11} No obstante, los estudios realizados con núcleos aislados confirman que ni los cambios morfológicos, ni la fragmentación del ADN dependen de la presencia de Ca^{2+} .⁵ Otros autores han propuesto que la nucleasa apoptótica está más relacionada con la DNasa I o DNasa II, de las cuales ninguna requiere Ca^{2+} , ya que los cambios morfológicos dependen estrictamente de la presencia de Mg^{2+} .⁵⁰

Los núcleos de timocitos y células B del bazo contienen grandes cantidades de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} , por lo que se ha propuesto que esta enzima se activa en presencia de glucocorticoides. Por el contrario, en otros tipos celulares que experimentan apoptosis, como la línea celular S49 que muestra la fragmentación internucleosomal clásica cuando se incubaba con dexametasona, no se detectan estas endonucleasas.^{51,52}

Las endonucleasas contenidas en el núcleo pueden ser activadas *in vitro* por diferentes estímulos como son: concentraciones altas de Ca^{2+} o Mg^{2+} , disminución del pH, proteasas como la tripsina, el factor mitocondrial inductor de apoptosis (AIF) y el factor de fragmentación del ADN (DFF).^{5,53} Uno de los problemas al proponer que el aumento de Ca^{2+} citosólico regula la activación de estas endonucleasas endógenas se debe a que requieren de Ca^{2+} a una concentración de 0.1-5 mM para su activación, niveles que nunca se alcanzarían bajo condiciones fisiológicas.¹⁵ Sin embargo, en algunos tipos celulares, durante la apoptosis temprana, hay una elevación sostenida de calcio ionizado citosólico,⁵⁴ que participa de manera importante en la activación de algunas enzimas latentes que contribuyen a los cambios estructurales durante la apoptosis, estas enzimas incluyen a la transglutaminasa que une a las proteínas cito-

sólicas,⁵⁵ y a la calpaína que puede degradar el citoesqueleto y producir cambios membranales.⁵⁶

Por lo tanto, es probable que las endonucleasas no sean la parte central del proceso apoptótico, sino que únicamente cumplan la función de limpieza después de la muerte, ya que su activación ocurre en estados tardíos del proceso apoptótico. Estudios *in situ* demuestran que los timocitos que presentan fragmentación del ADN están localizados dentro de otras células, lo que indica que el reconocimiento heterofágico de las células apoptóticas ocurre antes de que inicie la fragmentación del ADN.⁵

El estudio de la familia de las caspasas ha permitido comprobar su participación durante la fase de degradación de la apoptosis. No obstante que se ha demostrado que su activación no conduce a la degradación proteolítica indiscriminada en la célula muerta.⁵⁷ Una vez activadas, las caspasas rompen una gran variedad de polipéptidos intracelulares, que incluyen los elementos principales del núcleo y del citoplasma, fundamentales en mantener la estructura celular (β -actina, gelsolina y laminina A y B). Proteínas involucradas en el metabolismo y reparación del ADN como la poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), ADN-PK, ADN-topoisomerasa II, ARN polimerasa I y varias proteínas cinasas.^{17,23,58} Otro tipo de proteínas involucradas en las vías de transducción de señales como las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-16 y IL-18), proteínas que regulan el ciclo celular (p21/Cip1, p27/kpl). Además de las proteínas de la familia Bcl-2 involucradas directamente en la regulación de la apoptosis.⁵⁷ Dichas rupturas conducen a la interrupción de las vías de supervivencia y el desensamble de importantes componentes de la arquitectura celular, contribuyendo así a los cambios morfológicos y bioquímicos que caracterizan a la muerte celular apoptótica.²³⁻²⁵

Al parecer algunas caspasas se localizan en el citosol como la procaspasa 3 y la 9,⁵⁹ mientras que otras como la caspasa 1 se localizan en la membrana plasmática.⁶⁰ Hasta el momento no se conoce con precisión, como es que las caspasas acceden hasta el núcleo para digerir sustratos como las lamininas nucleares y otros sustratos ya mencionados.⁵⁸

