



II. BASES MOLECULARES DEL ENVEJECIMIENTO RENAL

Bases moleculares de la apoptosis celular y su relación con la patología renal

J. X. Comella, N. Llecha, V. J. Yuste, J. Boix, I. Sánchez y J. R. Bayascas

Sección de Apoptosis del Grupo de Neurobiología Molecular. Universitat de Lleida. Lleida.

INTRODUCCION

La apoptosis o muerte celular programada (por contraposición a la necrosis o muerte accidental) es un mecanismo desarrollado por los organismos pluricelulares, muy conservado evolutivamente y que se presenta, prácticamente en todos los modelos animales estudiados. Este fenómeno es un mecanismo de «suicidio» celular genéticamente regulado implicado en procesos de desarrollo y de conservación de la homeostasis funcional del organismo. Presenta unas características morfológicas muy bien definidas que fueron las que inicialmente permitieron identificarlo y caracterizarlo. De forma breve, el fenómeno consiste en una alta condensación, tanto del citoplasma como del núcleo, con aparición de protuberancias citoplasmáticas envueltas por membrana. Estos cambios iniciales se continúan con una fragmentación nuclear y citoplasmática, en forma de cuerpos apoptóticos envueltos por membrana celular que son rápidamente fagocitados por células especializadas (macrófagos) o, en algunos casos, por las células adyacentes a la célula apoptótica. Como consecuencia final, y al cabo de unas pocas horas, la célula apoptótica ha desaparecido sin dejar rastro alguno de su existencia previa¹. Desde un punto de vista bioquímico, este proceso no se analizó hasta mucho tiempo después de haber sido descrito morfológicamente. Las células apoptóticas se caracterizan por presentar una reducción en su potencial mitocondrial, acidificación intracelular, producción de radicales oxidantes, externalización de residuos de fosfatidilserina de la bicapa lipídica membranaria, proteólisis selectiva de determinadas proteínas celulares y degradación de la cromatina en fragmentos oligonucleosomales². Estos cambios bioquí-

micos son el reflejo de la activación de una maquinaria intracelular específica que controla este proceso, de la que son especialmente importantes un conjunto de enzimas proteolíticas llamados caspasas que se describirán con detalle más adelante.

MODELOS PRIMITIVOS PARA EL ESTUDIO DE LA APOPTOSIS: CAENORHABDITIS ELEGANS

Sin duda, el modelo animal que más ha contribuido a entender los mecanismos moleculares que regulan la apoptosis ha sido el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se ha podido comprobar que existen tres genes esenciales que controlan la ejecución del proceso apoptótico en este animal: *ced-3* y *ced-4* promueven la apoptosis y *ced-9* la inhibe (fig. 1)

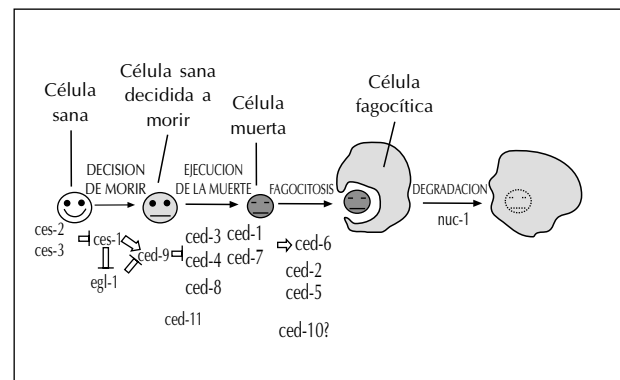


Fig. 1.—La vía genética de la muerte celular programada en *C. elegans*. Las líneas acabadas en punta de flecha (→) indican interacción reguladora positiva y las líneas perpendiculares (⊥) reflejan interacciones que regulan negativamente el proceso de muerte. La decisión de morir depende de cada tipo celular en particular; pero una vez que la célula está ya destinada a morir, el programa genético que desarrolla es universal. Es decir, que la maquinaria intracelular efectora de muerte es común a todas las células de *C. elegans*, pero la determinación de morir es una «decisión» particular de cada célula.

Correspondencia: Dr. Joan X. Comella
Dpto. Ciències Mèdiques Bàsiques
Universitat de Lleida
Rovira Roure, 44
25198 Lleida

