

Muerte celular programada: II. Papel en el desarrollo y función de las células linfoides del sistema inmune

Masyelly Rojas, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta

Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela

Recibido Abril 24, 2010. Aceptado Mayo 15, 2010

PROGRAMMED CELL DEATH: II.ROLE IN THE DEVELOPMENT AND FUNCTION OF LYMPHOID CELLS IN THE IMMUNE SYSTEM

Resumen

La muerte celular programada representa para el sistema inmune una de sus principales herramientas a fin de mantener la homeostasis. Este proceso es altamente eficiente al controlar el desarrollo y activación de las células linfoides tanto a nivel de los órganos linfoides primarios como secundarios. Por lo tanto, durante la ontogenia se activan mecanismos de selección positiva y negativa, a fin de evitar el desarrollo y maduración de linfocitos potencialmente autorreactivos. La selección negativa se genera por la presencia de linfocitos con alta afinidad por antígenos propios, lo que condiciona la activación de mecanismo de muerte por apoptosis. En el caso de linfocitos maduros activados en la periferia, el sistema debe asegurar que sobrevivan los linfocitos con alta afinidad por los antígenos extraños, mediando así la activación de los eventos de muerte celular en aquellos con baja afinidad por estos antígenos. Los eventos que activan y conducen a la muerte celular son diferentes en los distintos estadios de maduración. En esta revisión se discutirán los eventos de la muerte celular que controlan el desarrollo de selección de estas subpoblaciones linfocitarias

PALABRAS CLAVE: apoptosis, muerte celular programada, linfocitos, ontogenia, vía extrínseca y vía intrínseca.

Abstract

Programmed cell death (PCD) is one of the most important mechanisms for the immune system to maintain the homeostasis. This process is highly efficient in the control of lymphocyte development and activation, in both primary and secondary lymphoid tissues. Hence, during the ontogeny the immature lymphocytes go through positive and negative selection, in order to prevent potential autoreactive lymphocytes, to reach peripheral tissues. Therefore, negative selection is activated against every immature lymphocyte that show a high affinity for self antigens, which mostly will be eliminated by apoptosis or PCD. On the contrary, in peripheral tissues, the immune system is committed into a process of positive selection for populations capable of reacting with a high affinity against foreign antigens, in order to assure a more efficient immune response. Consequently, lymphocytes with a low affinity for foreign antigens, need to be deleted by PCD. The purpose of this review is to describe the different processes of PCD which are involved during lymphocytes ontogeny, life and differentiation.

KEY WORDS: *apoptosis, programmed cell death (PCD), ontogeny, lymphocytes, homeostasis, intrinsic and extrinsic pathway.*

1. Introducción

La muerte celular programada o apoptosis en el sistema inmune es un proceso fundamental que regula la maduración de los linfocitos, la selección del repertorio de receptores específicos para linfocitos T (TCR) y B (BCR) y la homeostasis. Así, la muerte por apoptosis es esencial tanto para la función de los linfocitos como para el crecimiento y diferenciación (1). El sistema inmune es una sociedad de células interactuando, que consiste de linfocitos T y B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares y sus subclases. La mayoría de los componentes del sistema inmune nacen en la médula ósea; los linfocitos B, las células NK, los macrófagos, polimorfonucleares y un grupo de células dendríticas, maduran en la médula ósea y en el hígado fetal, mientras que los linfocitos T y una subpoblación de células dendríticas, maduran en el timo (2). Las células del sistema inmune trabajan en equipo y después del contacto con agentes infecciosos las células presentadoras de antígeno (APCs) profesionales, como las células dendríticas en particular, presentan péptidos antigénicos de éstos agentes infecciosos a las células T, favoreciendo la comunicación y polarización de la respuesta inmune efectora, lo que condiciona entre otros eventos la proliferación y expansión de las células involucradas, seguida de la fase de contracción donde la mayoría de los linfocitos son eliminados. Los pocos que sobreviven constituyen un pool de células de memoria (2). Esta fase final es crucial para el control del daño tisular y el desarrollo de enfermedades autoinflammatorias.

Diversas características del sistema inmune son únicas, una de ellas es la especificidad, producto de la generación del repertorio de linfocitos T y B, determinado por el reordenamiento de genes de la región variable que conforman tanto el TCR como el BCR, y la posterior selección (negativa o positiva) de estas clonas, lo que conduce a procesos altamente regulados, a fin de generar repertorios de células B y T específicos para la totalidad de antígenos, preservar la integridad de los tejidos propios y prevenir la autoinmunidad, además del control homeostático descrito previamente (des-

pués de la fase de expansión clonal, los linfocitos reactivos al antígeno deben ser valorados de nuevo hasta que el grupo de células linfoides alcance el nivel basal) (3). Este balance es logrado por un ajuste entre expansión/crecimiento y muerte celular, debido a que generalmente el sistema inmune produce más células de las que finalmente necesita, de tal manera que las células extra son eliminadas por apoptosis (4). Es así como la apoptosis controla diversos procesos como la génesis, diferenciación y control de la respuesta inmune. Debido a su papel crítico en la homeostasis tisular, en esta revisión se describirán los mecanismos moleculares del control y ejecución de la muerte celular programada (MCP), involucrados en cada uno de los eventos clave de la fisiología de la respuesta inmune.