Además de las caspasas, un gran número de diferentes proteasas participan en el proceso de apoptosis, entre ellas se incluyen las serina proteasas,

calpaínas y proteosomas, sin embargo su participación parece depender del tipo de estímulo y del tipo celular.⁶¹

Una parte crítica de la fase de degradación de la apoptosis es la presentación de los cambios en la superficie de las células que están muriendo, para su reconocimiento por los fagocitos.^{27,62} La naturaleza y cinética de estos cambios en la superficie celular aún son desconocidos.⁶³ Al respecto, existen evidencias que sugieren que la fosfatidilserina (FS), la cual normalmente está confinada a la cara interna de la membrana plasmática, presenta cambios dramáticos en su distribución durante la apoptosis.^{40,39,64,65} Estos cambios son detectados horas antes de que se pierda la integridad de la membrana y de que se observe la fragmentación del ADN. Los macrófagos y otras células fagocíticas reconocen a la fosfatidilserina que se encuentra expuesta en la superficie de las células apoptóticas como una señal para su fagocitosis, a través de un receptor específico, por lo que rápidamente son eliminadas.^{63,53} De esta manera se previene que los tejidos circundantes se expongan al contenido nocivo de la célula muerta.⁶³⁻⁶⁵

Además de la exposición en la superficie de FS, se han propuesto otros cambios en la superficie de las células apoptóticas, como son: la pérdida de

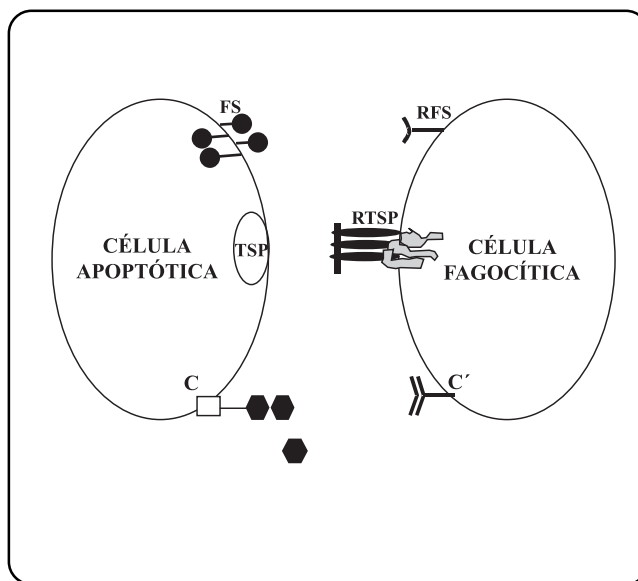


Figura 4. Mecanismos propuestos para el reconocimiento de células apoptóticas por las células que las fagocitarán. FS fosfatidilserina; RFS receptor de FS; TSP Trombospondina; RTSP receptor de TSP; C pérdida de ácido siálico y exposición de azúcares, C' lectina.

residuos de ácido siálico⁶² y la expresión de sitios de unión para trombospondina.^{66,67}

La falta de ácido siálico, que actúa como señuelo para los macrófagos, y que pudiera ser inhibida por lectinas del tipo de la N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina, involucra un tipo de interacción carbohidrato-lectina en este proceso.^{67,68} Sin embargo, no hay evidencias suficientes para decir que el ácido siálico y otros cambios de los carbohidratos puedan ser una señal específica de las células apoptóticas para su reconocimiento por los macrófagos.⁶³

Actualmente hay evidencias de que los macrófagos secretan una proteína llamada trombospondina (TSP), que regula la ingestión de la célula apoptótica.⁶⁹ No obstante que se desconoce el mecanismo que inicia los efectos de la TSP, se sugiere la participación de varios receptores de superficie celular, incluyendo lípidos sulfatados, proteoglicanos, integrinas ($\alpha_v \beta_3$ principalmente) y CD36.^{28,62,63,70}

Se ha propuesto que la TSP, forma un puente molecular entre la célula apoptótica y la superficie del macrófago uniéndose a través del complejo $\alpha_v \beta_3$ /CD36.^{63,70} (Figura 4) Esta estructura está involucrada

en el reconocimiento de los linfocitos, los timocitos, los eosinófilos y los neutrófilos, así como de otros tipos celulares que experimentan apoptosis, por fagocitos *semiprofesionales* como los fibroblastos.⁷⁰