(*ced* de *Caenorhabditis elegans* death genes)^{3,4}. Inicialmente se caracterizaron porque las mutaciones inactivantes de *ced-9*, siempre y cuando *ced-3* y *ced-4* fueran funcionales, incrementaban de forma extraordinaria el número de células que morían durante el desarrollo normal del organismo³. Además, la sobreexpresión, tanto de *ced-3* como de *ced-4*, inducía muerte celular y ésta podía ser inhibida por *ced-9*. Se pudo comprobar también que, en *C. elegans*, estos tres genes estaban relacionados funcionalmente; así, por ejemplo, se ha demostrado que CED-4 puede unirse a CED-3, a CED-9 o a ambos simultáneamente. La muerte mediada por sobreexpresión de CED-4 requiere la presencia de CED-3; mientras que la muerte por sobreexpresión de CED-3 es independiente de CED-4, sugiriendo que CED-3 es un mediador de los efectos de CED-4. Del mismo modo, se ha demostrado que la capacidad de CED-9 para inhibir la muerte mediada por CED-3 depende de la presencia de un CED-4 funcional, es decir, que, probablemente, las acciones antiapoptóticas de CED-9 estén mediadas por una inhibición directa de CED-4⁵. Después de estos estudios en nematodo, se identificaron los homólogos de estos genes en mamífero superior. Se identificó Bcl-2 (*B-cell leukemia protein-2*) como el homólogo del producto génico CED-9⁶, caspasa-3 como homólogo de CED-3⁷ y Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) como homólogo de CED-4⁸. A continuación se describirán cada uno de estos homólogos de vertebrados superiores con más detalle.

PROTEASAS TIPO CASPASA

En realidad, el primer homólogo de CED-3 que se caracterizó en vertebrados superiores fue el enzima conversor de la interleucina-1 β o ICE debido a una moderada homología de secuencia entre ambos genes⁴. Este enzima es el encargado de procesar la proIL- β en IL- β madura^{9,10}. Tanto CED-3 como ICE presentan destacadas características comunes como el hecho de ser enzimas proteolíticas con especificidad para residuos de aspartato (Asp, D), presentar un residuo cisteína (Cys, C) en su centro activo e inducir muerte apoptótica cuando son sobreexpresadas en células de mamífero. Se ha podido observar que, en humanos, estos dos genes iniciales presentan hasta 10 homólogos distintos que han sido secuencialmente numerados y llamados caspasas. Esta denominación proviene de ser enzimas cisteína, *aspartasas*¹¹. Estos enzimas se sintetizan como proenzimas inactivos que presentan un dominio, en su extremo amino, de longitud variable, seguido de una subunidad mayor y, finalmente, una subunidad menor. Para

ser funcionalmente activos requieren que el proenzima sea fragmentado en los residuos Asp que separan cada uno de estos tres dominios^{12,13}. En realidad, son las propias caspasas las encargadas de activar por proteólisis a otras caspasas. Cuando esto ocurre, las subunidades mayor y menor forman un heterodímero: las moléculas activas están formadas por tetrámeros constituidos por 2 subunidades mayores y 2 menores¹³. El prodominio, no presente ya en el enzima activo, juega un papel fundamental en el mecanismo de activación de la caspasa, ya que permite la interacción de ésta con otras proteínas reguladoras del proceso de activación de la vía apoptótica. Las caspasas pueden ser clasificadas de tres formas distintas: 1) según la especificidad de corte, 2) según el tamaño de su prodominio, y 3) desde un punto de vista funcional (tabla I).

Especificidad de corte

A pesar de que todas las caspasas presentan especificidad por residuos Asp, se establece una preferencia en función del aminoácido que ocupa la posición 4 en sentido amino-terminal, con respecto al Asp que será procesado. Según lo dicho, se podrán dividir las caspasas en tres grupos: un primer grupo que presenta aminoácidos hidrofóbicos (tipo tirosina, Tyr, Y) en esta posición; un segundo grupo

Tabla I. Clasificación de las caspasas humanas identificadas hasta el momento. Existen tres formas diferentes de clasificar las caspasas: por especificidad de corte (tres grupos posibles: I, II y III), por el tipo de prodominio (largo o corto) y según su función de inducción o de ejecución de la apoptosis

Caspasa	Grupo	Prodominio	Instigadora/efectora
1	I	L	I/E
2	II	L	I/E
3	II	C	E
4	I	L	I/E
5	I	L	I/E
6	III	C	E
7	II	C	E
8	III	L	I
9	III	L	I
10	III	L	I

Grupo
 I: WEXD
 II: DEXD
 III: (L/V) EXD

Prodominio
 L: Largo
 C: Corto

que presenta un Asp y un último grupo que no muestra una preferencia clara por ningún aminoácido en especial. Esta preferencia de corte en función del aminoácido presente en esta posición 4, hace que determinados substratos proteicos sean más propensos que otros a sufrir la proteólisis específica por determinadas caspasas^{14,15}.

Tamaño del prodominio

Según este criterio, pueden diferenciarse «caspasas de prodominio largo» (caspasas-1, -2, -4, -5, -8, -9 y -10) y «caspasas de prodominio corto» (caspasas-3, -6, -7 y -11). En general, las caspasas con prodominios largos permiten una mayor regulación de su activación, por ejemplo, en estos prodominios se han encontrado alternativamente, dos tipos de secuencias. La primera es la llamada «dominio efector de muerte» (DED o *death effector domain*), consistente en un dominio proteico que permite la interacción de la caspasa con moléculas adaptadoras, conectadas, a su vez, a receptores inductores de muerte (ver más adelante). Este tipo de dominio se ha descrito para las caspasas -8 y -10. El segundo tipo de secuencia encontrada en este prodominio es el «dominio de reclutamiento de caspasa» (CARD o *caspase recruitment domain*), una secuencia proteica que permite la interacción de la caspasa con Apaf-1, es decir, el equivalente de CED-4 en mamíferos superiores (ver más adelante). Las caspasas-1, -2, -4 y -9, junto con CED-3, son las que contienen CARD en su prodominio².

