

## Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares

LINA VANESSA BECERRA, MD\*, HERNÁN JOSÉ PIMIENTA, MSc\*

### RESUMEN

La muerte celular programada es un evento fisiológico durante el desarrollo. En el encéfalo y la médula espinal, este proceso determina el número y la localización de los diferentes tipos celulares. En el sistema nervioso del adulto, la muerte celular programada o apoptosis está más restringida, pero puede jugar un papel determinante en enfermedades crónicas o agudas. Al contrario de otros tejidos en los cuales la apoptosis está documentada ampliamente desde el punto de vista morfológico, en el sistema nervioso central la evidencia en este sentido es escasa. A pesar de esto, existe consenso acerca de la activación de diferentes sistemas de señalización apoptótica. En el presente artículo se intenta resumir las principales vías de señalización apoptótica identificadas en el tejido nervioso. Considerando que las vías apoptóticas son múltiples, los tipos neuronales diversos y especializados y que la respuesta neuronal a la lesión y la supervivencia dependen del contexto de la célula en el tejido (preservación de la conectividad, integridad glial y matriz extracelular, flujo sanguíneo y disponibilidad de factores tróficos), lo que es relevante en el proceso apoptótico en un sector del cerebro puede no serlo en otro.

*Palabras clave:* Bcl2; Anoikis; Caspasas; Enfermedades neurodegenerativas; Trauma; Isquemia.

*Neuronal apoptosis: signal and cell diversity*

### SUMMARY

Programmed cell death occurs as a physiological process during development. In the brain and spinal cord this event determines the number and location of the different cell types. In adulthood, programmed cell death or apoptosis is more restricted but it may play a major role in different acute and chronic pathological entities. However, in contrast to other tissues where apoptosis has been widely documented from a morphological point of view, in the central nervous system complete anatomical evidence of apoptosis is scanty. In spite of this there is consensus about the activation of different signal systems associated to programmed cell death. In the present article we attempt to summarize the main apoptotic pathways so far identified in the nervous tissue. Considering that apoptotic pathways are multiple, the neuronal cell types are highly diverse and specialized and that neuronal response to injury and survival depends upon tissue context, (i.e., preservation of connectivity, glial integrity and cell matrix, blood supply and trophic factors availability) what is relevant for the apoptotic process in a sector of the brain may not be important in another.

*Keyword:* Bcl2; Anoikis; Caspases; Neurodegenerative diseases; Traumatic injury; Ischemia.

La muerte celular programada o apoptosis se presenta a lo largo de la vida del individuo y en todos los órganos. Sin embargo, la mayor cantidad de información sobre los mecanismos apoptóticos se deriva de estudios en el desarrollo, período en el cual, la apoptosis es un fenómeno natural, indispensable para la organogénesis y maduración de los diferentes sistemas<sup>1</sup>. La resultante final de la apoptosis del desarrollo es lograr el número «ideal» de células. Este equilibrio en el caso del sistema

nervioso, es fundamental por el acople e interacción que debe darse entre los compartimentos vascular, glial y neuronal. Adicionalmente, la diversidad de fenotipos neuronales debe mantenerse en equilibrio de tal manera que el balance inhibición-excitación-modulación garantice la actividad normal del sistema. En el sistema nervioso del adulto, pueden inducir apoptosis diversos factores externos como isquemia, trauma, infecciones, etc.

\* Centro de Estudios Cerebrales, Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.  
e-mail: monarcasr@hotmail.com hernpim@yahoo.com  
Recibido para publicación enero 9, 2009 Aceptado para publicación enero 15, 2009

Al contrario de la necrosis, proceso donde hay depleción súbita de energía con ruptura de la membrana celular, la cual implica liberación de enzimas proteolíticas intracelulares a la matriz y por ende compromiso del tejido circundante, la apoptosis se caracteriza por la remoción ordenada y eficiente de células con preservación de las membranas a lo largo de todo el proceso, el cual finaliza con la formación de cuerpos apoptóticos que pueden posteriormente ser fagocitados. Durante el proceso apoptótico se debe mantener el suministro energético. Se acepta que una célula que inicie un proceso apoptótico y cuya reserva de energía se agote, puede desviarse hacia necrosis. En cualquier caso necrosis y apoptosis se deben considerar como los extremos de un continuum, que enmarcan una variedad de fenotipos de muerte<sup>2</sup>. En el sistema nervioso tanto la apoptosis como la necrosis pueden coexistir en un mismo sector, lo cual dificulta determinar el tipo de muerte. Aunque existen algunos indicadores moleculares de apoptosis, el criterio morfológico prevalece, incluyendo características como condensación citoplasmática y de cromatina, fragmentación internucleosomal del ADN, vacuolización de la membrana plasmática, encojimiento celular y formación de cuerpos apoptóticos.