Apoptosis y enfermedad

Diversas enfermedades están asociadas con la inapropiada regulación de la apoptosis (Cuadro III). Estas enfermedades pueden dividirse en dos grandes grupos: el que presenta aumento de la supervivencia celular (asociado con la inhibición de la apoptosis) y otro en el que hay un exceso de muerte celular (sobreactivación de la apoptosis).⁷¹

Las enfermedades en las que hay un aumento excesivo de células, incluyen al cáncer, infecciones virales¹⁴ y las enfermedades autoinmunes que permiten la persistencia de células B y T autorreactivas.^{1,72} El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) y los trastornos neurodegenerativos como Alzheimer son ejemplos de un exceso de apoptosis.¹⁴

Cuadro III. Enfermedades asociadas con la inducción e inhibición de la apoptosis^{10,13,14,72,73,75}

Inhibición de la apoptosis	Incremento de la apoptosis
Cáncer	Enfermedades neurodegenerativas:
Colorrectal	Alzheimer
Glioma	Parkinson
Linfoma folicular	Esclerosis lateral amiotrófica
Carcinomas con mutaciones de p53	Rinitis pigmentosa
	Epilepsia
Tumores dependientes de hormonas:	Sistema hematopoyético:
Cáncer de mama	Anemia aplásica
Cáncer de próstata	Linfocitopenia T CD4+
Cáncer de ovario	Deficiencia de G6PD (monocitos)
Enfermedades autoinmunes:	Daño a órganos:
Lupus eritematoso sistémico	Diabetes mellitus tipo 1
Miastenia gravis	Pancreatitis alcohólica
	Daño isquémico (miocardio, retina, cerebro, riñón)
Infecciones virales	Sida
Herpesvirus	
Poxvirus	
Adenovirus:	

Hoy en día se acepta a la apoptosis como un mecanismo clave en todas las facetas del cáncer, incluyendo hiperplasia, transformación neoplásica, expansión tumoral, neovascularización y metástasis.⁷³ Dado que en muchos tumores malignos la apoptosis está inhibida. Así mismo, el aumento en el número celular en el curso de las neoplasias se debe al incremento en la tasa mitótica y a una disminución en la tasa de delección celular.⁷⁴ La mayoría de las células malignas muestran cambios en la expresión, mutación o delección de oncogenes y antioncogenes como: *bcl-2*, *p53*, *c-myc* o *ras*. Otras, en el ligando de Fas y en los receptores TNF, o bien cambios en la actividad de las caspasas, lo que modifica el programa genético de muerte.^{74,75} Los tratamientos de las neoplasias malignas (quimioterapia, radiación y terapia adyuvante), tienen el propósito de destruir a las células en proliferación por intervención directa o indirecta del ciclo celular. Hace algunos años se dio a conocer que estas estrategias terapéuticas además de su acción nociva sobre las células en proliferación, también inducen apoptosis, tanto en las células malignas como en las normales. Cabe mencionar que los tumores malignos responden de forma diferente a estas terapias y eventualmente todos los tumores avanzados se vuelven refractarios a su actividad citotóxica.⁷³ En el caso de los tumores malignos tratados con diferentes agentes quimioterapéuticos, se hacen resistentes al tratamiento y adquieren un fenotipo llamado MDR por sus siglas en inglés (*multidrug resistance*). Esta capacidad ha sido relacionada con la expresión de dos genes, *mdr-1* y *mdr-2*, que codifican para la proteína p170, que actúa como una bomba de flujo dependiente de ATP y mantiene a la droga fuera del espacio intracelular.⁷⁵ La resistencia al tratamiento de las células malignas se ha relacionado con su capacidad para evadir la apoptosis. Esto explicaría por qué algunos genes inhibidores de la apoptosis, principalmente *bcl-2* y la forma mutada de *p53*, cuando se sobreexpresan pueden conferir el fenotipo MDR.⁷⁶ Por ello, la determinación de Bcl-2 y de p53 en las células tumorales puede ayudar a predecir la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, los niveles altos de la proteína Bcl-2 en células leucémicas indican una tasa baja de remisión y de sobrevivencia de los pacientes con leucemia mieloide. Sin embargo, la capacidad de Bcl-2 para

