

El suicidio celular: La muerte necesaria para la vida

Santos A. Susín

Directeur de Recherche au CNRS

Responsable del equipo “*Cell Death and Drug Resistance in Lymphoproliferative Disorders*”

Centre de Recherche des Cordeliers. París (Francia)

Premio a la Investigación de la Academia 2013. Sección de Naturales

1 Introducción

Cada uno de nosotros nacemos de una célula, resultado de la fusión de un óvulo y un espermatozoide. A partir de esta célula inicial nos transformamos progresivamente en una nebulosa de miles de millones de células cuya interacción engendrará nuestro cuerpo. Es por esto que toda cuestión sobre nuestra vida y nuestra muerte abre un interrogante sobre los mecanismos que determinan la vida y la muerte de nuestras células.

Pasado el estado embrionario de blástula, la muerte es necesaria para el desarrollo de las etapas que permitirán la diferenciación de las familias celulares que constituirán nuestro cuerpo de adulto. La muerte dibuja también nuestra forma interna y externa, la de nuestros brazos y piernas, y la que eliminará el tejido que une nuestros dedos permitiendo su individualización. La muerte hace desaparecer los bocetos de órganos genitales del sexo opuesto, inicialmente presentes en nuestro cuerpo, y juega también un papel crucial en los fenómenos epigenéticos de auto-organización que permitirán el desarrollo correcto de nuestros dos órganos más complejos, el cerebro y el sistema inmune, soportes de nuestra memoria y de nuestra identidad.

A lo largo de un siglo y medio de investigación se ha ido construyendo la noción contraintuitiva de que nuestras células poseen el poder de autodestruirse por un mecanismo llamado suicidio celular o muerte celular programada. Este proceso de autodestrucción está representado por varias vías moleculares, la más conocida de ellas se denomina apoptosis. El trabajo desarrollado por numerosos grupos de investigación desde los años 70

del siglo pasado nos muestra que el destino de cada célula dependerá de la naturaleza de las interacciones que tendrá con las células de su entorno. Así, cada célula recibe en todo momento señales que le indicarán si tiene que morir o puede seguir viviendo. De esta interdependencia absoluta dependerá nuestra existencia como individuo. La muerte celular programada es, por tanto, un proceso fisiológico esencial en los eucariotas superiores (levaduras, plantas, mohos, nematodos, insectos y vertebrados).

¿De qué naturaleza es el programa que permite a las células autodestruirse? ¿Cuáles son los actores responsables de las modificaciones que conlleva la muerte celular? ¿Podemos controlar la vida y la muerte de nuestras propias células? La respuesta a estas preguntas, que en definitiva son la búsqueda de la regulación de nuestra vida y nuestra muerte, ha ocupado gran parte de mi carrera científica.

2 En la salud y en la enfermedad

Desde que nacemos nuestro cuerpo de niño y de adulto es como un Ave Fénix que renace segundo a segundo. En realidad, el sentimiento que tenemos de perennidad corresponde a una ilusión puesto que cada día decenas de millones de nuestras células se autodestruyen y son reemplazadas por células nuevas (se calcula que al menos 108 células mueren cada día). En realidad, cada segundo de nuestra vida estamos muriendo y renaciendo. Podríamos decir que la imagen de la muerte que surge de la nada para eliminar con su guadaña al individuo es, al contrario, un escultor que permite la emergencia del individuo y el desarrollo de su complejidad.

Tal es la importancia del suicidio celular que fallos en los mecanismos que lo regulan están relacionados con patologías como la isquemia cerebral, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington), cardiovasculares, autoinmunes (lupus eritematoso, artritis reumatoide, diabetes tipo I), el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y el cáncer. En muchas de estas enfermedades, la desaparición anormal de células resulta de una activación inapropiada de la autodestrucción. Modelos animales que reproducen estas patologías o tratamientos con inhibidores de la autodestrucción han resultado eficaces bloqueando el desarrollo de una determinada enfermedad. Estas estrategias, aunque poseen un gran potencial médico, no están exentas de riesgo, puesto que podrían favorecer la aparición de otras enfermedades como el cáncer, que se desarrolla en parte por la incapacidad de las células a activar su programa de suicidio.

Aunque no conducen a una modificación espectacular del número de células, las enfermedades infecciosas nos han revelado la fascinante complejidad del juego de vida y muerte que han librado los microbios y los seres vivos a los que infectan. El suicidio de la célula en respuesta a una infección es una de estrategia de defensa ancestral y muy utilizada.