Según la funcionalidad

Funcionalmente, las caspasas pueden dividirse en «caspasas inductoras» y «caspasas ejecutoras». Las primeras suelen tener prodominios largos y estar localizadas muy al principio de la cascada de actividades proteicas de tipo caspasa que regulan el proceso apoptótico. Presentan una especificidad de corte que suele estar presente en la secuencia de otras caspasas, de tal forma que la actividad de las caspasas inductoras comporta el corte y la consiguiente activación de las caspasas ejecutoras. Estas, en cambio, suelen tener un prodominio corto y su especificidad de corte se corresponde, fundamentalmente, con una gran cantidad de substratos proteicos, a los que fragmentarán durante el proceso apoptótico².

Las evidencias que existen a favor de la implicación de las caspasas en la regulación y ejecución del proceso apoptótico son múltiples (Revisado por Cryns y Yuan, 1998)¹⁶. Por una parte, y como ya se

ha mencionado anteriormente, su sobreexpresión en sistemas celulares de mamíferos comporta la muerte de la célula que las sobreexpresa. También se ha demostrado que algunas procaspasas (-1, -2, -3, -6, -7 y -8) son procesadas a enzimas activos como consecuencia del desencadenamiento del proceso apoptótico. Además, muchas de las proteínas que se degradan durante el proceso apoptótico presentan dianas de corte propias de caspasa y su proteólisis se realiza en estas dianas. Otras evidencias incluyen que determinados inhibidores de corte de las caspasas (como por ejemplo, péptidos o proteínas víricas) son capaces de bloquear muchos de los procesos apoptóticos *in vivo*; sin embargo, las evidencias más concluyentes de su función vienen derivadas de los estudios en los que estos genes han sido mutados en ratones transgénicos: los animales carentes de caspasa-3, son los que presentan unos defectos más evidentes en relación con el proceso apoptótico. En éstos, se presentan áreas del sistema nervioso en las que existe un considerable incremento de celularidad como consecuencia de un déficit en el proceso de muerte y que ocurre de forma fisiológica en el sistema nervioso. No obstante, en muchos otros casos en los que una sola caspasa ha sido eliminada, el fenotipo final del ratón no es muy manifiesto. Esto, sin duda, puede atribuirse a una redundancia funcional del conjunto de caspasas.

Nuevas funciones para el citocromo C

Desde hace muchos años, se conoce que el citocromo C está implicado, como uno de los elementos más importantes de la fosforilación oxidativa, en la génesis de ATP mitocondrial. En los últimos dos años, sin embargo, el citocromo C se ha convertido en uno de los elementos más relevantes en la regulación del proceso apoptótico (Revisado por Reed, 1997)¹⁷. El citocromo C se sintetiza en el citoplasma celular a partir de transcritos nucleares y, más tarde, se transporta al espacio intermembranario mitocondrial donde reside de forma fisiológica. Uno de los principales acontecimientos que tienen lugar después de inducirse el proceso apoptótico es una redistribución del citocromo C desde su posición habitual hacia el citoplasma celular. Allí esta molécula desencadenará la activación de las primeras caspasas^{18,19}. Las evidencias en favor de la función reguladora de citocromo C se basan en que la salida de esta molécula de la mitocondria hacia el citoplasma precede a la activación de la caspasa-3 y a la degradación de la cromatina. Además, los extractos citoplasmáticos en los que el citocromo C ha sido eliminado por inmunoprecipitación, son incapaces de inducir activación de caspasa 3 o fragmenta-

ción cromatínica, restaurándose esta capacidad cuando se añade citocromo C a los mismos²⁰. Bcl-2 impide la salida del citocromo C¹⁹ y, en cambio, ésta se ve potenciada por Bax²¹, ambas proteínas localizadas en la membrana mitocondrial. Sin embargo, los experimentos más clarificadores sobre la relevancia de citocromo C se han realizado en el laboratorio del Dr. Wang^{8,20,22}. Estos investigadores partieron de extractos citosólicos de células normales y observaron que cuando se les añadía dATP, la caspasa 3 se activaba. Si a los extractos se les añadían núcleos, éstos presentaban el típico patrón de degradación apoptótica de la cromatina en forma de ladder. Cuando se purificaron los elementos esenciales mínimos para reconstituir la activación de la caspasa 3 y la degradación de la cromatina, se pudo observar que con 4 elementos ya era suficiente para reproducir esos fenómenos (fig. 2). El primero era dATP, el segundo citocromo C, el tercero caspasa-9 y al último se le llamó Apaf-1. Al conjunto de los cuatro elementos se les conoce con el nombre de «apoptosoma». Si bien podía resultar más o menos sorprendente que los tres primeros elementos estuviesen implicados en la regulación de la apoptosis, lo realmente importante fue caracterizar la última molécula. Ésta resultó ser el homólogo de CED-4 de *C. elegans* en mamíferos superiores. Apaf-1 presenta 3 dominios funcionales: en el extremo amino hay una secuencia CARD con homología a otras secuencias CARD de CED-3 y otras caspasas; en la zona central presenta un dominio alta-