inhibir la apoptosis por agentes quimioterapéuticos varía de acuerdo al tipo celular. La transfección de Bcl-2 a fibroblastos y a células linfoides otorga resistencia al etopósido (inhibidor del ciclo celular), esto no ocurre cuando Bcl-2 es transfectado a una línea celular de cáncer de pulmón.⁷⁷ Un mejor pronóstico puede ser la presencia de p53 nativa, no así de la forma mutada que se encuentra principalmente en los tumores más agresivos con una respuesta muy pobre al tratamiento.⁷⁸ Por ello la presencia de p53 mutada ha sido descrita en numerosos tumores humanos.^{22,73,79,80} El sistema Fas/FasL también ha sido propuesto como responsable del escape de las células tumorales al ataque del sistema inmune. Un aumento en la expresión constitutiva del ligando de Fas se ha demostrado en diferentes tumores y se ha sugerido que tales tumores pueden eliminar a los linfocitos que expresan Fas por apoptosis.^{73,75} Por ello, el estudio de los agentes, genes y mecanismos que participan en la apoptosis y su regulación es una línea de investigación de gran interés. Cabe pensar que la activación específica de las rutas de inducción de apoptosis sin necesidad de utilizar compuestos que dañen el ADN, que actúen en etapas del proceso posteriores a la intervención de p53 tendrían la ventaja de ser eficaces en células con el gen p53 mutado, como ocurre en la mayoría de las células cancerosas.

Uno de los procesos más importantes durante el desarrollo inmune, es la remoción de los linfocitos autorreactivos a través de la apoptosis. Sin este proceso de selección negativa, la formación de una miríada de receptores antigénicos en los linfocitos puede generar un estado de autoinmunidad.^{77,78} En los modelos animales de enfermedades autoinmunes se han identificado genes involucrados en el control de la apoptosis, incluyendo Fas y FasL.⁷³ Los ratones con lupus eritematoso sistémico, presentan mutaciones en el gen *ipr* que codifica para la proteína Fas. También se ha observado que las mutaciones en el gen *gld* que codifica para el ligando de Fas (Fas-L) dan como resultado un síndrome semejante al lupus.²² Además, en los pacientes que padecen esta enfermedad, se encuentran niveles más altos de Bcl-2 que los normales, lo que podría disminuir la apoptosis de las células T autorreactivas. Se ha sugerido que la apoptosis anormal (fagocitosis y destrucción) de los linfocitos en esta enfermedad puede proveer

una fuente de antígenos nucleares extracelulares que conduzcan a la producción de autoanticuerpos, lo que quizá contribuya al inicio y progreso de la enfermedad.⁷³ Es interesante mencionar que las drogas empleadas en los tratamientos de las enfermedades autoinmunes como: glucocorticoides, azatioprina, ciclofosfamida y metotrexato, tienen la propiedad de inducir apoptosis, lo que probablemente contribuye a su efecto terapéutico.^{14,73}

En contraste con las enfermedades sistémicas autoinmunes que se caracterizan por la estimulación de linfocitos B que llevan a la formación de anticuerpos y al daño a tejidos mediante complejos autoinmunes, las enfermedades que deterioran a órganos específicos, se caracterizan por la agresión contra linfocitos T en células específicas dentro de los órganos. Tal es el caso de la Diabetes tipo I (insulino dependiente), que resulta de la destrucción masiva de las células β pancreáticas productoras de insulina.⁷³ La mayoría de los conocimientos acerca de la diabetes tipo I se ha obtenido de los estudios realizados en ratones diabéticos no obesos (NOD), donde el progreso de la enfermedad está regulado por la infiltración leucocitaria en los islotes de Langerhans y la destrucción de las células β por linfocitos T. En este mismo modelo experimental, los ratones que exhiben la mutación *ipr* no desarrollan la enfermedad, aun cuando se les transfirieron esplenocitos de ratones diabéticos, lo que sugiere que el sistema Fas/FasL tiene un papel efector clave en la patogénesis de la diabetes tipo I.^{22,73}