2. Ontogenia de linfocitos T y papel de la MCP

El repertorio de células T es formado en el timo. Un ratón adulto joven con $1-2 \times 10^8$ timocitos genera entre 20 a 40 millones de nuevas células T por día. Pero el número de células T que sale del timo y entra en la periferia es de solamente 2-3% del pool de células T que inicialmente fueron generadas (4). En el timo, los linfocitos T son divididos en tres estados de desarrollo: el estado doble negativo CD4-CD8- (DN), el estado doble positivo CD4+CD8+ (DP) y el estado simple positivo CD4+CD8- o CD4-CD8+ (SP). En cada etapa las señales que conducen a apoptosis son diferentes (4, 5). Uno de los eventos más crítico de este complejo proceso, es el reordenamiento del TCR y su evaluación a fin de determinar su funcionalidad para la adecuada activación de la respuesta inmune, preservando la integridad de los tejidos propios, es por ello que se ponen en juego eventos clave como la selección positiva y negativa (para TCRs potencialmente autorreactivos). Otra forma descrita de selección negativa conocida como muerte por negligencia, para aquellas células T que fallen en arreglar sus genes TCR productivamente y que no pueden interactuar eficientemente con las APCs tímicas (células epiteliales tímicas y células dendríticas) que expresan complejos péptidos-MHC propios (2).

2.1 Timocitos DN

Los timocitos DN están divididos en cuatro subpoblaciones de desarrollo DN1-DN4, identificados por la expresión diferencial en su superficie de CD25 y CD44 (6). Durante el desarrollo de los timocitos DN, la citocina IL-7 ha mostrado ser crucial como una molécula pro-supervivencia. Los miembros antiapoptóticos de la vía intrínseca de la familia Bcl-2 (Bcl2, BclXL, Mcl1 y A1) (7), son las moléculas efectoras de la señalización producida por IL-7. Bcl-2 se expresa altamente en el estado DN, y en conjunto con Mcl-1 participan como un factor pro-supervivencia regulado por la señalización de la IL-7, que no solo modula la supervivencia en los timocitos, sino de células en etapas más tempranas del desarrollo, como las células hematopoyéticas pluripotenciales (CHP) y el precursor linfocítico común (PLC) (4, 5).

El TCR está constituido por dos cadenas transmembrana (α y β); durante el desarrollo en la etapa de DN, la cadena β inicia su reordenamiento y expresión, lo que constituye un punto de control del desarrollo del timocito. Otro elemento de particular importancia durante el desarrollo de los timocitos es la cadena pT α , que transitoriamente acompaña a la cadena β y ejerce otro punto de control para permitir o no la progresión en el desarrollo y conceder la expresión de la cadena α , que formará parte del TCR definitivo. La selección de la cadena β es un evento clave en el estadio DN3 mediado por la señalización del pre-TCR. Sin una buena señal del pre-TCR, la célula DN3 entra en apoptosis, evento que es mediado tanto por la vía intrínseca (A1/Bf1-1) como por la extrínseca. La vía extrínseca puede mediar la apoptosis en las células DN3 que no reciben señal del pre-TCR y dentro de los receptores descritos que participan en esta fase están: el receptor de muerte 3 (DR3), DR5 y el receptor del TNF 1 (TNFR1), los cuales son expresados en las células DN3 (4, 5) y aparentemente median las señales en este etapa de desarrollo.

2.2 Timocitos DP y la muerte por negligencia

Los timocitos DP reordenan y expresan su cadena TCR α y una vez que es coexpresada para conformar el TCR, son objeto de selección positiva y negativa. Solamente los timocitos que expresen un TCR con una afinidad intermedia por el complejo péptido-MHC propio son seleccionados positivamente. Los timocitos que expresen un TCR con baja afinidad o que sean incapaces de interactuar con las células epiteliales tímicas, mueren por negligentes para asegurar un repertorio de TCR funcional en la periferia. Los timocitos que expresen un TCR con alta afinidad son objeto de selección negativa para ser eliminados como células T potencialmente autorreactivas, o sufren un proceso de rescate de la muerte para así formar parte del repertorio de células T reguladoras (Treg) naturales (nTreg) (4, 5). En esta fase del desarrollo de los timocitos la molécula BclxL se expresa y ejerce un papel relevante en el control de la sobrevida (5).

La muerte por negligencia contribuye a la mayoría de la muerte celular durante el desarrollo de los timocitos. Se estima que el 90% de los timocitos en desarrollo mueren por negligentes. La degradación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL y la liberación del citocromo c en el citoplasma, son los eventos tempranos que conducen a la muerte espontánea de los timocitos por apoptosis (vía intrínseca), asociado con la expresión de la proteína proapoptótica Bim (3), involucrada en ejecutar la muerte espontánea de los timocitos. Otros miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y Bak, participan en colaboración con Bim, como ejecutores en la vía intrínseca (4, 5). El resumen de los mediadores de sobrevida/muerte durante la ontogenia de linfocitos T, se muestra en la figura 1 (adaptado de ref. 5)