mente conservado con CED-4 capaz de unir nucleótidos y es el lugar de unión del dATP y, finalmente, en el extremo carboxilo presenta una zona rica en residuos triptófano (Trp, W) y Asp (este doblete aminoacídico se repite unas 40 veces), gracias a este último dominio, que posiblemente pueda corresponder a un dominio de unión proteína-proteína, el citocromo C es capaz de unirse con Apaf-1. El dominio CARD es el responsable de que Apaf-1 se una a procaspasa-9. Para que ello sea posible Apaf-1 habrá tenido que unirse a citocromo C y a dATP. Cuando la procaspasa-9 se une a Apaf-1, aquella se autocataliza y se activa para proceder, posteriormente, del mismo modo con la procaspasa-3 y continuar así la cascada proteolítica hasta los substratos, cuya proteólisis conducirá al desmantelamiento celular.

Regulación de la apoptosis: receptores de muerte

El entorno que envuelve a una célula, desde el momento en que ésta forma parte de un organismo pluricelular, es de vital importancia en el destino de la misma: la ausencia de factores proteicos que promueven la supervivencia, la carencia de nutrientes o la presencia de determinadas moléculas en el exterior celular producidas por las propias células vecinas puede condicionar la vida de aquella. Los mamíferos superiores han adoptado, a lo largo de la evolución, un sistema por el cual una célula que recibe señales conflictivas de forma simultánea, atenua o pare su crecimiento y acabe sufriendo apoptosis. Pero, para que la aniquilación de una o varias células sea beneficiosa al organismo del que formaban parte, el proceso de muerte ocurrido ha tenido que ser, de alguna forma, selectivo. A este proceso se le conoce como apoptosis instructiva, en el que los receptores de muerte (DR, *death receptor*) juegan un papel crucial, ya que serán ellos los que se encargarán de transmitir las señales apoptóticas, provocadas de su unión con ligandos de muerte (DL, *death ligands*) específicos. Los DRs son proteínas intermembranarias que pertenecen a la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR, *tumor necrosis factor receptor*) y del factor de crecimiento nervioso (p75^{NGFR}, *nerve growth factor receptor*), definida por la presencia de dominios extracelulares ricos en cisteínas en todos los miembros de esta superfamilia. Los DRs mejor caracterizados son el CD95 (también llamado Fas o Apo1) y el TNFR1 (conocido también como p55 o CD120a)²³, aunque se han descrito algunos otros DRs. El mecanismo por el cual estos receptores señalan muerte, tendrá como punto central la activación intracelular de una cascada proteolítica (caspasas) (fig. 3). De este modo, la homotri-

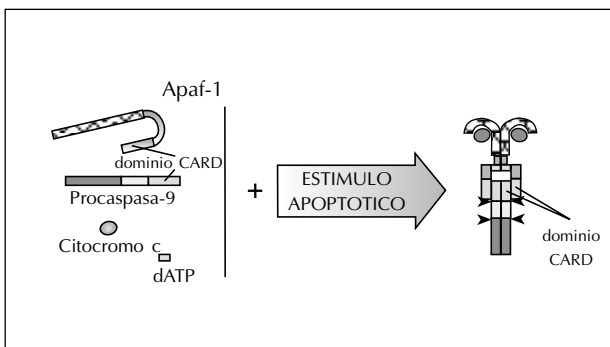


Fig. 2.—Activación de la cascada intracelular de caspasas gracias a la aportación de la mitocondria. Cuatro elementos son suficientes para activar las caspasas y desencadenar la respuesta apoptótica: Apaf-1, procaspasa-9, citocromo C y dATP. En el esquema viene representado el complejo ternario que resulta de la unión de estos elementos después del estímulo apoptótico. De este complejo se obtendrá caspasa-9 (procaspasa-9 activa) que constituirá el primer elemento de activación de la cascada de caspasas procesando y activando a la procaspasa-3, la cual procederá del mismo modo con la procaspasa-6 y ésta última con la procaspasa-7. Todas ellas se encargarán de proteolizar los diferentes substratos para acabar, de este modo, con la vida de la célula.