La apoptosis como resultado de las infecciones virales considera, al menos en parte, responsable de las patologías asociadas con este tipo de infecciones. Por lo general, los virus poseen mecanismos para bloquear la apoptosis prematura de las células infectadas, propiciando establecer y mantener la infección, o bien prolongar la vida de las células infectadas líticamente, de modo que se asegure la máxima replicación viral. Por ejemplo, el establecimiento de una infección efectiva por adenovirus depende de la función de la proteína E1B19K, un homólogo viral de la proteína antiapoptótica Bcl-2.^{72,73} Además, estas estrategias virales antiapoptóticas pueden también contribuir a la patogénesis de la infección viral y en situaciones extremas, promover la capacidad oncogénica de ciertos virus.⁷²

Los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) presentan una disminución de las células T cooperadoras CD4+ y una destrucción del sistema inmune que conduce al desarrollo del sida.⁸¹ Los estados tempranos de la enfermedad están caracterizados por una severa desregulación del sistema inmune, que afecta el número y la funcionalidad de las células T CD4+ y CD8+. Originalmente se creyó que los efectos citolíticos del virus eran los responsables de la pérdida de las células T. Sin embargo, este hecho no afecta la disminución de otros tipos celulares en los individuos infectados con sida. Se ha observado que estos pacientes presentan un aumento en los niveles séricos de las citocinas que promueven la muerte celular apoptótica como TNF α , IFN γ e IL-10, y una disminución de la interleucina 12 que previene la muerte, lo que pudiera promover la susceptibilidad de las células T a la apoptosis. Además de que TNF α e IFN γ favorecen la expresión de Fas y de su ligando en las células T CD4+ y CD8+, esto apoya la idea de la participación del sistema Fas/FasL en la depleción de los linfocitos T CD4+ en el sida. Por otro lado, los individuos infectados con el virus del sida presentan niveles bajos de glutatión reducido y de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso lo que conduce a estrés oxidativo, por la acumulación de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo aumenta la expresión del ligando de Fas y por lo tanto la tasa de apoptosis.^{81,82}

Durante el desarrollo neuronal temprano normalmente ocurre la apoptosis con la posibilidad de ser iniciada nuevamente durante el envejecimiento por diversos estímulos, al promover la exclusión de un número significativo de neuronas.^{24,83} En condiciones fisiológicas, la supervivencia neuronal y la apoptosis son controladas principalmente por dos tipos de receptores de superficie celular que responden a señales extracelulares, las moléculas Trk (familia de receptores de tirosinas cinasas) y p75 (receptor de neurotrofinas), ambos comprometidos en la supervivencia neuronal, diferenciación e implicados en la apoptosis neuronal respectivamente.

Estos estímulos son transmitidos a través de vías intracelulares que finalmente son procesadas por dos grupos de genes, los proapoptóticos que codifican para el grupo de proteínas de las caspasas y los antiapoptóticos como Bcl2 y Bcl-_{xL}.^{73,74} Un