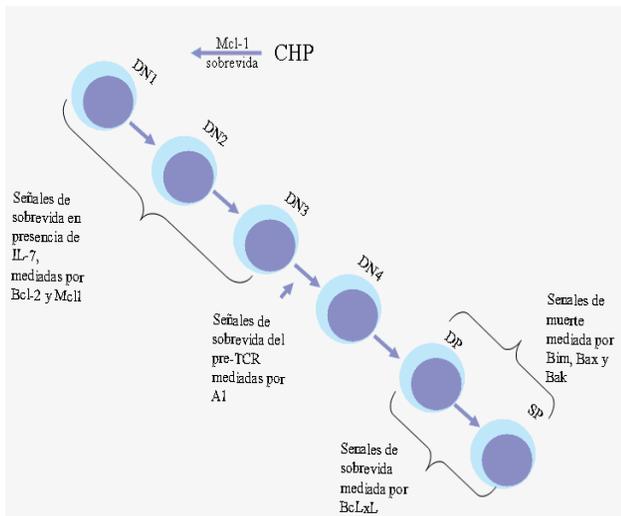


Figura 1. Ontogenia de linfocitos T y los mecanismos de control de la supervivencia/muerte

2.3 Timocitos SP y selección negativa

La selección negativa elimina a los timocitos que expresen un TCR con alta afinidad, para reducir el riesgo de autoinmunidad en la periferia. Recientemente se ha demostrado que la proteína antiapoptótica, c-FLIP es requerida para la maduración de los timocitos brindando protección contra la apoptosis en este estadio. Por esto, uno o más receptores de muerte pueden participar en el proceso de maduración del timocito hacia SP. Dentro de los receptores de la vía extrínseca que participan en la selección negativa, se destaca al sistema Fas/FasL, que juega un papel crítico en la selección negativa de timocitos semimaduros cuando el TCR recibe señales fuertes (4, 5).

3. Eventos que controlan la supervivencia/muerte de linfocitos B

Tres moléculas de superficie celular son elementos clave en la regulación de la vida y muerte de las células B, específicamente: BCR, CD40 y CD95. El estado de maduración y de activación, la cantidad y la cualidad de la señal y el contexto de citocinas y otros componentes del medio ambiente celular, son elementos clave en definir si se desencadena la supervivencia o muerte, en presencia de un antígeno. Evidencias obtenidas de células B normales o malignas, sugieren que la activación

del BCR induce apoptosis por la vía mitocondrial (1, 2, 8). Las células B pueden ser rescatadas de apoptosis por coestimulación vía CD40 que ha sido activado por CD40L expresado en células T y macrófagos; este estímulo podría representar la señal de supervivencia más importante para la célula B, incluso se piensa que tales señales en diferentes estados de maduración podrían también preparar a la célula B para la muerte (2).

Las células B inician su maduración en la médula ósea y la culminan en la periferia y es ahí donde reciben el desafío antigénico para activar o no los mecanismos de selección negativa. Al igual que para los linfocitos T, la molécula proapoptótica Bim juega un papel crucial durante la selección negativa y control de los linfocitos B autorreactivos, tanto en los linfocitos B inmaduros, como maduros (3). Las células B experimentan una segunda diversificación y un paso de maduración de la afinidad en el centro germinal de los órganos linfoides secundarios por un proceso conocido como hipermutación somática: la baja afinidad o los mutantes autorreactivos de células B son eliminados por apoptosis y el resto madura en células B de memoria y células plasmáticas de larga vida. Las células plasmáticas podrían constituir un importante componente de las células de memoria (2). Aunque las células T pueden usar su CD95L para el suicidio inducido por activación, las células B generalmente no expresan CD95L y mueren por una señal directa mediada por el BCR. Esto abre la posibilidad que las células T puedan matar a las células B positivas para CD95. Esto podría ser aplicado a células B tolerantes susceptibles o a células B insuficientemente estimuladas por señales de supervivencia o aquellas cuyos BCR no estén ocupados por antígenos (2, 9).

4. MCP durante la expansión y mantenimiento de linfocitos en la periferia

Después de la activación, las células T pasan a través de diferentes fases: (i) expansión clonal dependiente de IL -2, y fase efectora después de la sensibilización con el antígeno, (ii) fase de descenso en la cual la mayoría de las células T antígeno específicas son eventualmente eliminadas y (iii) fase en la cual ciertas células T que sobre-

viven a la fase de descenso entran en la población de células de memoria. En la primera fase las células son resistentes a la apoptosis, pero en la fase de descenso las células T se vuelven progresivamente más sensibles a la apoptosis en presencia de IL-2. Así, la IL-2 tiene un rol dual: es inicialmente obligatoria para la expansión clonal y después para la sensibilización de las células T a la apoptosis (2).