merización de FasL (ligando de Fas), de TNF (ligando de TNFR1) o de otros DL, provocan que tres moléculas de DR trimericen²³. Esto conlleva la activación de estos receptores, lo que provoca un reclutamiento de proteínas adaptadoras (AP, adaptor protein) que contienen un dominio de muerte (DD, death domain) en el extremo carboxilo. Este reclutamiento puede llevarse a cabo, bien directamente (como es el caso de Fas y, posiblemente, de DR4 y DR5) o bien de forma indirecta a través de moléculas adaptadoras como TRADD (TNFR-associated death domain). Esto ocurre en el caso de TNFR1 y DR3. Las proteínas adaptadoras constituyen el puente entre el complejo DL-DR y la cascada proteolítica de caspasas. Al complejo DL-DR-AP se le conoce con el nombre de complejo señalizador de la inducción de muerte o DISC (death-inducing signaling complex). Una vez constituido el DISC, el extremo amino de las APs deja al descubierto un nuevo módulo de interacción proteína-proteína llamado dominio efector de muerte (DED, death effector domain) que es un ejemplo específico de un dominio de interacción homofílica más general, llamado dominio de reclutamiento de caspasa (CARD, caspase recruitment domain), presente en algunas de las caspasas que contienen un prodominio largo (tabla I)^{24,25}. De forma específica, FADD recluta procaspasa-8 y/o procaspasa-10 hacia el DISC por

medio de sus respectivos DEDs. Finalmente, y por un mecanismo poco definido que, probablemente, sea autoproteólisis, estas procaspasas son cortadas en residuos Asp pasando a formas activas y desencadenando la activación del resto de caspasas efectoras.

Substratos de caspasas y ejecución de la apoptosis

Uno de los temas que ha merecido mayor atención en el estudio de la apoptosis ha sido el determinar qué moléculas son cortadas por la acción de las caspasas y cual es la relevancia de estos cortes respecto al fenotipo apoptótico final. La lista de substratos de caspasas incluye más de 30 proteínas (tabla II), sin embargo, la relación que existe entre el procesamiento de la mayor parte de ellas y el proceso apoptótico, está todavía por definir². Conceptualmente, un substrato de caspasa sería relevante en el proceso apoptótico si,

1. su corte se produjese antes de las manifestaciones morfológicas o bioquímicas del proceso apoptótico,
2. después de ser cortado por la caspasa, su actividad funcional variara (aumentando, en substratos proapoptóticos, o disminuyendo, en proteínas necesarias para la supervivencia o la integridad estructural de la célula) y,

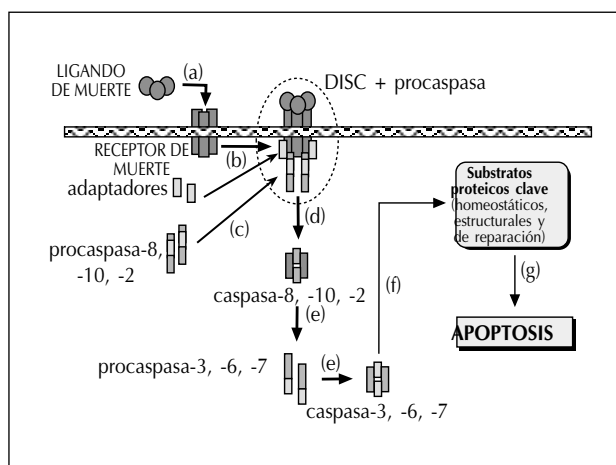


Fig. 3.—Activación de la cascada intracelular de caspasas a través de ligandos y receptores de muerte. Tres moléculas de ligando de muerte provocan la homotrimerización de su receptor (a), lo que conlleva a que moléculas adaptadoras (p. ej., FADD) se unan a él gracias a los dominios DD, presentes tanto en éstos últimos como en el propio receptor (b). Gracias a otro dominio de interacción, el DED, el adaptador recluta dos moléculas de procaspasa de prodominio largo (c), también con dominios DED, provocando el procesamiento y la consiguiente activación de éstas (d). Una vez activadas, estas caspasas procederán del mismo modo con las caspasas ejecutoras, responsables directas de las proteólisis de determinados substratos (e), lo que conducirá a la célula hacia una inevitable apoptosis (f).

Tabla II. Substratos de caspasas proteolizados durante el transcurso de la apoptosis y su posible funcionalidad

<i>I. Substratos relacionados funcionalmente a la inducción de la apoptosis:</i>		
A. Activación de «proteínas asesinas»		
PKC δ y θ	PAK2/hPAK65	
MEKK-1	pro-caspasas	
B. Desmantelamiento estructural		
láminas nucleares		
Gas2		
gelsolina		
C. Eliminación de antagonistas de muerte/disrupción del aparato de muerte celular		
Bcl-2	DFF45/ICAD	
Bcl-X _L	p28 Bap31	
<i>II. Substratos de significado funcional incierto en la apoptosis:</i>		
PARP	RB	
DNA-PK _{CS}	PITSLRE	
U1-70kD	PRK2	
hnRP C1 y C2	fosfolipasa A ₂	
DSEB/RF-C140	IκB-α	
Sp1	rabaptina-5	
fodrina	MDM2	
actina	Huntingtina	
keratinas	presenelinas 1 y 2	
FAK	DRPLA	
β-catenina	SREBP ₅	
D4-GDI		

3. la mutación funcional del sustrato impidiera o alterara alguna de las características propias de la apoptosis.