Numerosas plantas utilizan la estrategia denominada de “tierra quemada” en respuesta a las infecciones. Esta respuesta está caracterizada por reacciones de hipersensibilidad que implican fenómenos de autodestrucción localizados y genéticamente controlados. En los insectos, esta misma estrategia se reveló por el descubrimiento de que la capacidad que los baculovirus tienen para propagarse depende de la presencia de dos proteínas virales, p35 e IAP, que bloquean la autodestrucción en respuesta no sólo a la infección sino también a los ataques del sistema inmune. De hecho, ciertos virus, bacterias y parásitos poseen la capacidad de provocar la autodestrucción de las células del sistema inmune que les amenaza. Podemos decir que el control de la vida y de la muerte está en el centro de los combates que determinan en nuestro cuerpo la persistencia o la eliminación de microbios y el desarrollo o no de enfermedades infecciosas.

3 Un poco de historia

En 1972, Kerr, Wyllie y Currie definen la necrosis como la muerte celular violenta y/o accidental generada por un estímulo externo que provoca la desorganización rápida e incontrolada de la homeostasis celular (golpes, quemaduras, etc). Por oposición, estos mismos autores definirán con el término apoptosis (derivado del griego caída natural de las hojas en otoño) un proceso de autodestrucción celular altamente regulado y con características morfológicas bien definidas. Como la mitosis y la diferenciación, estos autores convertirán a la apoptosis en una de las grandes funciones celulares.

Al definir la primera forma de suicidio celular, Kerr, Wyllie y Currie hacían referencia a células que presentaban, respecto a células normales, una condensación anormal de la cromatina, la fragmentación del ADN, burbujas en la membrana plasmática (zeiosis) y una disminución en el volumen celular. Posteriormente, se demostró que tanto las células normales como las patológicas, activaban un programa de suicidio intrínseco en determinadas circunstancias y que la morfología descrita por Kerr y colaboradores correspondía a células que estaban muriendo y habían activado dicho programa. Las primeras características bioquímicas que se describieron en las células apoptóticas fueron la fragmentación internucleosomal de la cromatina en fragmentos regulares de 180 pares de bases y la translocación del lípido fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática. Pronto se averiguó también que las células muertas mediante apoptosis son eliminadas por macrófagos tisulares, antes de que se produzcan pérdidas del contenido intracelular que podrían dañar a otras células o provocar una inflamación del tejido. Por este motivo, habitualmente el número de células apoptóticas que se pueden detectar *in vivo* es muy reducido, aun en situaciones en las que se producen en gran número, como durante el desarrollo del sistema nervioso o la eliminación de linfocitos después de una

infección.

Hoy sabemos que la apoptosis, que se define actualmente como muerte celular “clásica” o dependiente de caspasas (una familia de proteasas específica de esta forma de suicidio -ver capítulo 5 de esta síntesis-) no es el único programa de autodestrucción que poseen las células. Numerosas vías, llamadas alternativas, atípicas o independientes de caspasas, han sido identificadas a lo largo de estos últimos años. La célula seleccionará en un momento y en una situación particular (estadio de desarrollo, tejido, tipo celular, estímulo externo, etc.) la vía molecular por la cual se autodestruirá. ¿Por qué la célula selecciona una u otra forma de morir? Aún no hay respuesta a esta pregunta. Sin embargo, hemos descifrado tanto los mecanismos moleculares que caracterizan la apoptosis mediada por las caspasas, como una gran parte de los mecanismos que regulan estas rutas alternativas de suicidio celular, algunas de ellas tan relevantes para la fisiología humana que han merecido un “nombre propio”: anoikis, pyroptosis, necroptosis, entosis, catástrofe mitótica, cornificación, ferroptosis o netosis.

Tal es la complejidad de formas de suicidio que existen en la célula que, para simplificar, los investigadores en este campo hablamos de muerte celular programada caspasa-dependiente o caspasa-independiente (según las caspasas intervengan o no en el proceso de autodestrucción celular). En todo caso, la variedad de formas de suicidarse que la célula ha desarrollado a lo largo de la evolución nos confirma la complejidad y la importancia que tiene este proceso en el delicado equilibrio de la vida.