Son diversos los factores que promueven cascadas apoptóticas; algunos predominan en el desarrollo como la privación de factores tróficos, entre los cuales se conocen BDNF (factor neurotrófico derivado del encéfalo), NGF (factor de crecimiento neural), NT4 (neurotrofina 4), etc<sup>3</sup>. Sin embargo, la ausencia o privación de estos factores se considera que también pueden jugar un papel importante en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer. Los procesos apoptóticos en neuronas diferenciadas se pueden activar por eventos como hipoxia-isquemia, trauma, intoxicación o infecciones. Los estímulos precedentes generan apoptosis en el endotelio vascular, en las células gliales y en las neuronas y bajo una misma condición puede predominar uno u otro factor o agregarse nuevos, p.e., en el caso de trauma, la lesión axonal puede concurrir con procesos excitotóxicos, inflamatorios y daño de la matriz extracelular. Por la diversidad estructural y de la conectividad en un mismo escenario tisular se presentan múltiples alternativas espaciales y temporales de respuesta a la lesión.

En la actualidad existe abundante información relacionada con las cascadas proapoptóticas y antiapoptóticas. Aunque el panorama no se considera completo

todavía, es claro que las cascadas de señalización apoptótica son múltiples e interconectadas al igual que los estímulos que las desencadenan, lo cual garantiza que el proceso sea eficiente pero al mismo tiempo dificulta las posibilidades de intervención terapéutica.

A continuación se revisarán algunas de las vías apoptóticas identificadas en el sistema nervioso, señalando que esta información se deriva de estudios en modelos de isquemia, trauma y algunas evidencias en enfermedades neurodegenerativas.

## VÍAS INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA

Clásicamente se han determinado dos vías apoptóticas, ambas demostradas en células nerviosas: la vía intrínseca o mitocondrial que como su nombre lo indica tiene como eje la disfunción mitocondrial y la vía extrínseca o desencadenada por la activación de receptores de muerte localizados en la membrana celular.

Se revisará inicialmente la vía intrínseca. La pérdida de la homeostasis intracelular manifestada en cambios en el pH, alteración del citoesqueleto, incremento en las concentraciones de calcio, estrés oxidativo, entre otros, pueden alterar las propiedades de la membrana mitocondrial con incremento de su permeabilidad y la consecuente liberación de tres elementos que pueden desencadenar cascadas apoptóticas: citocromo C, Smac/DIABLO (activador secundario mitocondrial de caspasas/proteína de unión a IAP -proteínas inhibitoras de apoptosis- con bajo punto isoeléctrico) y AIF (factor inductor de apoptosis). La citocromo C es una proteína que normalmente participa en los procesos de fosforilación oxidativa y producción de ATP, a través del transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. La alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial por las condiciones señaladas antes permite la liberación de la citocromo C al citoplasma, donde su función cambia radicalmente, interactuando con el dominio WD40 presente en la proteína Apaf-1 y con la procaspasa 9, conformando con estas dos proteínas un complejo denominado apoptosoma<sup>4</sup>, proceso que requiere la presencia de ATP y marca el inicio de una cascada apoptótica, a través de la activación de la caspasa 9. La caspasa 9 que funciona como una caspasa iniciadora, activa a su vez a las caspasas 3, 6 ó 7, que son caspasas efectoras, para que éstas actúen sobre sus blancos. El papel de Smac/DIABLO en la

mitocondria es poco conocido. Se sabe que una vez liberado, Smac/DIABLO inhibe a las IAP que a su vez, en condiciones naturales están inhibiendo formas precursoras de caspasas iniciadoras como la 9 y ejecutoras como la 3. La resultante de esta desinhibición es la generación de un ambiente proapoptótico que puede actuar en paralelo con la ruta desencadenada por la citocromo C. AIF es una proteína que se ha propuesto como barredora de radicales libres y participa en reacciones de óxido reducción a nivel mitocondrial. Bajo condiciones de estrés, es liberada desde la mitocondria y se transfiere al núcleo celular, donde ocasiona fragmentación internucleosomal del ADN<sup>5</sup>. Debe señalarse que esta ruta no requiere de la participación de las caspasas tanto iniciadoras como ejecutoras. Está por determinarse si las rutas iniciadas por Smac/DIABLO, AIF o citocromo C coexisten en una misma célula o si se desencadenan por un mismo estímulo. Esto es fundamental porque las estrategias terapéuticas pueden variar considerablemente.

La vía extrínseca de la apoptosis requiere de la estimulación de receptores de muerte localizados en la membrana celular. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, cuyos principales miembros son TNFR1 (receptor del factor de necrosis tumoral 1), Fas (conocido como Apo-1 o CD95), DR3 (receptor de muerte 3 o Apo-3), DR4 (receptor de muerte 4), DR5 (también conocido como Apo-2) y DR6, todos hasta el presente demostrados en células nerviosas.

Cada uno de estos receptores cuenta con uno o varios ligandos para su activación, por ejemplo, Fas L es el ligando de Fas, el TNF puede activar su respectivo receptor (TNFR1), el ligando TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral alfa) puede activar los receptores de muerte 4 y 5, etc.<sup>2</sup> Las cascadas de la vía extrínseca se caracterizan por la activación de los receptores y la acción de dominios de muerte intracelulares de los mismos, los cuales se asocian con proteínas que también cuentan con dominios de muerte denominadas proteínas adaptadoras encargadas de reclutar y activar caspasas iniciadoras, que en este caso corresponden a las caspasas 2, 8 y 10. A su vez, estas caspasas iniciadoras actúan sobre caspasas efectoras (3, 6 ó 7) y éstas sobre sus respectivos blancos, principalmente citoesqueleto y ADN.