Las células T en la periferia pueden morir por diversas vías: la extrínseca dependiente de receptores de muerte, la intrínseca mitocondrial y la independiente de caspasas o perteneciente a la vía de las catepsinas (autofagia), las cuales están localizadas en los lisosomas (10, 11). La reestimulación del TCR en ausencia de una adecuada señal coestimuladora, es uno de los factores desencadenantes de la muerte del linfocito, fenómeno conocido como muerte celular inducida por activación (MCIA). Durante la MCIA se ha demostrado la participación del receptor Fas, TNFR1, TRAILR, fenómeno que puede reproducirse *in vitro*, si las células son re-estimuladas durante los primeros 4-6 días posterior a la activación, y se acompaña con la expresión de FasL, regulada por la movilización de calcio y la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) (4, 12). Los linfocitos T expresan constitutivamente la molécula Fas en su superficie, sin embargo esta expresión no necesariamente está asociada con su sensibilidad a sufrir muerte por esta vía, por ejemplo los linfocitos T vírgenes (no expuestos a antígenos extraños) son resistentes cuando son estimulados con el ligando (FasL), mientras que las activadas, las células T reguladoras (Treg) y las de memoria son susceptibles a morir vía Fas cuando son estimuladas. La adquisición de esta sensibilidad está asociada con la caída de los niveles de FLIP y probablemente también de Bcl-2 y Mcl1 (2, 13, 14). Las células T sensibilizadas se comportan como células tipo I, forman complejos DISC, inician la cascada de caspasas que resulta en apoptosis (1, 2, 8). Las células T CD4 son además responsables en parte de promover la sobrevida de células T de memoria CD8, demostrado por el hecho que la activación de linfocitos T CD8 en ausencia de la colaboración de CD4, muestran una reducida expresión de Bcl2, BclxL y c-FLIP e incremento de FasL

y TRAIL durante un segundo desafío antigénico, lo que promueve su eliminación (5). Así, la MCIA, podría servir como una segunda línea de defensa contra la autoinmunidad, para borrar células T auto-reativas en la periferia (2), o a fin de eliminar células infectadas o dañadas, una de las moléculas involucradas en mediar esta función es Fas/FasL, que se ha visto implicada en la eliminación de células infectadas por virus, dañadas o cuando se producen en exceso (15).

La muerte puede además desencadenarse como consecuencia de la privación de citocinas, por negligencia o muerte autónoma de células activadas (MACA) (16), donde se sugiere la participación de la vía intrínseca a través de la acción de la proteína proapoptótica Bim (4, 17), y la activación de JNK y p38 (ambas miembros de las MAPK), que juegan un papel crucial en la inducción de la expresión de la proteína Bim (4). Igualmente, se ha descrito una vía alterna independiente de receptores y donde NF- κ B ejerce un papel importante. La activación de NF- κ B se asocia con incremento de la sobrevida debido a que promueve la inducción de la expresión de Bcl2, mientras que su supresión (hecho que ocurre durante la MCIA), favorece la muerte asociada con el incremento de ERO y este último facilita la supresión de Bcl2 e incremento de Bim (4, 18). Finalmente, al igual que en el timo, en la periferia ocurre depleción por apoptosis por negligencia, en los casos de que las células T no son estimuladas suficientemente por señales de crecimiento, y más importante aún, esto ocurre hacia el pico o en la fase de caída de la respuesta inmune para la desregulación del número de células T reactivas y para terminar la respuesta inmune. Así, una vez que el desafío antigénico culmina, el 90% de las células activadas son eliminadas por apoptosis (5).

Durante la fase de contracción de la respuesta inmune también se eliminan del 90 al 95% de las células T CD8 efectoras; los mecanismos descritos en este proceso involucran la participación tanto de la vía intrínseca como la vía extrínseca. Así, los TCR re-estimulados en presencia de IL-2, incrementan la sensibilidad de estas células a morir vía Fas y TNFR1, producto en parte al efecto inhibitorio de esta interleucina sobre la expresión de FLIP. En el caso de la vía intrínseca se ha

evidenciado incremento de la proteína Noxa en los linfocitos T CD8+, durante la fase de contracción. Solo las células que sobrevivirán y formaran parte del pool de células de memoria expresan el receptor de IL-7 (IL-7R) que en conjunto con la IL-15 proveerán señales de sobrevivencia en esta población celular (5).

4.1 Moléculas coestimuladoras y su papel en la supervivencia de células T

Varios son los factores que determinan el destino de los linfocitos posterior a la estimulación periférica: i) el tipo de antígeno; ii) la existencia o no de reactividad cruzada; iii) la presencia de señales coestimuladoras, y iv) el microambiente de estimulación (19). Las células T activadas por medio del TCR pueden ser salvadas de MICA por una segunda señal de moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión o receptores de citocinas. CD28 es el mayor correceptor coestimulador expresado sobre los linfocitos T y funciona aumentando la producción de citocinas y la inducción del receptor de citocinas. Bajo ciertas condiciones CD28 puede sensibilizar a las células T hacia apoptosis, pero generalmente aumenta la proliferación celular y la viabilidad de las células T (2). El efecto de coestimulación se evidencia a tres niveles: (i) fuerte sobre-regulación de c-FLIP, (ii) sobrerregulación de Bcl-xL inducido por la activación de PI3K/Akt y (iii) desregulación del ARN mensajero de CD95L y de la proteína en un tiempo definido (8-12 horas luego de la estimulación). Así, la coestimulación bloquea ambas vías: tipo I y tipo II en las células T, y más tardíamente, también bloquea la expresión de CD95L (2). Se ha descrito además la participación de otra molécula coestimuladora responsable en promover la sobrevivencia de linfocitos T CD4 de memoria, OX40 y CD27 que induce la expresión de Bcl-xL, así como también Bfl protegiéndolas de la muerte y contribuyendo así al pool de memoria (5).