4 Del nematodo al hombre, no tan diferentes a la hora de morir ...

Uno de los hitos fundamentales en el estudio del suicidio celular fue la identificación de la función de los genes que regulan el proceso en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. John Sulston, Sydney Brenner y Robert Horvitz recibieron el Premio Nobel de medicina en el año 2002 por demostrar que la vida y la muerte de cada una de las células del embrión de este gusano depende de la actividad de 4 genes: *egl-1*, *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (del inglés *cell death*). La proteína Ced-3 es a la vez ejecutor y responsable del fenotipo de la célula moribunda. Ced-3 es una proteasa a cisteína, similar a las caspasas, sintetizada por la célula en forma de precursor inactivo. Ced-4 es un activador que se une a Ced-3 para generar la caspasa activa. Ced-9 es un protector que se fija a Ced-4 y le impide activar Ced-3. Finalmente, Egl-1 es un antagonista de Ced-9 que se fija a él y neutraliza su efecto protector, permitiendo a la vez que Ced-4 active Ced-3 y provoque la muerte de la célula. Homólogos de estos 4 genes se han encontrado desde la mosca drosófila, al ratón y al ser humano. En el hombre se han identificado una veintena de homólogos del protector Ced-9 y de su antagonista Egl-1 (la familia Bcl-2/Bax), una quincena de homólogos del

ejecutor Ced-3 (la familia de las caspasas) y un homólogo del activador Ced-4 (llamado Apaf-1 -Apoptotic Protease Activating Factor 1-). La persistencia de estas proteínas a lo largo de la evolución muestra una vez más la relevancia fisiológica del suicidio celular.

El hallazgo de los actores que gobiernan la muerte celular programada ha permitido estudiar los mecanismos moleculares implicados en este proceso. Se sabe actualmente que el suicidio celular utiliza varias vías intracelulares que se diferencian esencialmente en las etapas iniciales, de “inducción”, y se interconectan en la fase final, de “ejecución”. Por ejemplo, la llamada ruta de los “receptores mortales”, también denominada “ruta extrínseca”, se inicia cuando un mensajero extracelular se une a un receptor específico de la membrana plasmática. Los principales mensajeros de esta ruta son las proteínas Factor de Necrosis Tumoral (TNF), ligando de Fas (FasL) y ligando de Apo2 (Apo2L), también conocido como TRAIL. La unión de estas proteínas a sus receptores celulares desencadena la cascada de activación de las caspasas y la muerte de la célula. Por otro lado, en respuesta a agentes externos, tales como compuestos citotóxicos o radiaciones nocivas para la célula, se inicia la denominada “ruta mitocondrial” o “intrínseca”. El daño producido por estos agentes desencadena diversas señales intracelulares que llegan a la mitocondria y causan la caída del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de proteínas proapoptóticas que provocará la muerte de la célula. La ruta “mitocondrial” en sus etapas iniciales está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2 y puede ser caspasa-dependiente o caspasa-independiente.

5 Las caspasas, la familia BCL-2 y la mitocondria: principales reguladores del suicidio regular

5.1 Las caspasas

En 1993 se clonó y secuenció ced-3, un gen esencial en la muerte celular programada que se produce durante el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, encontrándose que codificaba una proteína con similitud a ICE, proteasa descrita previamente en vertebrados. La caracterización de CPP32 (caspasa 3), proteasa homóloga de ICE, como el ejecutor apoptótico por excelencia en vertebrados superiores confirmó definitivamente la relevancia de esta familia de proteasas en el proceso de suicidio celular.

La palabra caspasa proviene de cisteín proteasa con especificidad de corte en aspártico y fue adoptada por convenio en 1996. Hasta el momento se han identificado 14 caspasas en mamíferos con ortólogos en especies como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*. Al menos 8 de las 14 caspasas identificadas están implicadas en la muerte celular y todas presentan características comunes en cuanto a secuencia de aminoácidos, estructura y especificidad por el sustrato. Las caspasas son sintetizadas como proenzimas

(zimógenos) que contienen tres dominios: el prodominio amino-terminal, la subunidad grande y la subunidad pequeña carboxilo-terminal. La subunidad grande contiene la cisteína del centro activo del enzima. Las caspasas se activan por proteólisis en dos etapas. La primera divide la cadena en las subunidades grande (20 kDa) y pequeña (10 kDa) y en el segundo corte se elimina el prodominio amino-terminal. La caspasa activa consiste en un complejo formado por dos subunidades grandes y dos pequeñas, conteniendo por tanto dos sitios activos de catálisis.

Las caspasas 3, 6 y 7, denominadas caspasas “ejecutoras”, dan lugar mediante el corte de distintos sustratos celulares a las alteraciones morfológicas y bioquímicas que caracterizan la apoptosis dependiente de caspasas. Por ejemplo, la fragmentación del DNA en fragmentos oligonucleosomales es debida a la activación de la nucleasa CAD (Caspase Activated DNase) al cortar la caspasa-3 la proteína que la retiene en el citosol, su inhibidor ICAD. Las caspasas ejecutoras también rompen e inactivan proteínas implicadas en la reparación del ADN, como PARP y DNA-PK, las láminas nucleares y proteínas del citoesqueleto, como la fodrina o la plectina, contribuyendo de esta manera a la aparición del fenotipo apoptótico. La externalización de la fosfatidilserina es generalmente dependiente de caspasas, aunque, en algunos tipos celulares, parece ser independiente de estas proteasas.