## CASPASAS

Existen dos familias de proteínas que participan en la gran mayoría de los fenómenos apoptóticos: las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2. Las caspasas son proteasas (proteasas aspartato-cisteína dependientes) que se sintetizan como proenzimas o formas precursoras llamadas procaspasas, las cuales se activan al partirlas en los residuos críticos de aspartato. Las procaspasas contienen un dominio proteasa y un prodominio NH<sub>2</sub> terminal. El dominio proteasa está formado por dos subunidades, una de 20KDa y otra de 10KDa, que se asocian para formar un heterodímero después del corte. Dos de estos heterodímeros se asocian y forman un tetrámero que es la forma activa de las caspasas. Hasta el momento se han identificado 14 miembros de la familia de las caspasas, reconociéndose tres categorías funcionales: caspasas iniciadoras, efectoras e inflamatorias<sup>6</sup>. Las iniciadoras, como su nombre lo indica, participan en los pasos iniciales de las cascadas apoptóticas. En esta categoría se incluyen las caspasas 2, 8 y 10 en la vía extrínseca y la caspasa 9 en la vía intrínseca. Se activan por diferentes rutas, p.e., el complejo citocromo C y Apaf-1 pueden activar la procaspasa 9. Como ya mencionamos, Smac/DIABLO, puede liberar a las procaspasas de la influencia inhibidora de las IAP, como XIAP (proteína inhibidora de apoptosis ligada al X), CIAP1 (proteína inhibidora de apoptosis celular 1), CIAP2 (proteína inhibidora de apoptosis celular 2) y NIAP (proteína inhibidora de apoptosis neuronal), para que sean activadas por auto catálisis. La caspasa 8 se activa a través de su unión con proteínas adaptadoras que le permiten formar complejos con los receptores de muerte.

Las glías y las neuronas pueden producir citoquinas proinflamatorias bajo el efecto de las caspasas inflamatorias como la 1, 4, 5, 11, 12, 13 y la 14. Hay que tener en la cuenta que la activación de caspasas inflamatorias de manera indirecta puede promover la activación de rutas de muerte apoptótica. Por ejemplo, el TNF al ser inducido por caspasas proinflamatorias puede activar receptores de muerte en células vecinas y desencadenar apoptosis a través de la ruta extrínseca. En el contexto del trauma o la isquemia, elementos de la línea inmune que invaden el tejido nervioso también producen citoquinas proinflamatorias, amplificando el daño. Las caspasas efectoras 3, 6 y 7 son comunes a las

diferentes rutas apoptóticas, estas actúan directamente ocasionando daño sobre sus blancos: citoesqueleto tanto citoplasmático como nuclear, ADN y proteínas asociadas, proteínas del ciclo celular, proteínas de reparación y mantenimiento celular y finalmente actuando sobre la membrana plasmática y el sistema de endomembranas generando vacuolización. La participación de las caspasas efectoras en la mayoría de las cascadas de muerte da cuenta de las características morfológicas comunes a los diferentes procesos apoptóticos independientemente del estímulo inicial.

## FAMILIA BCL-2

La familia de proteínas Bcl-2 incluye tanto miembros inductores como inhibidores de apoptosis<sup>7</sup>. Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer dominios homólogos a Bcl-2 (nombre del primer miembro descubierto, de linfoma de células B) conocidos como dominios BH (Bcl-2 homólogos), los cuales se enumeran del 1 al 4. Según la presencia de estos dominios, estas proteínas se dividen en tres subfamilias: una con miembros de función antiapoptótica denominada subfamilia Bcl-2 que incluye a los miembros Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 y A1, todos con los cuatro dominios BH, y dos subfamilias de miembros proapoptóticos: la subfamilia Bax que incluyen a Bax, Bok y Bak con tres dominios BH y la subfamilia BH3 que incluye a Bim, Bid, Bmf, Bad, Hrk, PUMA (modulador de apoptosis sobre regulado por p53) y NOXA que como su nombre lo indica sólo poseen un dominio BH3.

El mecanismo de acción de estas proteínas no está claro, aunque se propone que regulan vías de muerte y supervivencia al antagonizar sus acciones, formando heterodímeros. Estas proteínas están sujetas a diferentes mecanismos de control, como en el caso de Bax y PUMA, cuya expresión puede ser inducida por la acción del factor de transcripción p53. Algunas proteínas de la familia Bcl-2 como Bmf o Bim se liberan ante la injuria desde elementos del citoesqueleto donde normalmente están secuestradas<sup>8-10</sup>.

Se ha propuesto que una vez se liberan estas proteínas de la familia solo BH3, interfieren en los heterodímeros formados en el citoplasma por miembros pro y anti apoptóticos de la familia Bcl2 (p.e., heterodímeros de Bax y Bcl-2), dejando libres los miembros proapoptóticos. Hay evidencia de que algunas proteínas

de la familia Bcl-2 como Bax tienen capacidad de formación de poros en las membranas si se encuentran varias moléculas libres. Dado este hallazgo, se ha propuesto que la liberación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 permitiría la formación de un poro de permeabilidad formado por subunidades de Bax en la membrana mitocondrial con la consecuente liberación de proteínas como citocromo C y Smac/DIABLO.