5. Papel de las células accesorias de la respuesta inmune durante la apoptosis

Las células T y B influyen una sobre la otra, y además en la persistencia, expansión clonal y

apoptosis de otras células. Sin embargo, las APCs son las primeras en iniciar la inmunidad dependiente de la célula T. Las APCs son capaces de engullir células necróticas y células apoptóticas y presentar sus antígenos a las células T. El material expuesto puede activar o calmar a la célula T. Se sabe que las APCs no son espectadores pasivos, las APCs activadas sintetizan CD95L, TRAIL, TNF y otros factores que modulan la actividad y función de las células T (2). Por otro lado, las células T activadas influyen en la función de las APCs y por esto afectan el curso de la respuesta inmune. Al inicio de la respuesta inmune la mayoría de las APCs son resistentes a la apoptosis para ejercer su función. Así, el cambio de estas células hacia desregulación de la respuesta se convierte en una cuestión importante. Dos miembros de la superfamilia TNF-R: CD40 y CD95, poseen roles adversos en este contexto: el sistema CD40-CD40L permite la supervivencia de las APCs y el sistema CD95-CD95L induce su muerte. La plasticidad del sistema inmune podría requerir que las células puedan dar y recibir señales de vida y señales de muerte al mismo tiempo y que el contexto celular determina cual señal dicta la respuesta celular (2).

5.1 Características inmunogénicas de la muerte celular

Las células que sufren muerte deben ser reconocidas y eliminadas a fin de evitar que se active el proceso inflamatorio, así la fagocitosis es el principal evento que promueve la eliminación de las células que mueren. Estas células apoptóticas expresan señales de reconocimiento que atraen fagocitos profesionales y para eso atraen su removimiento. Una de tales señales es el glicerolípido lisofosfatidilcolina (un constituyente normal de la membrana) producido por fosfolipasa A2 independiente de calcio (iPLA2, también conocido como PLA2G6). Sin embargo, diferentes hallazgos indican que tales señales son más importantes para la inducción de tolerancia, que para el inicio de una respuesta inmune. Por el contrario, otras señales tales como la liberación de nucleótidos (incluyendo ATP y UTP) por neuronas dañadas en ratones, se piensa que atraen células de la mi-

croglia al sitio de daño (8).

El producto de los nucleótidos, tales como el ácido úrico, pueden funcionar como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que actúan activando al sistema inmune, a través de la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1 β , IL-8 e IL-33, cuya secreción dependerá de la activación de caspasa-1 en el inflamasoma. Existe una gran variedad de estas proteínas que alertan al sistema inmune dentro de las cuales destaca, la proteína HMGB1 (proteína del grupo de la caja I de alta movilidad con unión al ADN) que es liberada durante la necrosis primaria y durante la necrosis secundaria que se produce luego de apoptosis (8). Todas las células que mueren pueden liberar DAMPs, pero el proceso de apoptosis puede modificar estas moléculas inmunostimulatorias para promover tolerancia (8).

Se tiene un ejemplo claro para explicar los efectos tolerogénicos de las células apoptóticas en el cual estas células y las fagocíticas liberan citocinas inmunosupresoras, en contacto con los macrófagos, las células apoptóticas inducen la secreción de citocinas antiinflamatorias tales como TGF- β , IL-10, el factor activador de plaquetas (PAF) y prostaglandina E2 (PGE2) (4, 5, 8). Las células apoptóticas pueden estimular la producción de mediadores lipídicos tales como 15-lipoxigenasa y 15-ácido hidroxieicosatetranoico, los cuales pueden participar en la resolución de la inflamación. En otro orden de ideas, el TGF- β , liberado por células dendríticas o macrófagos que han engullido células apoptóticas, podría promover la generación de células Treg inducidas. Tales células Treg pueden contribuir al efecto de las células apoptóticas sobre el sistema inmune, sin embargo la situación es más compleja: si IL-6 también está presente, por ejemplo, debido a la participación de TLR (receptores tipo Toll) u otras señales inflamatorias, las células apoptóticas pueden conducir a la generación de células inflamatorias T ayudadoras más que células Treg, un fenómeno que recientemente se ha demostrado que ocurre cuando la apoptosis es inducida en la infección bacteriana (4, 5, 8).

Se ha sugerido el siguiente mecanismo de inducción de tolerancia: las células que entran en apoptosis pueden producir DAMPs, tales como

HMGB1, sin embargo, la activación de caspasas y de ERO pueden oxidar a HMGB1, de modo que pueda quedar inactivo. Adicionalmente, las citocinas tales como TGF- β e IL-10 pueden ser liberadas de las células apoptóticas o alternativamente, las células apoptóticas pueden estimular sobre los macrófagos la producción de estas moléculas o bien otras como PAF y PGE2 (8). La producción de estas citocinas induce la diferenciación de células T CD4+ vírgenes hacia células Treg y células T ayudadoras tipo 2 (Th2), las cuales inhiben la respuesta inmune pro-inflamatoria. Simultáneamente, las células T CD8+ son estimuladas en ausencia de células T CD4+ activadas, resultando en la diferenciación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) incapacitados. Estos CTLs incapacitados, funcionan primariamente como células efectoras y parecen ser totalmente funcionales. Sin embargo, luego de una reexposición al antígeno, estos CTLs liberan el ligando de muerte TRAIL, lo que resulta en su remoción y supresión de una futura mediación de la respuesta por células T CD4+ y en consecuencia la inducción de tolerancia (8).

6. Mecanismos de muerte no apoptóticos

Evidencias emergentes indican que la apoptosis no es el único mecanismo de muerte celular, aunque quizá las células puedan elegir uno de los muchos mecanismos de muerte cuando ellas así lo disponen (20).