ejemplo de las alteraciones neurodegenerativas es la enfermedad de Alzheimer, que se presenta en individuos mayores de 65 años con una incidencia de 12%, este porcentaje se incrementa hasta 45% en personas de 85 años. La enfermedad se caracteriza por pérdida de la memoria y alteraciones de la personalidad. El menoscabo de las funciones cerebrales estriba en la interrupción de las sinapsis y en la ausencia de las neuronas que realizan las sinapsis.^{83,84} Las últimas investigaciones sugieren que la pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer, al menos en parte, es causada por mecanismos apoptóticos. Se ha propuesto que los estímulos apoptóticos iniciales dañan o destruyen los procesos neurales (neuritis) por iniciación local de la muerte. Dichos eventos desconectan los circuitos neurales y colocan a las neuronas en riesgo apoptótico, ocasionado por la pérdida de factores tróficos, y a otros procesos que contribuyen al mantenimiento de las funciones neuronales. La acumulación del péptido β -amiloide ha sido involucrada como factor causal de la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer.²² Se ha demostrado que el péptido β -amiloide induce apoptosis neuronal en cultivo y que puede ser un sustrato para las caspasas.⁸⁰ Además los depósitos insolubles del péptido β -amiloide inducen estrés oxidativo (principalmente lipoperoxidación), alteraciones de las funciones mitocondriales, lo que modifica el metabolismo energético y la homeostasis iónica (calcio) al alterar el funcionamiento de la ATPasa y de los transportadores de glucosa y glutamato; aumentando la susceptibilidad de las neuronas a la muerte por apoptosis.^{74,84} Por otro lado, se sabe que las proteínas p53 y p21 promotoras de apoptosis inhiben la producción de la proteína presenilina I (PSI), sugiriendo que las presenilinas tienen propiedades antiapoptóticas. Las presenilinas constituyen también un sustrato para las caspasas, lo que conduce a la pérdida de sus propiedades antiapoptóticas.⁸⁴ Probablemente, el péptido β -amiloide es el agente causal de la enfermedad de Alzheimer, donde las mutaciones de las presenilinas junto con la activación de las caspasas neuronales actúan para incrementar los niveles patológicos de este péptido, lo que quizá propicie un incremento en el grado de destrucción apoptótica de las neuronas.^{24,73,84}

Conclusiones

Se ha comprobado —con base en la revisión de las características más relevantes de los mecanismos apoptóticos que participan en la enfermedad— que la muerte celular apoptótica es una estrategia esencial para proteger el equilibrio homeostático de los sistemas vivos.

En la apoptosis la célula ejecuta un programa genético de muerte, donde los estímulos o señales que inician el proceso conducen a la activación de una vía común con cambios bioquímicos y morfológicos similares en todos los tipos celulares.

Durante el proceso de apoptosis ocurren cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, favorecidos por la apertura de canales llamados PT, aumento de iones de Ca^{2+} , radicales libres, caspasas y proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2. Los cambios en la permeabilidad mitocondrial permiten la liberación de proteínas apoptogénicas (citocromo C, AIF) que normalmente se encuentran recluidas en el espacio intramembranal. Estos factores inician una cascada de eventos que determinan los cambios típicos que acompañan a la apoptosis. Sin duda, la profundización en el conocimiento de los mecanismos reguladores que favorecen o impiden la apoptosis, redundará en una mejor elección de las estrategias para el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por la hiperapoptosis, tales como: sida, enfermedades autoinmunes o enfermedades degenerativas del sistema nervioso central y en aquéllas en las que no hay una eliminación adecuada de células, como el cáncer.

Agradecimientos

Al apoyo en la corrección de este escrito de Trinidad Martínez Matías, adscrita a la Coordinación de Educación Médica del IMSS.

Referencias

1. **Samali A, Gorman AM, Cotter TG.** Apoptosis the story so far. *Experientia* 1996;52:933-941.
2. **Arends JM, Morris GR, Wyllie AH.** The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.

3. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
4. **Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D.** Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;144:67-77.
5. **Penninger MJ, Kroemer G.** Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. *Adv Immunol* 1998;68: 51-144.
6. **Vaux DL.** Toward understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:786-789.
7. **Wyllie AH.** Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997;53:451-465.
8. **Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C.** Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 1994;153:3218-3227.
9. **Keiss W, Gallaher B.** Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1988;138:482-491.
10. **Carson DA, Ribeiro JM.** Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-1254.
11. **Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-556.
12. **Cohen GM, Sun Xiao-Ming, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter N.** Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 1992;286:331-334.
13. **Savill J.** Apoptosis in disease. *Eur J Clin Invest* 1994;24:715-723.
14. **Thatte U, Dahanukar S.** Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs* 1997;54:511-532.
15. **Schwartzman AR, Cidlowski AJ.** Apoptosis: the biochemistry and biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1993;14:133-151.
16. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1302-1308.
17. **Merino JJ, Cordero-Campaña MI.** Bases moleculares del proceso de muerte celular programada: implicaciones de la proteína p53 y otras proteínas en el control del ciclo celular. *Mecanismos de acción. Revisión. Invest Clin* 1998;39:323-358.
18. **Wong GHW, Gaddel D.** Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *J Immunol* 1994;152:1751-1755.
19. **Wissin D, Mouritzen H, Jäättela M.** TNF-induced mitochondrial changes and activation of apoptotic proteases are inhibited by A20. *Free Radic Biol Med* 1998;25:57-65.
20. **Raff MC.** Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.
21. **Osborne AB, Schwartz ML.** Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol* 1994;4:394-22.
22. **Hetts WS.** To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998;279:300-307.
23. **Cohen MG.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
24. **Gorman MA, Orrenius S, Ceccatelli S.** Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuro Report* 1998;9:R49-R55.
25. **Thornberry AN, Lazebnik Y.** Caspases: Enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
26. **Allsopp TE, Wyatt S, Peterson HF, Davies AM.** The protooncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993;73: 295-307.
27. **Adams MJ, Cory S.** The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1325.
28. **Green RD, Reed CJ.** Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
29. **Jacobson MD, Burne JF, King MP, Migashita T, Reed JC, Raff MC.** Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993. p. 361-368.
30. **Reed JC.** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
31. **Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS.** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992;69:119-128,399.
32. **Núñez G, Clarke FM.** The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994;4:399-403.
33. **Ryan JJ, Prochownick E, Gottlieb C, Apel IJ, Merino R, Núñez G, et al.** C-myc and Bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5878-5882.
34. **Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lissa F.** Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999;264:687-701.
35. **Martin SJ, Reutelingsperger PMC, McGahon JA, Rader AJ, Van-Schie AAC, LaFace MD, Green RD.** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-1556.
36. **McGahon AJ, Cotter TG, Green DR.** The Abl oncogene family and apoptosis. *Cell Death Diff* 1994;1:77-83.
37. **Flora PK, Gregory CD.** Recognition of apoptotic cells by human macrophages: inhibition by a monocyte/macrophages-specific monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1994;24:2625-2632.
38. **Higuchi Y, Matsukawa S.** Glutathione depletion induces giant DNA and High-molecular-weight DNA fragmentation associate with apoptosis through lipid peroxidation and protein kinase activation in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys* 1999;363:33-42.
39. **Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG.** Dose dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991;24:203-214.
40. **Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y.** Bcl-family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome C by the mitochondrial channel VDAC. *Lett Nature* 1999;399:483-487.
41. **Zhong LT, Sarafian T, Kane DF, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE.** Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:4533-4537.
42. **Larrick JW, Wright SC.** Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor α . *FASEB J* 1990;4:3215-3223.