## ANOIKIS

Se denomina anoikis a la muerte celular programada que se produce por pérdida de contacto o por contacto inadecuado de la célula con los elementos de la matriz extracelular. Este tipo de muerte supone la interrupción de cascadas de señalización de supervivencia, normalmente activas en la célula. Estas cascadas son mediadas por proteínas transmembrana como las integrinas, que permiten la unión de elementos propios de la matriz con otros intracelulares como quinasas y proteínas del citoesqueleto<sup>11</sup>. Algunas quinasas intracelulares que median supervivencia en este panorama son FAK (quinasa de adhesión focal), ILK (quinasa ligada a integrinas) y Shc, que permiten la activación de la vía de la PI3K/AKT y de la vía de las MAP quinasas. Las anteriores quinasas también se relacionan con elementos del citoesqueleto como la actina, lo cual se considera fundamental para preservar la arquitectura celular. En el caso de las neuronas, el vínculo entre la matriz, las integrinas y el citoesqueleto es primordial para garantizar la disposición de los procesos dendríticos y espinas, que a su vez es fundamental para garantizar la conectividad<sup>12</sup>. Asimismo, receptores de factores de crecimiento como receptores para NGF (factor de crecimiento nervioso), BDNF (factor neurotrófico derivado del encéfalo) y NT4 (neurotrofina 4), EGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial), PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), se relacionan con estas vías a través de la modulación de la función de las integrinas, sirviendo como una señal adicional de supervivencia.

Al estar directa o indirectamente conectados con la matriz extracelular, los elementos del citoesqueleto funcionan como sensores del daño celular o de pérdida de contacto con elementos de la matriz extracelular o con otras células. Cualquier injuria que ocasione des-

arreglos de las estructuras de matriz extracelular o integrinas y que lleve a alteración de la estructura del citoesqueleto por la pérdida de la señalización previamente mencionada, permite la liberación de proteínas proapoptóticas que normalmente están secuestradas en el citoesqueleto. Ejemplo de estas proteínas son Bim y Bmf, las cuales son liberadas ante insultos desde la cadena ligera de dineína y el complejo motor miosina V actina, respectivamente<sup>8</sup>. Estas proteínas iniciarían una cascada que lleva a la activación de la vía apoptótica mitocondrial o intrínseca, a través de los mecanismos descritos previamente para los miembros de la familia proteica solo BH3.

Cabe anotar que la matriz extracelular en el sistema nervioso no es tan abundante como en otros tejidos; sin embargo, su presencia es notable en las hendiduras sinápticas, principalmente constituida por hialuronato, colágeno tipo 4, laminina, metaloproteinasas, fibronectina, etc. Sería importante establecer si alteraciones de la matriz de las hendiduras sinápticas que pueden estar asociadas con deaferentación pueden desencadenar anoikis en las células postsinápticas. Este fenómeno podría presentarse en eventos agudos como isquemia, trauma y en enfermedades neurodegenerativas donde la disfunción sináptica puede anteceder la pérdida neuronal.

## APOPTOSIS EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En los últimos años, la investigación en enfermedades neurodegenerativas se ha orientado hacia establecer los mecanismos de muerte celular, y en especial a determinar cuál es la contribución de la apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas como Corea de Huntington y Alzheimer, que progresan por años.

**Esclerosis lateral amiotrófica.** Es una enfermedad paralizante progresiva y fatal que afecta el sistema motor voluntario. Patológicamente, se caracteriza por una pérdida de neuronas motoras superiores e inferiores. Hay una forma familiar de la enfermedad, la más infrecuente, para la cual se han identificado algunos genes. De estos, el gen más estudiado es el SOD-1 (superóxido dismutasa 1). Por la función de SOD-1 como un barredor de radicales libres, algunos estudios han propuesto que la neurodegeneración inducida en estos casos se debería a la incapacidad de las células

para inactivar radicales libres<sup>13</sup>. No hay consenso sobre si la disfunción de la SOD-1 lleva a muerte apoptótica, porque es poco el porcentaje de células que se han identificado en diferentes estudios con características morfológicas propias de procesos apoptóticos. Sin embargo, la falta de evidencia de figuras apoptóticas típicas podría obedecer a que la tasa de muerte es lenta, aunque progresiva, lo cual disminuye la posibilidad de encontrar estados apoptóticos maduros<sup>14</sup>. La participación de caspasas en la esclerosis lateral amiotrófica se refuerza por estudios en modelos transgénicos de ratón que carecen de la SOD-1, donde la utilización de inhibidores irreversibles de caspasas disminuye la muerte celular<sup>15,16</sup>.

**Enfermedad de Alzheimer.** Muchos estudios han sugerido que la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer incluye fenómenos apoptóticos. Sin embargo, en Alzheimer no se han observado las características morfológicas finales de los procesos apoptóticos como condensación de cromatina, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos. Raina *et al.*<sup>17</sup> plantearon que en la enfermedad de Alzheimer ocurre una pérdida de la eficacia de propagación del estímulo apoptótico o apoptosis abortada, más conocida como abortosis. Los autores encontraron en cerebros *post-mortem* con enfermedad de Alzheimer confirmada, un aumento en la marcación inmunohistoquímica de las caspasas iniciadoras 8 y 9, pero no encontraron diferencias en la marcación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7 con respecto al control. Según este planteamiento, la célula lograría evitar la muerte celular y continuaría viable con cierto grado de disfunción, lo que daría cuenta de la cronicidad del proceso y de los hallazgos clínicos. Como de todas maneras hay pérdida neuronal sería importante establecer si rutas independientes de caspasas como AIF podrían jugar algún papel.