Recientemente, se ha demostrado que algunos sustratos de caspasas cumplen con estos requisitos. Entre estos, cabe destacar PAK2, proteínas estructurales como las láminas nucleares y una endonucleasa llamada CAD.

PAK2 es una quinasa que presenta un dominio regulador en el extremo amino que puede ser eliminado por la acción de las caspasas. Cuando esto ocurre la molécula se activa. La sobreexpresión del fragmento carboxilo de PAK2, induce condensación citoplasmática y nuclear, desadhesión del sustrato y externalización de residuos de fosfatidilserina, cambios todos ellos propios del fenómeno apoptótico. Además, los inhibidores de caspasas no son capaces de bloquear los cambios inducidos por una PAK2 constitutivamente activa, demostrándose así que PAK2 está ubicada funcionalmente por debajo de las caspasas dentro de la cascada apoptótica²⁶.

Las láminas son componentes de la membrana nuclear y son cortadas por caspasa-6 durante el proceso apoptótico. Si la lámina se modifica para que sea resistente al corte de caspasa, se impiden o retrasan muchas de las características estructurales de la apoptosis. Entre ellas se incluye la condensación cromatínica, la fragmentación del ADN en forma de ladder y la formación de cuerpos apoptóticos. Esto sugiere que estas proteínas están vinculadas a cambios apoptóticos a nivel nuclear y que, probablemente, también estén involucradas en el acceso de nucleasas del citoplasma al núcleo celular²⁷.

CAD, es una endonucleasa que se encuentra, de forma fisiológica, secuestrada en el citoplasma celular a través de su interacción con ICAD que además inhibe su actividad funcional. Cuando se induce el proceso apoptótico, ICAD es degradada e inactivada por caspasa-3, quedando CAD, de este modo, liberado y funcional. Cuando esto ocurre, CAD atraviesa la membrana nuclear y degrada la cromatina nuclear en forma de ladder. Estos experimentos ha puesto de manifiesto de forma clara una relación directa entre la activación de las caspasas y la degradación oligonucleosomal de la cromatina nuclear^{28,29}.

Regulación de la apoptosis: genes antiapoptóticos

Como se ha comentado anteriormente, otro de los genes esenciales en la regulación del proceso apoptótico es CED-9. El homólogo en vertebrados superiores de este gen es Bcl-2 (Revisado por Adams y Cory, 1998)³⁰. Este gen fue descrito por primera vez como una mutación oncogénica propia de determinados linfomas centrolímbicos, que se caracteriza-

ban porque las células neoplásicas no presentaban un incremento en su velocidad de crecimiento, sino por ser resistentes a la apoptosis. En realidad, existe toda una familia de genes relacionados estructuralmente con bcl-2 —más de quince— que pueden tener funciones similares a Bcl-2 (protectoras), como por ejemplo Bcl-X_L o incluso funciones antagónicas (proapoptóticas), como por ejemplo Bax. La conservación de la homología estructural entre los distintos miembros de la familia se concentra en cuatro dominios que reciben el nombre de BH (Bcl-2 homology domains) (fig. 4). Los distintos miembros son capaces de formar dímeros en interacciones homo y heterofílicas. Este tipo de interacción depende, fundamentalmente, de los dominios BH1, BH2 y BH3. Por otra parte, parece que la función proapoptótica reside en el dominio BH3 e incluso hay miembros proapoptóticos de la familia cuya única homología entre ellos es la de poseer un dominio BH3 (fig. 4). Aparentemente, el dominio BH4 está funcionalmente implicado en el carácter inhibitorio de la apoptosis de Bcl-2 y Bcl-X_L. Este último, es capaz de unirse a Apaf-1 a través de este dominio. Cuando esto ocurre se altera la unión de Apaf-1 con caspasa-9 y, por tanto, impide la activación de ésta última. Por otra parte, Bcl-2 es capaz, directa o indirectamente, de impedir la salida de citocromo c desde la mitocondria al citoplasma. Esta podría ser una de las principales vías por las cuales Bcl-2 impide la apoptosis. Sin embargo, no es la única, ya que se ha demostrado que Bcl-2 sigue siendo capaz de proteger de la apoptosis aun cuando se consigue incrementar la concentración de citocromo

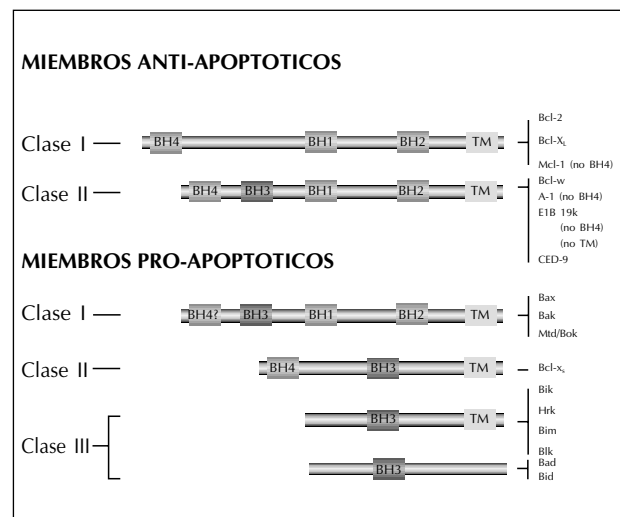


Fig. 4.—Clasificación de la familia de proteínas Bcl-2 basada en la organización de los dominios. Están resaltados los llamados «dominios de homología a Bcl-2» (BH o Bcl-2 homology) y el dominio transmembranario (TM o transmembrane domain).