La actividad enzimática de las caspasas está regulada a su vez por la familia de los IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein), que fueron identificados en primer lugar en baculovirus por su habilidad para impedir la apoptosis de la célula anfitriona. Se han identificado 8 IAPs en mamíferos, entre los que se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP y la survivina. Los IAPs son inhibidores directos de caspasas y en concreto XIAP, c-IAP1 y c-IAP2, inhiben las caspasas 3, 7 y 9, pero no tienen capacidad de bloquear las caspasas 1, 6, 8 y 10. Otros dos inhibidores fisiológicos de caspasas son las proteínas p35 y CrmA (Cytokine Response Modifier A). p35 es también una proteína de origen baculoviral que inactiva las caspases uniéndose de forma covalente a la Cys del centro activo del enzima. CrmA es una serpina del virus de la viruela que inhibe específicamente las caspasas 1 y 8.

5.2 *La familia Bcl-2*

Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2 gene) fue descrito como un proto-oncogen resultado de la translocación cromosómica t(14;18)(q32;q21), que aparece en el linfoma folicular de células B y que yuxtapone el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14, con el gen bcl-2 en el cromosoma 18. La cadena pesada de las inmunoglobulinas posee promotores muy potentes y ello conduce a la sobre-expresión de Bcl-2 en los tumores que presentan esta translocación cromosómica.

La superfamilia Bcl-2 está formada por proteínas homólogas a Bcl-2 e incluye proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) y proapoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bik, Bim, Hrk, Puma, Noxa). Las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 pueden a su vez clasificarse en dos grupos. El primero de ellos lo integran aquellas proteínas que presentan en su secuencia los dominios de homología BH1, BH2 y BH3, como Bax, Bak y Bok/Mtd. El segundo grupo, llamado frecuentemente “BH3-only”, incluye a todas aquellas proteínas de la familia que contienen únicamente el dominio de homología BH3. En mamíferos, se han identificado 10 proteínas pertenecientes a esta subfamilia (Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Blk, Hrk, Noxa, Bnip3, Puma y Bmf).

Las proteínas de la familia Bcl-2 participan principalmente en la regulación de la salida de proteínas proapoptóticas de la mitocondria hacia el citoplasma y el núcleo. Los miembros antiapoptóticos de la familia inhiben la liberación de proteínas de la mitocondria, mientras que las proteínas proapoptóticas la favorecen. El mecanismo por el que los miembros de la familia Bcl-2 actúan todavía no se conoce con exactitud. Se han publicado numerosos trabajos en los que se demuestra que la translocación de Bax, Bid o Bim del citosol a la mitocondria favorece la permeabilización de la membrana externa de este organelo celular. Asimismo, en el caso de Bax y Bak, se ha descrito que durante la fase de inducción se produce un cambio de conformación que provoca la oligomerización de estas proteínas en la mitocondria. Dicho cambio favorecerá la inserción de determinadas regiones de la proteína en la membrana externa mitocondrial y la formación de poros a través de la misma. Por estos poros saldrán las proteínas proapoptóticas de la mitocondria hacia el citoplasma. La inactivación genética simultánea de los genes de Bax y Bak, pero no su inactivación individual, bloquea la muerte celular en muchos tejidos, lo que demuestra la relevancia de estas dos proteínas en el suicidio celular.

Finalmente, una gran cantidad de estudios han demostrado un papel esencial de las proteínas “BH3-only” en el cambio de conformación y oligomerización de los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2. Los datos publicados parecen indicar que existen dos subgrupos dentro de las “BH3-only” según su participación en la activación de Bax y Bak. El primer grupo, en el que se incluirían las proteínas Bad, Noxa y Bik, estaría formado por aquellas proteínas cuya función es la neutralización de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 localizadas en la mitocondria (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1), lo que permite la liberación de Bax y Bak, su cambio de conformación, oligomerización e inserción en la membrana externa mitocondrial. El segundo grupo de proteínas “BH3-only”, formado por las proteínas Bid, Bim y PUMA, sería capaz de interactuar directamente con Bax y Bak para inducir su activación.