Hasta el presente, se han relacionado tres proteínas con la forma de aparición temprana de la enfermedad de Alzheimer: proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PS-1) y presenilina 2 (PS-2). La APP es una proteína transmembrana tipo I que se caracteriza por un dominio amino terminal extracelular largo, una parte transmembrana y un dominio carboxilo terminal citoplasmático corto. Esta proteína es procesada por las enzimas alfa, beta y gamma secretasas, con la consecuente producción de segmentos extracelulares y un dominio intracelular derivado conocido como AICD. Se

ha planteado que el dominio intracelular derivado de la proteína precursora de amiloide puede participar en fenómenos apoptóticos a través de su interacción con proteínas adaptadoras como Fe65 y Tip60, las cuales le permiten el paso al núcleo, donde la AICD actuaría sobre p53, promoviendo sus acciones transcripcionales y proapoptóticas<sup>18</sup>, tales como el aumento en la expresión de proteínas como Bax, PUMA, NOXA y proteínas del ciclo celular; lo último es importante en el caso de las neuronas porque estas células son postmitóticas y la reentrada en el ciclo celular no las conduciría a mitosis sino que activaría mecanismos de muerte. Se ha informado que la inhibición del procesamiento de APP mutante por la beta y la gamma secretasas reduce la activación transcripcional mediada por p53 y confiere resistencia a la apoptosis<sup>19</sup>.

Otros estudios han mostrado la interacción de la AICD con la proteína ligadora de APP-1 (APPBP1), que promueve la activación de la vía de nedilación la cual lleva a la ubiquitinización de proteínas hasta su degradación<sup>20</sup>. Se ha propuesto que en las neuronas esta ruta llevaría a la activación de proteínas relacionadas con el ciclo celular, un intento de activación del mismo, el cual sería fallido y llevaría a apoptosis.

La alteración de la homeostasis del calcio ha sido ampliamente estudiada en procesos agudos como isquemia y trauma, pero su papel dentro de eventos neurodegenerativos también se considera importante. Normalmente, las concentraciones de calcio en el retículo endoplásmico son reguladas a través de la retoma del ión por la calcio ATPasa endoplásmica y la liberación por inositol 1,4,5 trifosfato; tanto la disminución de la actividad de calcio ATPasa como el aumento de la liberación del inositol pueden llevar a apoptosis. Una de las vías a través de las cuales el calcio puede iniciar la apoptosis es por la activación de la caspasa 12<sup>21</sup>. Esta caspasa puede activar la caspasa 9, la cual a su vez activaría la caspasa 3, para que ésta actúe sobre el citoesqueleto y el ADN. La ruta anterior de muerte mediada por el calcio se daría si los niveles de calcio procedentes del retículo se mantienen elevados y constantes, porque si los niveles de calcio oscilan, por el contrario se desencadenan cascadas de supervivencia<sup>22</sup>. Hasta el presente no se sabe si este mecanismo dual mediado por el calcio procedente del retículo ocurre en enfermedades neurodegenerativas.

En diferentes tipos celulares, incluidas las neuronas,

existe evidencia que indica que el estrés oxidativo producido por diversas condiciones puede conducir a apoptosis. En trauma, isquemia y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer se ha observado que el aumento en el calcio intracelular estimula la producción de especies reactivas de oxígeno a través de la activación de las calpaínas (proteasas dependientes de calcio no lisosomales). La calpaína activada por el influjo de calcio al citoplasma desde el retículo o desde el exterior celular puede partir la caspasa 12 y la Bcl-XL, convirtiéndolas en péptidos tóxicos que comprometerían la integridad de la membrana mitocondrial y también causarían estrés reticular. Este fenómeno conduce a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, que desencadena una respuesta protectora conocida como la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR, con la participación de chaperonas moleculares normalmente presentes en el retículo, como las proteínas reguladas por glucosa (GRPs) y las pequeñas proteínas de choque térmico (sHSPs) como la cristalina alfa B y la HSP27. Esta respuesta puede o no ser suficiente y de esto, en parte, dependería la viabilidad celular y la permanencia en un estado disfuncional crónico.

**Enfermedad de Parkinson.** En la enfermedad de Parkinson hay pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta. Sin embargo, la etiología exacta de esta pérdida no es clara. En años recientes ha aumentado la evidencia sobre el papel de la apoptosis en la muerte de células dopaminérgicas. El estrés oxidativo generado por los metabolitos tóxicos de la dopamina puede ser uno de los factores que determinan la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson, de hecho se ha demostrado que la dopamina puede inducir apoptosis en modelos *in vitro*.

En algunos estudios se ha observado muerte de neuronas dopaminérgicas nigroestriales debida a estrés oxidativo, y a la activación tras la aplicación de 6-hidroxidopamina, 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) o de su metabolito el MPP+, de la cascada de la JNK (jun quinasa) y de vías dependientes de Bax y de Fas<sup>23</sup>. Asimismo se ha demostrado sobre-regulación del ARN mensajero y de la proteína Bax, en la sustancia negra pars compacta de ratones tratados con MPTP. Lo anterior se refuerza al observar en ratones mutantes que carecen de Bax una resistencia a

la apoptosis generada por MPTP<sup>24</sup>.