C en el citoplasma, por ejemplo, microinyectándolo. Se cree que la mayor parte de los homólogos de Bcl-2 con funciones proapoptóticas realizan esta función por antagonismo directo (unión) con los genes protectores, llevándolo a cabo a través del dominio BH3.

Implicaciones en patología renal

Si nos guiamos por el número de artículos publicados y registrados por MEDLINE que presentan como palabras claves «apoptosis», «riñón» y «patología», la implicación de la apoptosis en patología renal parece escasa (288 artículos en total). Este dato puede compararse con el obtenido en otros ámbitos como, por ejemplo, el cáncer (6.308 artículos), el sistema inmune (1.431 artículos) o el hematopoyético (4.312 artículos). Sin embargo, quizá lo más sorprendente es la distribución temporal de estos artículos. Así, si analizamos la figura 5 veremos que la mayor parte de estos artículos se han realizado en los 2 últimos años. Más concretamente, desde enero de 1996 hasta octubre de 1998 se publicaron 214 artículos (un 75% del total). Por tanto, podemos concluir que este es un campo en clara expansión y que, probablemente, en el futuro inmediato haya multitud de nuevos estudios para explicar la patogenia de determinadas enfermedades renales y, porque no, posibles nuevas estrategias terapéuticas basadas en alteraciones apoptóticas.

La insuficiencia renal crónica se inicia, en muchos casos, con alteraciones glomerulares, sin embargo, la fibrosis intersticial y la atrofia tubular son mejores indicadores pronósticos de la progresión de la enfermedad que la patología glomerular. La atrofia tubular suele ser una descripción patológica caracterizada por la ausencia de células epiteliales de los túbulos renales. Sin embargo, los mecanismos que regulan este proceso de atrofia tubular permanece sin esclarecer. La imagen clásica de la fisiopatogenia de este fenómeno indicaba que las células epiteliales desaparecían debido a una muerte isquémica que era consecuencia de la disminución de flujo sanguíneo de los vasos rectos. Sin embargo, la muerte isquémica suele cursar con muerte necrótica y un alto grado de inflamación; estos fenómenos no son observados, normalmente, en la mayor parte de insuficiencias renales crónicas. Una alternativa a este modelo fue propuesta, más recientemente, indicando que la desaparición de células epiteliales tubulares podría ser consecuencia de fenómenos apoptóticos; demostrado en determinadas patologías renales humanas y en modelos animales de insuficiencia renal crónica. Esta apoptosis, como base fisiopatológica de la desaparición de células epiteliales tubulares, se basa en incrementos de la expresión de Fas por parte de estas células. La elevación

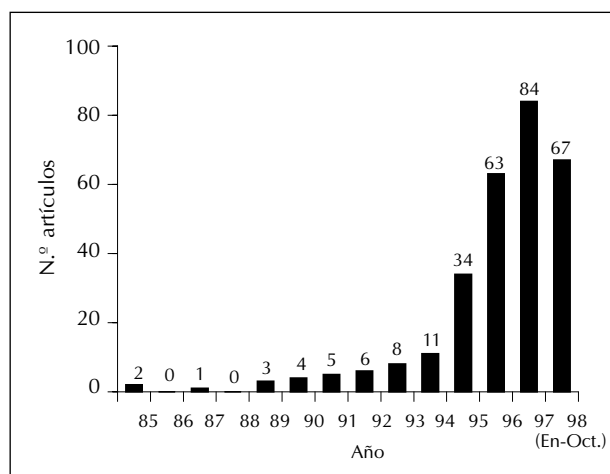


Fig. 5.—Gráfica representativa del número de apoptosis y patología renal (datos obtenidos mediante búsqueda realizada sobre los artículos registrados en MEDLINE).

de interleuquina-1 β y de TNF- α citoquinas que se encuentran elevadas en procesos de insuficiencia renal crónica, podría explicar el incremento en la expresión de Fas en estas células. Por otra parte, el ligando de Fas es expresado constitutivamente por este mismo tipo celular con lo cual, la inducción de Fas en una célula sería suicida para ella³¹. A partir de estos resultados, parece claro que uno de los mecanismos para luchar contra la progresión de esta enfermedad serían las estrategias encaminadas a prevenir la apoptosis mediada por el incremento de expresión de Fas.