5.3 La mitocondria, centro vital del suicidio celular

Considerada como fuente de energía, la mitocondria se ha revelado en los últimos años como “el centro” de decisión de la vida y la muerte de la célula. Como indicaron Jacobsen y Duchon “*the discoveries of the past years dictate a new mitochondrial biology encompassed in the principle that what nourishes me, destroys me*”. Es cierto que es difícil de aceptar que el organito que proporciona a la célula la energía necesaria para vivir, juegue un papel central en la decisión de hacerla morir. El trabajo de nuestro equipo ha demostrado que la mitocondria no sólo coordina las señales que recibe la célula para su autodestrucción sino que será en este organito donde se decidirá en gran parte el futuro de la célula. Su importancia es tal que una vez que la célula toma la decisión de morir la mitocondria abrirá su “caja de Pandora” y lanzará al citosol las armas (proteínas) que provocarán la autodestrucción. Algunas de estas armas letales, como el citocromo c o AIF (Apoptosis-Inducing Factor), realizan una función vital en el transporte electrónico de la mitocondria que permite la generación de la energía de la célula, el ATP. Una vez fuera de la mitocondria, estas dos proteínas serán efectores fundamentales en el proceso de autodestrucción. Aparte del citocromo c y de AIF otras tres proteínas mitocondriales participan en distintas vías de muerte celular: Smac/Diablo, EndoG y Omi/HtrA2.

La salida de citocromo c de la mitocondria será el punto inicial de una parte muy importante de la apoptosis “clásica” caspasa-dependiente. Una vez en el citoplasma, el citocromo c se unirá a la proteína adaptadora Apaf-1 y a la procaspasa-9 (forma inactiva de la caspasa-9). La formación de este complejo multiproteico, denominado apoptosoma, permitirá la activación de la caspasa-9 por autoproteolisis. Una vez activa, la caspasa-9 desencadenará una cascada proteolítica que provocará la activación sucesiva de la caspasa-3 y de CAD. Será esta última DNAsa la que cortará el ADN nuclear en los fragmentos de 180 pares de bases que caracterizan este tipo de suicidio.

Como el citocromo c, AIF es una proteína que reside normalmente en el espacio intermembrana de la mitocondria. Esta proteína, que identifiqué durante mis primeros años en Francia gracias a un trabajo de colaboración con el Dr. Hans K. Lorenzo del Instituto Pasteur de París, es la primera proteína que se identificó en la regulación del suicidio celular independiente de caspasas.

6 AIF: Una proteína clave en el suicidio celular independiente de caspasas

6.1 La proteína

Las 2500 citas del artículo publicado en *Nature* (1999, vol. 397, pp. 441-446) en el que describimos esta proteína nos permiten decir que AIF es un factor clave en la comprensión

del suicidio celular independiente de caspasas.

AIF es una proteína con homólogos presentes en los tres principales grupos o taxones en los que se considera subdividida la diversidad de los seres vivos: arqueas (Archaea), bacterias (Bacteria) y eucariontes (Eucarya). Si la comparamos con otras proteínas implicadas en el suicidio celular, como las caspasas, AIF es el arma de destrucción más ancestral que se conoce.

El gen de AIF se localiza en el cromosoma X, se sintetiza en forma de precursor de 67 kDa y se importa en la mitocondria gracias a dos secuencias de localización mitocondrial que se sitúan en la parte N-terminal de la proteína. En la mitocondria (no olvidar que este organito tiene cuatro compartimentos: membrana externa, espacio intermembrana, membrana interna y matriz) el precursor de AIF se procesa por la acción de peptidasas matriciales en la forma madura de la proteína (62 kDa). En esta configuración, AIF se une a la membrana interna de la mitocondria (con la parte N-terminal expuesta hacia la matriz mitocondrial y la parte C-terminal hacia el espacio intermembrana). La forma madura de AIF está dividida en tres dominios estructurales: dos dominios de óxido-reducción (con los sitios de fijación del NADH y del grupo prostético FAD) y una parte C-terminal dónde parece claro que se localiza la función letal de la proteína. Como en otras flavoproteínas, la región oxidoreductasa de AIF, compuesta por los dominios de unión al NADH y al FAD, adopta una conformación Rossmann que confiere capacidad de transferencia de electrones a la proteína. El cofactor FAD puede ser reducido, al menos *in vitro*, por el NAD(P)H. La forma reducida de AIF reduce a su vez moléculas como el citocromo c, confirmando la capacidad de oxido-reducción de la proteína. No hemos averiguado nada acerca de los “verdaderos” aceptores y dadores de electrones de AIF en la mitocondria. De hecho, tampoco se sabe si la función redox de AIF juega un papel importante en la función vital que describiremos más adelante. Sabemos, sin embargo, que el estado redox de AIF hará que la proteína se encuentre en la mitocondria en forma de monómero o de dímero. Parece ser que la transición monómero/dímero es clave en el cambio de conformación que permitirá a AIF desarrollar sus antagónicas funciones celulares. En todo caso, 15 años después de su descubrimiento AIF aún nos reserva muchas sorpresas.