**Corea de Huntington.** Las células más afectadas por degeneración en la enfermedad de Huntington son las neuronas gabaérgicas espinosas medianas del estriado, las cuales se pierden casi en su totalidad en los estadios finales de la enfermedad. Se sabe que la enfermedad es ocasionada por la elongación de una cola de poliglutamina en el exón 1 del gen que codifica la Huntingtina; sin embargo, no se sabe cómo esta mutación lleva a muerte celular extensa y selectiva de las neuronas del núcleo caudado. Hay suficiente evidencia que vincula algunas vías apoptóticas con la proteína mutada; en estos estudios se ha mostrado que tanto la forma normal como la mutada de la Huntingtina son partidas por caspasa 3 y calpaína generando productos o fragmentos resultantes que podrían ser responsables de la citotoxicidad al acumularse en el núcleo celular<sup>25</sup>.

## ISQUEMIA Y TRAUMA

En los últimos años numerosos estudios han mostrado evidencia sobre la activación de cascadas de señalización apoptótica después de injuria al sistema nervioso, sobre todo como mecanismo secundario de lesión. En modelos animales y en humanos se ha observado que la mayoría de los procesos apoptóticos activos en el caso de isquemia pertenecen a las vías clásicas, principalmente la vía intrínseca o mitocondrial, con una participación amplia de la caspasa 3 como elemento efector<sup>26,27</sup>. Los modelos de isquemia moderada o transitoria (con reperusión) hacen más evidente la participación de estos procesos apoptóticos que los modelos de isquemia permanente, donde el tipo de muerte celular predominante sería la necrosis. En la lesión isquémica el sitio localizado alrededor del vaso ocluido se conoce como foco necrótico, por el tipo de muerte celular que lo caracteriza, mientras que la zona peri-infarto conocida como zona de penumbra, tendría un mayor aporte de muerte celular programada<sup>28</sup> y sería la zona que interesaría desde el punto de vista clínico con el fin de evitar procesos secundarios degenerativos responsables de las secuelas neurológicas.

El aumento en neuronas de la expresión de ciertos genes relacionados con la proliferación y la presencia de sus productos proteicos, así como el posterior desencadenamiento de apoptosis en estos mismos tipos celulares después de isquemia ha permitido proponer lo que se

conoce como la reentrada aberrante en el ciclo celular de las neuronas<sup>29</sup>. La pérdida de inhibidores endógenos de quinasas dependientes de ciclinas (ICDKs) normalmente activas en neuronas y el aumento en la expresión de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) permite la entrada de la célula en un ciclo celular que después es abortado a través de apoptosis, por mecanismos no claros hasta el momento.

En los análisis de tejido contuso se ha informado que la apoptosis posterior a injuria puede ser detectada horas a días después de la lesión y que esta puede contribuir a la disfunción neurológica del paciente. La heterogeneidad intrínseca que supone la lesión traumática, implica un espectro de condiciones celulares, que incluye células aparentemente intactas, células apoptóticas y/o necróticas. Algunos estudios han mostrado que la mayor parte de las células apoptóticas en modelos de trauma craneoencefálico y raquimedular corresponden a neuronas<sup>30,31</sup>.

En condiciones como contusión cerebral, las zonas que sufren impacto directo serían análogas al foco necrótico observado en isquemia cerebral, por tanto, en ambos casos habría compromiso energético, liberación de aminoácidos excitatorios y muerte necrótica. La zona de penumbra isquémica sería análoga a la zona perilesional en trauma craneoencefálico, con algún grado de circulación sostenida y actividad metabólica disminuida pero suficiente para mantener la supervivencia neuronal. Las zonas exofocales a los puntos de mayor lesión o de penumbra, podrían comprometerse por mecanismos de muerte no necesariamente relacionados con falla energética; factores como axotomía y/o deafferentación pueden promover muerte celular programada. En un modelo experimental de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media en ratones, se observó en los animales que sobrevivieron por más tiempo, cambios celulares compatibles con apoptosis en aquellas regiones del tálamo que se conectan con las áreas corticales sujetas a la isquemia, en este caso, regiones somatosensoriales<sup>32</sup>.

Adicionalmente, en nuestro grupo, utilizando dos marcadores neuronales con sensibilidad para determinar injuria celular (NeuN, antígeno nuclear neuronal y MAP2, proteína asociada con microtúbulos 2), se encontró un espectro de condiciones celulares en el tejido contuso de corteza cerebral de humano; en un mismo sector se encontraron células aparentemente normales,

células con alteración del citoesqueleto y células con distribución anormal de NeuN, acompañadas o no de zonas microhemorrágicas. Los procesos dendríticos (marcados con anti-MAP2) en ocasiones aparecían edematizados y tortuosos, en algunos casos con distorsión de las minicolumnas corticales<sup>33</sup>. Las alteraciones del citoesqueleto observadas en estudios de trauma craneoencefálico, darían cuenta de la posible participación de tipos de muerte como anoikis en su fisiopatología, debido a la liberación de elementos proapoptóticos como Bim desde estas estructuras y a la pérdida de contacto adecuado con la matriz extracelular que puede jugar un papel importante en la lesión traumática. Asimismo, en este tejido se observaron células (neuronas, glías, endotelio) positivas para marcadores inmunohistoquímicos de apoptosis, como Bim, Caspasa 3, Bak, Bax, fragmentación del ADN (Apoalert) y expresión de proteínas propias del ciclo celular como ciclina D1 (datos no publicados), siendo muchos de estos hallazgos análogos a los encontrados en condiciones de isquemia.