6.1 Muerte celular tipo II

Se caracteriza por la acumulación de vesículas encerradas por doble membrana. Estas vesículas son características de la autofagia y por esto se le conoce como muerte celular por autofagia. La autofagia es un mecanismo catabólico intracelular conservado evolutivamente que opera a bajos niveles bajo condiciones normales para mediar la degradación de componentes citoplasmáticos, agregados proteínicos y organelas intracelulares envejecidas, por la formación de vesículas encerradas por doble membrana llamadas autofagosomas. El contenido del autofagosoma es degradado luego de su fusión con lisosomas por enzimas. Bajo condiciones normales la autofagia tiene un

rol importante en el mantenimiento de la homeostasis intracelular. Este proceso es controlado por un grupo grande de genes ATG (relacionados con la autofagia) que aparecen conservados desde las levaduras hasta los humanos (21). La autofagia puede contribuir a la muerte celular que es inducida por los virus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (ver más adelante). Aunque el mecanismo por el cual la autofagia es activada por env no es claro, los resultados indican que la autofagia podría contribuir a la muerte celular de una manera no autónoma, proveyendo un mecanismo por el cual el virus podría inducir la muerte celular independientemente de la replicación viral. La autofagia puede asumir la muerte cuando la apoptosis no está disponible (22).

6.2 Necroptosis como una forma de necrosis regulada

La necroptosis la cual representa un tipo de necrosis programada, es otro ejemplo intrigante de muerte celular no apoptótica. Su descubrimiento fue promovido por observaciones de los clásicos estímulos apoptóticos, tales como el entrecruzamiento entre los receptores de muerte y sus ligandos, en ocasiones cuando la apoptosis es refrenada por los inhibidores de caspasas o a través de mutaciones en caspasa-8 o FADD. Aunque la necroptosis es activada por el mismo estímulo que inicia la apoptosis, las características morfológicas de la necroptosis, tales como el encerrado de organelas, la rápida disfunción mitocondrial, la permeabilización de la membrana plasmática y la carencia de fragmentación nuclear, son características de la necrosis celular (22).

6.3 Muerte celular mediada por la polimerasa I poli-ADP-ribosa (PARPI)

La PARPI es una enzima nuclear que tiene un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, que es rápidamente activada cuando el ADN sufre rupturas y esta recluta factores reparadores de ADN. La pérdida de PARPI conduce a un incremento de la sensibilidad por el daño al ADN, los cuales promueven el desarrollo de inhibidores de PARPI. Sin embargo, la sobreac-

tivación de esta polimerasa puede conducir a la muerte celular independiente de caspasas. PARPI puede mediar la muerte celular en escenarios diferentes. Por ejemplo, el daño alquilante del ADN promueve una rápida depleción del NAD⁺ citosólico mediado por PARPI, lo cual conduce a una muerte necrótica por colapso energético en células glicolíticas. PARPI también puede mediar la muerte celular que es inducida por daño al ADN secundario asociado con daño neuronal agudo. En este caso, la muerte celular neuronal conduce al traslado de polímeros de poli-ADP-ribosa hacia el citosol, dando lugar al traslado de AIF desde la mitocondria hacia el núcleo, donde es mediada la muerte celular (23).

En muchos tipos celulares se adoptan destinos distintos luego de la estimulación con TNF- α (20):

(a) En numerosos casos, la activación de la señalización NF- κ B, resulta de la formación de un complejo activador de NF- κ B y de la poliubiquitinación de RIPI (proteína I de interacción con el receptor), y es una respuesta primaria a TNF- α ; en este escenario, la ubiquitinación de RIPI limita la formación del complejo de señalización proapoptótico, en consecuencia NF- κ B actúa sobre-regulando transcripcionalmente la expresión de genes prosupervivencia. El bajo nivel de caspasa-8 degrada a RIPI inhibiendo la necroptosis (22).

(b) La activación de la apoptosis como una respuesta primaria a TNF- α requiere de condiciones específicas que promuevan la apoptosis tales como la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida), la sobreexpresión del polipéptido proteína tipo dedos de zinc (ZFRA) o la deficiencia en las quinasas de adhesión focal (FAK) en la señalización de quinasas, lo cual conduce a una eficiente formación de DISC y a la activación de caspasa-8 (22).

(c) La activación de la necroptosis como una respuesta primaria a TNF- α requiere de la supresión de señales apoptóticas o al menos de la actividad de caspasas (por inhibidores de caspasas). La pérdida rápida de ATP, condición de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno o de la isquemia, pueden proveer un medio ambiente no permisivo para la apoptosis (22).

7. Trastornos del sistema inmune que involucran alteración de la apoptosis

La apoptosis es un proceso fundamental de regulación del sistema inmune; su descarrilamiento conduce a muerte celular exagerada o a bloqueo de la misma. Diversos ejemplos de tales enfermedades con inhibición o exagerada apoptosis se discuten a continuación (1, 2, 20).