Para los estudiosos del suicidio celular el dominio C-terminal de AIF es la parte más interesante de la molécula puesto que es aquí dónde se sitúa su poder de autodestrucción. La región C-terminal de AIF se estructura en cinco α hélices, dos β hélices y un loop (amino ácidos 509-559) sin estructura precisa que no guarda homología con ninguna otra proteína conocida. Es en este loop dónde se inserta una región PEST seguida de un dominio rico en prolinas (PPSAPAVPQVP). Como nuestro equipo ha descrito recientemente, esta región es clave en la función letal que puede desarrollar este factor mitocondrial.

La eliminación de AIF en el ratón provoca una parada prematura del desarrollo em-

brionario. De hecho, ha sido imposible generar ratones AIF knockout. Inicialmente se pensó que la disrupción del gen de AIF impedía la primera ola de muerte celular que existe en el desarrollo embrionario (formación del blastocele). Sin embargo, estudios complementarios demostraron que la muerte de los embriones de ratón AIF KO se produce al noveno día de gestación. Desgraciadamente no está claro si la muerte *in útero* de los embriones AIF KO es debida a deficiencias en la mitocondria asociadas a la falta de la proteína o bien por la imposibilidad de activar el proceso de autodestrucción necesario al desarrollo embrionario. Nuevos modelos animales, actualmente en preparación en nuestro laboratorio, nos permitirán sin duda clarificar la importancia de AIF en el desarrollo de los vertebrados.

6.2 ¿Qué sabemos de la función vital de AIF?

Trabajos científicos realizados principalmente en los ratones Harlequín, ratones en los que la expresión de AIF se ha reducido en un 80 % por una inserción proviral en el promotor de la proteína, sugieren que AIF participa en la eliminación de los radicales libres generados en el transporte electrónico mitocondrial. Lo que sí es cierto es que la pérdida de AIF afecta la fosforilación oxidativa puesto que AIF es necesario para estabilizar el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Además, la presencia de AIF en la mitocondria permite a este organito mantener su estructura correcta. Así, enfermos con X-linked encephalomyopathy o Cowchock syndrome (encefalopatías mitocondriales asociadas a mutaciones en el gen de AIF) presentan mitocondrias modificadas y no funcionales.

6.3 ¿y de su salida de la mitocondria y de su función letal?

Como se ha indicado previamente, la forma madura de AIF (62 kDa) se une a la membrana interna de la mitocondria para realizar su función vital. Cuando la célula decida su suicidio, la mitocondria dejará salir AIF hacia el citoplasma para que se vaya al núcleo e induzca la fragmentación del ADN que caracteriza la muerte celular independiente de las caspasas (fragmentos de 50 kb). Sabemos que para liberarse de la membrana mitocondrial AIF se cortará en la posición G102/L103 lo que generará una proteína soluble de 57 kDa (llamada truncated AIF o tAIF). Nuestro trabajo ha demostrado que el corte y la salida de AIF de la mitocondria está controlado por la activación de las calpains (proteasas dependientes de calcio) o de las catepsinas y sin la intervención de las caspasas. En un ejemplo clásico de suicidio celular inducido en células tumorales (el provocado por el tratamiento con agentes alquilantes del ADN), la calpaina I cortará AIF en tAIF y al mismo tiempo activará por corte la proteína de la familia Bcl-2 Bid que a su vez permitirá

que el factor proapoptótico Bax forme un poro en la membrana externa de la mitocondria por dónde saldrá tAIF hacia el citoplasma celular. Una vez en el citoplasma, tAIF cambiará su conformación proteica lo que le permitirá exponer dos secuencias (normalmente ocultas) de localización nuclear que enviarán tAIF hacia el núcleo. Aquí tAIF interactuará con una DNAsa (la ciclofilina A) y una histona (H2AX) para formar un complejo multi-proteico que provocará finalmente la degradación del ADN y la muerte de la célula tumoral.

En otros sistemas de muerte celular se ha demostrado que AIF puede también colaborar con otras DNAsas, como la Endonucleasa G. De hecho, se ha descrito la intervención de AIF en más de 100 sistemas de inducción de suicidio celular, muchos de ellos activados por drogas utilizadas en quimioterapia. Tratamientos que favorecen la acción de la proteína o provocan su salida de la mitocondria están actualmente en pleno desarrollo, por ejemplo, para tratar las formas resistentes de cáncer de mama o algunos tipos de leucemias.