Elementos pertenecientes a la vía extrínseca o vía de los receptores de muerte han sido ampliamente descritos en trauma craneoencefálico. Algunos ligandos de muerte como TNF-alfa y FasL se han encontrado aumentados en el líquido cefalorraquídeo después de trauma craneoencefálico en roedores y humanos<sup>34</sup>.

Cambios en la expresión génica a través de microarreglos de ADN también han sido analizados en el contexto del trauma craneoencefálico, con un aporte porcentual pequeño a los perfiles generales de expresión de genes relacionados con procesos apoptóticos, lo cual se podría explicar por la participación aislada de elementos de muerte celular programada durante la evolución temporal de la lesión y por la baja probabilidad de encontrar un panorama apoptótico en un momento dado. Estudios realizados en nuestro grupo evidencian aumento en la expresión génica de elementos pertenecientes a rutas no clásicas de apoptosis en trauma craneoencefálico en humanos, lo cual podría dar cuenta de la especialización tisular y una probable particularidad en la respuesta transcripcional<sup>35</sup>.

## EPILEPSIA

La mayoría de los estudios evidencian que la necrosis es el principal fenotipo morfológico de las células que mueren después de la crisis convulsivas<sup>36,37</sup>. Sin embar-

go, existen algunos hallazgos que respaldan la participación de cascadas de señalización apoptótica en fenómenos epilépticos, entre estos se destaca la sobre-regulación de la caspasa 3 en poblaciones celulares neuronales y gliales en regiones límbicas como la corteza entorrinal, amígdala e hipocampo después de crisis epilépticas<sup>38,39</sup> y la activación de la proteína p53. Esta proteína fue quizá el primer elemento relacionado con apoptosis descrito posterior a crisis convulsivas y seguramente ha sido también el más consistente. Se ha demostrado que se promueve su acción sobre sus genes blanco después de crisis epiléptica, principalmente sobre la expresión de Bax, propiciando así la formación del poro de transición de permeabilidad en la mitocondria y la subsecuente liberación de citocromo C y Smac/DIABLO. Se ha descrito que el uso de inhibidores de p53 protege contra la excitotoxicidad por ácido kaínico, motivo por el cual se considera que puede ser el responsable de la iniciación de procesos apoptóticos después de crisis epilépticas<sup>40</sup>.

Se debe considerar que la muerte programada de las neuronas no sólo depende del tipo de injuria sino de otros elementos como el estado metabólico de las neuronas en el momento de la injuria, de si las aferentes a esas neuronas se comprometen, o de si existe axotomía concomitante. Se ha demostrado que existe sensibilidad diferencial de las neuronas a estrés oxidativo luego de comparar tajadas de cerebelo, de las regiones hipocampales CA1-CA3 y de la corteza cerebral, siendo las células más vulnerable las de CA1 y las granulares del cerebelo, y las más tolerantes las de CA3 y las células corticales. La vulnerabilidad selectiva se correlacionó con la expresión génica. Al analizar la expresión génica se encontró que las células más vulnerables tenían más expresión génica asociada con la respuesta al estrés y a la inflamación y menos asociada con la reserva energética y señalización<sup>41</sup>. En todos los sectores del sistema nervioso la diversidad neuronal, sus patrones de ramificación y conexiones son amplios, portanto es esperable encontrar diferentes grados de respuesta a la lesión como ya se mencionó. Esto complica el escenario para intervenir.

Debido al creciente conocimiento en cuanto a las cascadas de señalización apoptótica y a la comprensión de la confluencia y redundancia observada en las mismas, se han identificado una gran cantidad de candidatos como agentes terapéuticos para atenuar la muerte celular programada en diferentes modelos. Sin embargo, la heterogeneidad y complejidad intrínseca de estas rutas supone cierta dificultad en la selectividad de ac-

ción de los fármacos y en las consecuencias fisiológicas de los mismos. Como el fallo de los mecanismos apoptóticos es un fenómeno que se da en los crecimientos tumorales, se podría suponer la aparición de estos con el uso de sustancias antiapoptóticas, lo cual ha sido otro punto de discusión para la intervención terapéutica. Adicionalmente, se ha observado en estudios con cultivos de líneas celulares que el bloqueo de la vía apoptótica por inhibición de la caspasas que fueron activadas por el receptor de Fas, deriva en muerte necrótica por acumulación de radicales libres<sup>42</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Colciencias por la financiación del proyecto «Evaluación cualitativa y cuantitativa del trauma craneoencefálico en humanos» Código 1106-04-16329. A los doctores Martha Isabel Escobar y Efraín Buriticá, del Centro de Estudios Cerebrales, por la revisión crítica del manuscrito.