7.1 Defectos asociados con activación deficiente de los mecanismos de muerte celular

Se han identificados varias mutaciones que causan desordenes complejos del sistema inmune, manifestados como linfadenopatía y autoinmunidad (15). Una es la mutación recesiva *lpr* (linfoproliferación). Los síntomas de esta enfermedad son similares a las del lupus eritematoso sistémico. En estos casos las células T aberrantes se acumulan, debido a un defecto en el splicing o enpalme de *lpr*, lo que resulta en una gran disminución de la expresión de CD95 (2). En humanos se han reportado enfermedades similares con disfunción de CD95 (síndrome linfoproliferativo autoinmune tipo 1a, ALPS) y CD95L (ALPS tipo Ib). Los niños con ALPS muestran linfadenopatía no maligna, población de células T alteradas y aumentadas de tamaño y autoinmunidad severa. Muchos de estos niños muestran una mutación en el dominio de muerte de CD95 (2). En algunos casos (ALPS tipo Ib), la apoptosis mediada por CD95 está alterada sin evidencia de mutaciones en CD95 o CD95L. Esto sugiere que otros defectos afectan las vías de señalización CD95 y no a esta molécula per se. Ejemplo de ello es la recientemente reportada mutación de la caspasa-10 (2).

Otra falla descrita es la desregulación de Bim (molécula proapoptótica que participa en la ontogenia y homeostasis de la respuesta inmune) y su papel en la inmunopatogenia de la artritis reumatoidea se ha puesto recientemente en evidencia. La alteración de esta molécula se asocia con proliferación descontrolada de linfocitos T y producción de citocinas proinflamatorias tales como la IL-17. Además, se ha descrito que Bim participa en la eliminación de linfocito B autorreactivos (24), lo que sugiere que pueda estar asociado con

la presencia de linfocitos B productores de factor reumatoideo y otros autoanticuerpos característicos de esta patología. Finalmente, tal y como se describió en la primera parte de esta revisión (7), los cuerpos apoptóticos deben ser adecuadamente eliminados para que durante este proceso no se generen eventos que conduzcan al daño tisular. En enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, se ha mencionado una deficiente capacidad para fagocitar y destruir estos cuerpos apoptóticos (25), lo que pudiera estar mediando parte del daño tisular y la activación de linfocitos T autorreactivos.

7.2 Apoptosis y tumores linfoides

Los defectos asociados a bloqueo de la apoptosis son críticos en la generación y persistencia de tumores. Los linfomas foliculares resultan de la traslocación de *bcl-2* dentro del locus de la cadena pesada de inmunoglobulinas y de la expresión no regulada de *bcl-2* bajo la influencia del aumento de inmunoglobulinas. La sobreexpresión de *bcl-2* suprime la apoptosis y favorece la proliferación del tumor. Esto es apoyado por el incremento de la incidencia de tumores en animales transgénicos para *bcl-2*. De manera similar, *c-FLIP* y la mayoría de otros supresores de la proapoptosis, que podrían en principio actuar como supresores de tumores. Además, la resistencia a la quimioterapia podría resultar de mecanismos antiapoptóticos similares, que se conocen que bloquean la apoptosis en condiciones normales (2, 26).

En el desarrollo de tumores se han descrito múltiples mecanismos de evasión y eliminación por el sistema inmune. Estos mecanismos comprenden la ausencia de expresión de molécula costimuladoras o MHC y estrategias activas tales como la producción de citocinas inmunosupresoras. Adicionalmente, CD95 pudiera tener una función inmunosupresora. Un número de tumores, incluyendo tumores linfoides, son resistentes a la apoptosis y expresan CD95L funcional y de manera constitutiva o después de quimioterapia. Esta situación puede permitir a las células tumorales eliminar linfocitos anti-tumorales y suprimir la respuesta inmune antitumoral (2, 26).

CD95L se expresa constitutivamente en sitios

inmunoprivilegiados, tales como los testículos y los ojos, y podría contribuir al estatus de inmunoprivilegio por apoptosis inducida en linfocitos infiltrados. Pero también se ha reportado que la sobreexpresión de CD95L en los injertos no confiere simplemente privilegio, necesariamente induce una respuesta granulocítica que acelera el rechazo (2, 26).

7.3 Apoptosis en la infección por el VIH

Durante la infección por el VIH, se evidencia un incremento de la tasa de recambio de linfocitos T, producto de la tasa acelerada de muerte celular, asociado a incremento compensatorio y limitado en la tasa de proliferación y el estado de hiperactivación celular (19). Así, la depleción de células T está relacionada con la muerte celular acelerada. El principal evento que se genera durante la infección es la muerte de múltiples poblaciones celulares relacionadas con la defensa del hospedador, y el deterioro progresivo de la respuesta inmune. El desbalance de la respuesta inmune se inicia con la destrucción de los linfocitos T CD4 y de las células T CD4 de memoria residentes del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (TLAG), ya que estas células expresan CCR5 (27).

Otro evento crítico en el deterioro de la respuesta inmune es el estado de hiperactivación crónica, lo que promueve que se active la muerte celular tanto a través de la vía extrínseca como intrínseca, favoreciendo la MCIA. Esto es además favorecido por reducción de la expresión de Bcl2 en los linfocitos T residentes de los nódulos linfáticos y en sangre periférica (28, 29). Además, la condición de hiperactivación condiciona un incremento de la susceptibilidad a la muerte inducida por CD95, no solo en linfocitos, sino también en elementos de la inmunidad innata (27, 30-32).