7 El suicidio celular y el cáncer

7.1 Generalidades

Pensamos que la transformación tumoral no es sino el resultado de un cúmulo de alteraciones genéticas que provoca la proliferación celular incontrolada. Hoy sabemos que el bloqueo precoz del suicidio celular es una de las claves en el desarrollo del cáncer. Efectivamente, el concepto inicialmente vago de la “inmortalidad” de las células tumorales posee hoy en día una base molecular bien definida. Pero esta inmortalidad es una noción relativa, ya que toda célula tumoral conserva alguno de los ejecutores que controla su autodestrucción. Son estos ejecutores que la radio y/o la quimioterapia pretenden activar. Por otro lado, tratamientos que bloquean selectivamente la activación de algunos oncogenes son suficientes para que la célula maligna ponga en marcha su propio suicidio.

Durante varias décadas el estudio del cáncer se centró principalmente en la comprensión de los mecanismos que controlan la división celular. La hipótesis en esos momentos era que el origen de los procesos tumorales se encontraba exclusivamente ligado a la desregulación del ciclo celular, lo que provocaba una proliferación incontrolada de la célula. Fruto de estos estudios fue el descubrimiento de varios oncogenes relacionados con el control de ciclo celular. Algunos de estos oncogenes, como *Ras*, codifican moléculas de transducción de señales y sus mutaciones provocan una división celular incontrolada. Otras mutaciones alteraban el crecimiento celular al inactivar genes que regulan el ciclo de la célula, como es el caso de la proteína pRb y las CDKs (ciclina dependientes de kinasas). También son frecuentes las mutaciones que afectan a la regulación de la expresión de Myc, otro oncogén

implicado en el control de la proliferación celular. Todas estas alteraciones genéticas conducen a la desregulación de la proliferación celular, pero también a la inhibición de la diferenciación de estas células impidiendo su correcta eliminación. En definitiva, hoy se sabe que la oncogénesis requiere en algunos casos un alto grado de proliferación pero también una elevada resistencia a la muerte celular. Así, el mal funcionamiento de los efectores clave en la cascada de señales que lleva a la autodestrucción es una de las causas de la tumorigénesis.

En este campo, a principios de los 90, investigadores australianos del “Walter and Eliza Hall Institute” publicaron dos trabajos en los que se demostraba que la sobre-expresión conjunta de c-Myc y Bcl-2, considerado entonces como un posible oncogen, favorecía la aparición de tumores en ratones. Además, se demostraba que Bcl-2 favorecía la supervivencia pero no la proliferación celular. Estos hallazgos supusieron un notable avance en el conocimiento de los procesos tumorales, ya que el gen que codifica para la proteína Bcl-2 se sobre-expresa en un porcentaje elevado de tumores.

Uno de los genes que frecuentemente está mutado en las células tumorales es TP53. Este gen tiene una doble función, como “guardián” del ciclo celular y como supresor de tumores mediante la inducción del suicidio celular. Durante la división celular se han diseñado a lo largo de la evolución mecanismos moleculares de control para evitar los fallos en la replicación del ADN. Cuando se detecta un error o un daño en el ADN, la maquinaria de división celular se detiene para permitir la reparación del error, gracias a la acción de p53. Cuando este daño al ADN es muy importante e irreparable, p53 emitirá una serie de señales que culminarán con la muerte de la célula. El organismo intenta así evitar la propagación de células mutadas que puedan ser potencialmente peligrosas. Desgraciadamente, cuando se producen alteraciones en TP53, el gen que codifica p53, este “control de calidad” deja de funcionar y la frecuencia de mutaciones aumenta, incrementándose por lo tanto la probabilidad de que se produzca un tumor. Es importante señalar que aproximadamente un 50% de los tumores descritos en el hombre presentan alteraciones que inactivan la función de autodestrucción de p53. En esta función, p53 puede actuar como un factor de transcripción que activará genes implicados tanto en la vía “extrínseca” como en la vía “intrínseca” mitocondrial de suicidio celular o inducir la muerte mediante mecanismos independientes de la transcripción, por ejemplo, actuando directamente en la mitocondria y favoreciendo la permeabilidad de su membrana externa. Entre las proteínas cuya expresión se induce en respuesta a la activación de p53 se encuentran los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bax, Noxa y PUMA (p53-Upregulated Modulator of Apoptosis), la proteína del apoptosoma Apaf-1 y los receptores de membrana inductores de apoptosis Fas o DR4.

La relación entre el suicidio celular y el cáncer no sólo se reduce Myc, Bcl-2 o p53.