En el caso de la nefritis mesangial proliferativa también se ha podido comprobar que, además de un incremento en la proliferación celular, existe una sobreexpresión de bcl-2 que conduciría a una mayor resistencia a la apoptosis de estas células. Esto contribuiría, a su vez, a un incremento de la celularidad total³².

Otros estudios en los que se ha asociado patología renal con alteración en el número de células apoptóticas incluyen la poliquistosis renal³³, nefropatía for IgA³⁴ o la esclerosis glomerular³⁵. Sin embargo, en estos estudios no existe una explicación fisiopatológica que justifique el incremento de apoptosis.

En definitiva, el campo de estudio del fenómeno apoptótico y de los mecanismos moleculares que lo regulan está en clara expansión. Su mayor implicación en patología renal es, simplemente, una cuestión de tiempo.

Agradecimientos

El trabajo del grupo de neurobiología molecular está financiado por CICYT PN-SAF (97-0094), Unión Europea Biotech (BIO4-CT96-0433), Fundación Fran-

cisca de Roviralta, Generalitat de Catalunya, Telemarató de TV3 y Ayuntamiento de Lleida.

JRB y VJY son becarios postdoctoral y predoctoral, respectivamente, del proyecto BIO4-CT96-0433.

BIBLIOGRAFIA

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.
2. Cryns V, Yuan J: Proteases to die for. *Gene Dev* 12: 1551-1570, 1998.
3. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR: Caenorhabditis elegans Gene ced-9 Protects Cells from Programmed Cell Death. *Nature* 356: 494-499, 1992.
4. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75: 641-652, 1993.
5. Shaham S, Horvitz R: Developing Caenorhabditis elegans neurons may contain both cell-death protective and killer activities. *Gene Dev* 10: 578-591, 1996.
6. Hengartner MO, Horvitz HR: C-elegans cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl 2*. *Cell* 76: 665-676, 1994.
7. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES: CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Cancer Res* 269: 30761-30764, 1994.
8. Zou H, Henzel WJ, Liu XS, Lutschg A, Wang XD: Apaf-1, a human protein homologous to C-elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413, 1997.
9. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Huebner K, Black RA: Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme. *Science* 256: 97-100, 1992.
10. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, Elliston KO, Ayala JM, Casano FJ, Chin J, Ding GJF, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM, Rolando AM, Salley JP, Yamin TT, Lee TD, Shively JE, Maccross M, Mumford RA, Schmidt JA, Tocci MJ: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356: 768-774, 1992.
11. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171-171, 1996.
12. Wilson KP, Black JAF, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, Livingston DJ: Structure and mechanism of interleukin-1 β converting enzyme. *Nature* 370: 270-275, 1994.
13. Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labes M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW: The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Struct Biology* 3: 619-625, 1996.
14. Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW: Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272: 9677-9682, 1997.
15. Thornberry NA, Ranon TA, Pieterse EP, Rasper DM, Timkey T, García Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW: A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B - Functional, relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272: 17907-17911, 1997.
16. Cryns V, Yuan J: The cutting edge: caspases in apoptosis and disease, in *When cells die: a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*, edited by Zakeri Z, Tilly J, Lockshin RA, New York, NY, Johns Wiley & Sons, 1998, p. 177.
17. Reed JC: Cytochrome C: can't live with It-Can't live without it. *Cell* 91: 559-562, 1997.
18. Kluck RM, Bossywetzel E, Green DR, Newmeyer DD: The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136, 1997.
19. Yang J, Liu XS, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai JY, Peng TI, Jones DP, Wang XD: Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132, 1997.
20. Liu XS, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang XD, JB: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 86: 147-157, 1996.
21. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C: Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome C. *Nature* 391: 496-499, 1998.
22. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang XD: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489, 1997.
23. Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.
24. Hofmann K, Bucher P: The CARD domain: A new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22: 155-156, 1997.
25. Ashkenazi A, Dixit VM: Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308, 1998.
26. Rudel T, Bokoch GM: Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-1574, 1997.
27. Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC: Studies of the lamin protease reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92: 9042-9046, 1995.
28. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, 1998.
29. Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99, 1998.
30. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326, 1998.
31. Schelling JR, Nkemere N, Kopp JB, Cleveland RP: Fas-dependent fratricidal apoptosis is a mechanism of tubular epithelial cell deletion in chronic renal failure. *Lab Invest* 78: 813-824, 1998.
32. Uda S, Yoshimura A, Sugeno Y, Inui K, Taira T, Ideura T: Mesangial proliferative nephritis in man is associated with increased expression of the cell survival factor, Bcl-2. *Am J Nephrol* 18: 291-295, 1998.
33. Woo D: Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *New Engl J Med* 333: 18-25, 1995.
34. Tashiro K, Kodera S, Takahashi Y, Horikoshi S, Shirato I, Tomino Y: Detection of apoptotic cells in glomeruli of patients with IgA nephropathy. *Nephron* 79: 21-27, 1998.
35. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota A: Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49: 103-111, 1996.