## REFERENCIAS

1. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000; 407: 796-801.
2. Ashe P, Berry M. Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27: 199-214.
3. Nijhawan D, Honapour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2000; 23: 73-87.
4. Yoshida H. The role of Apaf-1 in programmed cell death: from worm to tumor. *Cell Struct Funct*. 2003; 28: 3-9.
5. Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death. *Prog Neurobiol*. 2007; 81: 179-96.
6. Chang H, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000; 64: 821-46.
7. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family «killerproteins» and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res*. 2001; 306: 347-61.
8. Strasser A, Puthalakath H, Bouillry P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, et al. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann New York Acad Sci*. 2000; 917: 541-8.
9. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*. 1999; 3: 287-96.
10. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly L, Beaumont J, Coultas L, Cheney R, et al. Bim: a novel proapoptotic Bh3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex and activated by anoikis. *Science*. 2001; 293: 1829-32.
11. Giancotti F, Ruoslanti E. Integrin signaling. *Science*. 1999; 285: 1028-35.
12. Dedhar S. Cell-substrate interactions and signaling through ILK. *Curr Opin Cell Biol*. 2000; 12: 250-6.
13. Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2: 806-19.
14. Guégan C, Przedborski S. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis. *J Clin Invest*. 2003; 111: 153-61.
15. Li M, Ona VO, Guégan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, et al. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science*. 2000; 288: 335-9.
16. Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 13901-6.
17. Raina AK, Hochman A, Zhu X, Rottkamp CA, Nunomura K, Siedlak SL, et al. Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2001; 101: 305-10.
18. Ozaki T, Li Y, Kikuchi H, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A. The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351: 57-63.
19. Esposito L, Gan L, Yu GQ, Essrich C, Mucke L. Intracellularly generated amyloid-beta peptide counteracts the antiapoptotic function of its precursor protein and primes proapoptotic pathways for activation by other insults in neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 2004; 91: 1260-74.
20. Chen, YZ. APP induces neuronal apoptosis through APP-BP1-mediated downregulation of beta-catenin. *Apoptosis*. 2004; 9: 415-22.
21. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000; 403: 98-103.
22. Rong Y, Distelhorst C. Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signals in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 2008; 70: 73-91.
23. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003; 53 (Suppl 3): 26-36.
24. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, et al. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 2837-42.
25. Kim GW, Chan PH. Oxidative stress and neuronal DNA fragmentation mediate age-dependent vulnerability to the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid, in the mouse striatum. *Neurobiol Dis*. 2001; 8: 114-26.
26. Li PA, He QP, Ouyang YB, Liu CL, Hu BR, Siesjo BK. Early release of cytochrome c and activation of caspase-3 in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 2001; 896: 69-76.
27. Love S, Barber R, Srinivasan A, Wilcock GK. Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischaemia in man.

- Neuro-Report*. 2000; 11: 2495-9.
28. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*. 1998; 46: 281-309.
  29. Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, Memo M. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci*. 2001; 24: 25-31.
  30. Kaya SS, Mahmood A, Li Y, Yavuz E, Goksel M, Chopp M. Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain. *Brain Res*. 1999; 818: 23-33.
  31. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 1997; 17: 5395-406.
  32. Wei L, Yung D, Cui L, Langsdorf J, Ping Yu. Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rat. *Brain Res*. 2004; 1022: 54-61.
  33. Escobar M, Guzmán F, Buriticá E, Riascos D, Villamil L, Pimienta H. Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico. *Colomb Med*. 2008; 39(Supl 3): 51-9.
  34. Ross SA, Halliday MI, Campbell GC, Byrnes DP, Rowlands BJ. The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Br J Neurosurg*. 1994; 8: 419-25.
  35. Rodas Y, Becerra L, Buriticá E, Peña S, Pimienta H. Perfil de expresión génica en trauma craneoencefálico en humanos. *Acta Biol Colomb*. 2008; 13:245-6.
  36. Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Seizure-induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia*. 2000; 41: S9-S13.
  37. Kubova H, Druga R, Lukasiuk K, Suchomelova L, Haugvicova R, Jirmanova I, Pitkanen A. Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in the immature rats. *J Neurosci*. 2001; 21: 3593-9.
  38. Akbar MT, Wells DJ, Latchman DS, de Belleruche J. Heat shock protein 27 shows a distinctive widespread and temporal pattern of induction in CNS glial and neuronal cells compared to heat shock protein 70 and caspase-3 following kainate administration. *Mol Brain Res*. 2001; 93: 148-63.
  39. Becker AJ, Gillardon F, Blumcke I, Langendorfer D, Beck H, Wiestler OD. Differential regulation of apoptosis-related genes in resistant and vulnerable subfields of the rat epileptic hippocampus. *Mol Brain Res*. 1999; 67: 172-6.
  40. López E, Pozas E, Rivera R, Ferrer I. Bcl-2, Bax and Bcl-X expression following kainic acid administration of convulsant doses in the rat. *Neuroscience*. 1999; 90: 1461-70.
  41. Wang X, Zaidi A, Pal R, Garret A, Bracerar R, Chen X, et al. Genomic and biochemical approaches in the discovery of mechanism for selective neuronal vulnerability to oxidative stress. *BMC Neuroscience*. 2009; 10: in press.
  42. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W, et al. Dual signaling of the Fas receptor: Initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med*. 1998; 188: 919-30.