En ciertos tumores se han descrito alteraciones en la ruta “extrínseca” de apoptosis. Por ejemplo, mutaciones que inactivan los receptores, los ligandos mortales o la caspasa-8. También se pueden detectar en algunos casos sobre-expresión de factores inhibidores de apoptosis, como FLIP o los IAPs. Finalmente, otros tipos de cáncer, como la leucemia linfática crónica de células B (LLC), están causados principalmente por la inhibición del programa “intrínseco” mitocondrial de autodestrucción. La inhibición del suicidio celular está relacionada en esta leucemia con los altos niveles de expresión que presentan proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, como la propia Bcl-2 o Mcl-1.

7.2 La muerte celular y el tratamiento del cáncer

El tratamiento de una gran parte de las patologías tumorales detectadas en humanos se basa en el uso de drogas citotóxicas que actúan induciendo el suicidio celular. Como he indicado en el capítulo anterior, uno de los problemas más importantes que se producen frecuentemente como respuesta a estos tratamientos es la aparición de células tumorales resistentes: defectos en la acumulación de fármacos, mutaciones en p53 y alteraciones en el programa de muerte celular. Por este motivo, una de las prioridades actuales en el estudio del suicidio celular aplicado al cáncer es la comprensión de los mecanismos bioquímicos implicados en la muerte de las células tumorales que se induce en quimioterapia. La comprensión de estos mecanismos permitirá conocer el porqué de la resistencia a la quimioterapia y, a partir de allí, diseñar drogas que puedan evitarla. Otros equipos de investigación, incluido el nuestro, se concentran en el desarrollo de nuevas drogas capaces de evitar la aparición de resistencia al tratamiento, especialmente en aquellas patologías tumorales en las que la tasa de respuesta a la quimioterapia es muy baja, como el mieloma múltiple, el melanoma, el glioblastoma o los cánceres de colon, de pulmón o de páncreas, o en aquellas patologías tumorales en las que es frecuente la recaída tras el tratamiento inicial, como el cáncer de mama o algunos tipos de linfomas.

En este contexto, nuestro equipo de investigación está interesado actualmente en el diseño de drogas que sean capaces de evitar la resistencia que caracteriza la LLC, la leucemia más importante del adulto en los países occidentales. Nuestra estrategia es inducir el suicidio celular por vías alternativas independientes de caspasas. Estas vías pueden ser independientes no sólo de esta familia de proteasas sino también de la familia Bcl-2 o de p53. Desde el año 2007 nuestro equipo, formado también por una gran parte del servicio de hematología del hospital Pitié-Salpêtrière de París (el servicio hospitalario que recibe más enfermos de LLC de toda Europa), se ha concentrado en la inducción del suicidio celular por estimulación del receptor CD47 en los linfocitos B de LLC. La estimulación de este receptor induce la muerte de las células tumorales y no de las células sanas del paciente. Para ello utiliza un mecanismo muy eficaz que es independiente de

p53 y de otros efectores de las vías dependientes de caspasas. En colaboración con un equipo de químicos de la Escuela Normal Superior (ENS) de París, se está trabajando en el diseño de nuevas drogas mas eficientes que las actuales y con una mejor afinidad por el receptor CD47. Creemos que a través de estos estudios podremos ofrecer en poco tiempo una nueva terapia para el tratamiento de esta leucemia, hoy considerada incurable.

8 Conclusión

Pensamos que la desaparición de nuestras células —como nuestra propia desaparición— es el resultado de una incapacidad a resistir tanto al paso del tiempo como a las agresiones de nuestro entorno. Sin embargo, ahora sabemos que las células tienen la capacidad de decidir, de forma individual, el momento y la forma de su muerte.

Después de 20 años de investigación buscando un programa genético que defina la muerte de la célula, hoy parece que ese programa es una ilusión. La autodestrucción es una de las múltiples posibilidades que nuestras células utilizan a partir de la información genética que compone su programa de vida. Vivir es utilizar permanentemente actores moleculares que, en todo momento, pueden provocar o reprimir la muerte. Esos actores controlarán no sólo el suicidio sino también el metabolismo, la diferenciación y la división celular. Podemos decir que la investigación de las bases moleculares del suicidio celular ha permitido saber que la vida y la muerte están más unidas que nunca a nivel molecular. Esta noción no es sólo teórica, puesto que tiene implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas, como hemos descifrado en esta síntesis.

Mirando de frente a la muerte de nuestras células y analizando los mecanismos que la controlan hemos podido progresar en nuestra comprensión del ser vivo. Continuar por este camino debería permitirnos conquistar el poder de reconstruirnos y de prolongar nuestra existencia. En todo caso, el control de la vida y de la muerte de nuestras células es uno de los retos más importantes para la Biología y la Medicina del siglo XXI.