Los productos de genes virales reguladores (por ejemplo, Tat de HIV-1), producido por células infectadas penetran en células no infectadas y confieren a estas células hipersensibilidad hacia la apoptosis mediada por CD95 inducida por el TCR. Tat induce un estado prooxidativo en las células afectadas, incrementando la expresión de CD95L y facilitando el suicidio mediado por CD95 (1, 2). Adicionalmente a la apoptosis me-

diada por CD95, un nuevo y rápido tipo de apoptosis se ha descrito, la cual es inducida en receptores de superficie celular unidos a HIV: CD4 y CXCR4. La potencialidad de este fenómeno y su especificidad por las células T CD4⁺ sugiere que esto pudiera tener un rol significativo en la depleción de las células T ayudadoras en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA (2).

Otro receptor recientemente descrito y que se asocia con los eventos de muerte celular durante la infección por el VIH es PD-1; esta molécula se encuentra en elevada densidad en los linfocitos T CD8 y su ligando PD-L1 sobre las APCs en los pacientes seropositivos, lo que promueve una reducción de la proliferación e incremento de la muerte de las células linfoides, una vez que ellas establecen contacto con las APCs, PD-L1 (27).

Se ha descrito recientemente que la autofagia contribuye con la depleción y deterioro de la respuesta inmune. La autofagia se ha evidenciado tanto en las células infectadas como en las adyacentes o también denominadas espectadoras inocentes, al parecer este evento es promovido por el receptor CXCR4 que interactúa con la proteína Env viral (33), y esta asociación activa la autofagia por promover la hemifusión o fusión total de dos células o formación de sincitia (27).

Correspondencia: Lisbeth Berrueta, MD, MSc, PhD. Instituto de Inmunología Clínica Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Avenida 16 de Septiembre. Edificio Louis Pasteur. Anexo IAHULA, POBOX 566. Mérida 5101. Venezuela, e-mail: lberruet@ula.ve.

Referencias

1. Giovannetti, A., Pierdominici, M., Di Iorio, A., et al. 2008. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr. Pharm. Des.* 14:253-268.
2. Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795.
3. Strasser, A., Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Bouillet, P. 2008. What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunol Cell Biol.* 86:57-66.
4. Krammer, P.H., Arnold, R., Lavrik, I.N. 2007. Life and

- death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 7:532-542.
5. Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., et al. 2005. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res.* 15:749-769.
 6. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., Kyewski, B. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9:833-844.
 7. Rojas, M., Salmen, S., Berrueta, L. 2009. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Rev. Med. Ext. Portuguesa - ULA* 4:92-106.
 8. Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., Kroemer, G. 2009. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* 9:353-363.
 9. Mollinedo, F., Gajate, C. 2006. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist. Update* 9:51-73.
 10. Arnold, R., Brenner, D., Becker, M., et al. 2006. How T lymphocytes switch between life and death. *Eur. J. Immunol.* 36:1654-1658.
 11. Kroemer, G., Jäätelä, M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* 5:886-897.
 12. Kaminski, M., Kiessling, M., Süss, D., et al. 2007. Novel role for mitochondria: protein kinase C θ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol. Cell Biol.* 27:3625-3639.
 13. Fritzsching, B., Oberle, N., Eberhardt, N., et al. 2005. In contrast to effector T cells, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J. Immunol.* 175:32-36.
 14. Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., et al. 2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 16:758-767.
 15. Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S. 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30:180-192.
 16. Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., et al. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* 14:354-359.
 17. Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., et al. 2005. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106:4131-4138.
 18. Hildeman, D.A., Mitchell, T., Aronow, B., et al. 2003. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15035-15040.
 19. Asquith, B., Borghans, J.A., Ganusov, V.V., Macallan, D.C. 2009. Lymphocyte kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 30:182-189.
 20. Degterev, A., Yuan, J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:378-390.
 21. Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221:3-12.
 22. Challa, S., Chan, F.K. 2010. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 67:3241-3253.
 23. Lieberman, J. 2010. Granzyme A activates another way to die. *Immunol. Rev.* 235:93-104.
 24. Hutcheson, J., Perlman, H. 2008. BH3-only proteins in rheumatoid arthritis: potential targets for therapeutic intervention. *Oncogene* 27 Suppl 1:S168-175.
 25. Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K. 2010. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140:619-630.
 26. Igney, F.H., Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2:277-288.
 27. Gougeon, M.L., Piacentini, M. 2009. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis* 14:501-508.
 28. Bofill, M., Gombert, W., Borthwick, N.J., et al. 1995. Presence of CD3⁺CD8⁺Bcl-2(low) lymphocytes undergoing apoptosis and activated macrophages in lymph nodes of HIV-1⁺ patients. *Am. J. Pathol.* 146:1542-1555.
 29. Boudet, F., Lecoeur, H., Gougeon, M.L. 1996. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes during HIV infection. *J. Immunol.* 156:2282-2293.
 30. Salmen, S., Guillermo, C., Colmenares, M., et al. 2005. Role of human immunodeficiency virus in leukocytes apoptosis from infected patients. *Invest. Clin.* 46:289-305.
 31. Salmen, S., Montes, H., Soyano, A., et al. 2007. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways. *Clin. Exp. Immunol.* 150:539-545.
 32. Salmen, S., Terán, G., Borges, L., et al. 2004. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 137:166-172.
 33. Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., et al. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* 116:2161-2172.