43. **Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.
44. **Sandstrom PA, Tebbey PW, Van Cleave S, Buttke TM.** Lipid hydrogen peroxides induce apoptosis in T cells displaying and HIV-associated glutathione peroxidases deficiency. *J Biol Biochem* 1994;269:798-801.
45. **Clutton S.** The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:662-668.
46. **Wolfe JT, Ross D, Cohen GM.** A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes. *FEBS Letter* 1994;352:58-62.
47. **Tomei LD, Shapiro JP, Cope FO.** Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:853-857.
48. **Koremeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, Linnete GP.** Reactive oxygen species and regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta* 1995;127:63-66.
49. **Oberhammer AF, Hochegger K, Frösch G, Tienfenbacher R, Pavelka M.** Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol* 1994;126:827-837.
50. **Walker PR, Kokileva L, LeBlanc J, Sikorska M.** Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *BioTechniques* 1993;15:1032-1040.
51. **Lazebnik AY, Cole S, Cooke CA, Nelson GW, Earnshaw CW.** Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: A model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 1993;123:7-22.
52. **Cohen JJ.** Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 1991;50:55-83.
53. **Shiratsuchi A, Osada S, Kanazawa S, Nakanishi Y.** Essential role phosphatidylserine externalization in apoptosing cell phagocytosis by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:549-555.
54. **Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P.** Role of Ca^{+2} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci*, 1989;10:281-285.
55. **Knight CRL, Rees RC, Griffin M.** Apoptosis: a potential role for cytosolic transglutininase and its importance in tumor progression. *Biochem Biophys Acta* 1991;1096:312-318.
56. **Squier MKT, Miller HJJ.** Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994;159:229-237.
57. **Rathmell CJ, Thompson BC.** The central effectors of cell death in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1999;17:781-828.
58. **Earnshaw CW, Martins ML, Kaufmann HS.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
59. **Duan HJ, Chinnaiya AM, Hudson PL, Wing JP, He WW, Dixit VM.** ICE-LAP3 a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein. Ced-3 is activated during FAS and tumor necrosis factor induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:1621-1625.
60. **Singer II, Scotts S, Chin J, Baney EK, Iimjuko G, Miller DK, Chapman K, Kostura MJ.** The interleukin 1- β converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. *J Exp Med* 1995;182:1447-1459.
61. **Leist M, Single B, Castoldi FA, Kuhnle S, Nicotera P.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997;185:1481-1486.
62. **Savill JS, Henson PM, Haslett C.** Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest* 1989; 84:1518-1527.
63. **Savill JS, Fadok V, Henson P, Haslett C.** Phagocyte recognition of cell undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:131-136.
64. **Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM.** Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149:4029-4035.
65. **Fadok VA, Laszlo DJ, Noble PW, Weinstein DWH, Riches, Henson PM.** Particle digestibility is required for induction of phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cell. *J Immunol* 1993;151:4274-4285.
66. **Prahan D, Krahling S, Williamson P, Schleger RA.** Multiple systems for recognition of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Mol Biol Cell* 1997;8:767-778.
67. **Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E.** A 125/115 kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the Arg-Gly-Asp adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;82:5766.
68. **Morris EG, Morris RG, Hargreaves AD, Duval E, Wyllie AH.** Hormone-induced death. 11. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Pathol* 1984;115: 426-431.
69. **Savill JS, Hogg N, Ran Y, Haslett C.** Thrombospondin cooperate with CD36 and vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 1992;90:1513-1529.
70. **Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C.** Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblast with participation of fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose specific lectin. *J Immunol* 1994;153:3218-3227.
71. **Arends JM, Wyllie AH.** Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991;32:223-254.
72. **Young SL, Dawson WC, Eliopoulos GA.** Virus and apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:509-521.
73. **Fadeel B, Orrenius S, Zhivitovsk B.** Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:699-714.
74. **Strasser A, Vaux DL.** The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93:2239-2244.
75. **Benítez-Bribiesca L.** Assessment of apoptosis in tumor growth: importance in clinical oncology and cancer

- therapy. En: When Cells Die. Lockshin AR, Zakeri Z and Tilly LJ (Eds.) Wiley-Liss Publication. Edition New York, 1998. p. 453-482.
76. **Miyashita T, Reed JC.** Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in human leukemia cell line. *Blood* 1993;81:151-157.
 77. **López-Hoyos M, Carrió R, Merino J, Merino R.** Regulación de la apoptosis en linfocitos B y T por los genes Bcl-2 y Bcl-x. *Rev Esp Reumatol* 1998;25:63-73.
 78. **Levine AJ.** p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331.
 79. **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC.** p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
 80. **Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A.** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992;356:215-221.
 81. **Finkel HT, Casella RC.** AIDS and cell death en When Cells Die. En: When Cells Die. Lockshin AR, Zakeri Z and Tilly LJ (Eds.) Wiley-Liss Publication. Edition New York 1998. p. 289-318.
 82. **Orrenius S.** Apoptosis: molecular mechanism and implications for human disease. *J Int Med* 1995;237:529-536.
 83. **Tapia R, Pasantes H, Massieu L, Arias C.** Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración. *Gac Med Mex* 1998;134:685-703.
 84. **Cotman WC, Cribbs HD, Pike JC, Ivins JK.** Cell death in Alzheimer's disease en When Cells Die. En: When Cells Die. Lockshin AR, Zakeri Z and Tilly LJ (Eds.) Wiley-Liss Publication. Edición New York 1998. p. 385-409.

