

## Trabajo original

# Apoptosis y riñón

María del Carmen Ávila Casado<sup>1</sup><sup>1</sup>Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y Facultad de Medicina, UNAM.**Resumen**

La apoptosis es uno de los dos mecanismos de muerte de las células, acontecimiento necesario para la remodelación tisular y en la renovación tisular. Se produce por isquemia, cuando ésta no es absoluta; se altera primeramente la membrana con bulas y ampollas, los organelos protoplásmicos lo hacen posteriormente, la cromatina nuclear se condensa y el DNA se fragmenta en bandas. Las células poseen factores de supervivencia (citocinas, hormonas) que evitan la apoptosis normal. Hay genes que estimulan la apoptosis y genes que la disminuyen (“genes de la muerte” y “genes de supervivencia”). El estudio de los mecanismos de regulación de la apoptosis tiene un gran potencial terapéutico: eliminación de tumores, disminución de la pérdida “normal” de neuronas, conservación de los linfocitos CD4 en el SIDA, o desaparición de las células auto-reactivas en enfermedades auto-inmunes.

Este mecanismo de muerte celular es importante en la patogenia de las nefropatías tanto tubulointersticiales como glomerulares. Su comprensión y posible modificación podrá mejorar el tratamiento de trastornos inflamatorios, inmunológicos, tóxicos u obstrutivos del riñón.

**Palabras clave:** *Apoptosis, nefropatías.*

**Summary**

Apoptosis is one of the two normal mechanisms of cell death, also a need for tissue renovation. It is produced by partial ischemia, affects firstly the cell membrane, and then the nucleus, condensation of chromatin and fragmentation of DNA.

There are genes that stimulate apoptosis as well as genes that diminish it. The study of the regulation of apoptosis has a great therapeutic potential, which could influence the elimination of tumors, reduce the “normal” neuronal loosing, the conservation of CD4 in AIDS or disappear auto-reactive cells in immune diseases.

This cellular death mechanism is also important in the pathogenesis of all renal diseases, glomerular and tubular, and its entire comprehension and possible modification could change the usual treatments.

**Key words:** *Apoptosis, nephropathies.*

La muerte celular por apoptosis, uno de los dos mecanismos básicos de muerte celular, ha suscitado un gran interés dentro de todos los campos de la biología de tal manera que es muy difícil encontrar un área en la cual no le haya sido asignado un papel significativo. Además de que juega un papel importante en las enfermedades autoinmunes, su función principal está relacionada con: 1) los procesos de remodelación tisular que se llevan a cabo durante el desarrollo de los vertebrados y 2) en la pérdida de células en respuesta a diversos estímulos, ya sea externos o internos (renovación tisular).<sup>1</sup>

El término apoptosis fue utilizado para describir este tipo especial de muerte celular, tomado del término griego *apo* (aparte) y *ptosis* (caído), que en el mundo clásico se utilizaba para describir el proceso normal de la caída de las hojas durante el otoño.<sup>1</sup> La descripción original de este tipo de muerte celular se debió a las observaciones histológicas de Kerr, en 1972,<sup>2</sup> cuando realizó un experimento en el que ligó la vena porta y cortó el suministro sanguíneo a hepatocitos. Alrededor de la zona de necrosis central isquémica de hepatocitos (muerte celular con hinchazón y ruptura de la membrana celular), él observó una franja de tejido en el que las células en lugar de hincharse, parecían haberse contraído y antes de utilizar el término apoptosis, le llamó “necrosis por contracción”.<sup>2</sup> En estas células, en las que seguramente la muerte es más lenta porque la isquemia que sufren no es absoluta, se conservaba la integridad de las membranas celulares y se formaban ampollas y bulas hacia la superficie. Curiosamente los organelos estaban preservados, y entre éstos se observaban incluso mitocondrias.<sup>1,2</sup> Todos estos hallazgos se observaron bajo el microscopio óptico.

La característica morfológica distintiva de la apoptosis es la condensación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. Para poder aplicarle el término de apoptótica, es necesario que la célula haya sufrido un cambio radical en la estructura del núcleo en el que la cromatina nuclear se encuentre extraordinariamente concentrada dando el aspecto citológico de un núcleo pequeño e hiperchromático que parece colapsado sobre sí mismo.<sup>3</sup>

La primera demostración de que la apoptosis podía ser inducida de manera experimental fue en los trabajos de Wyllie en timocitos.<sup>4</sup> A estos timocitos se les inducía apoptosis tanto *in vivo* como *in vitro* al ponerlos en contacto con glucocorticoides.<sup>4</sup> Este mismo autor estudió el ADN del núcleo picnótico

co de las células apoptóticas y demostró por medio de electroforesis en gel que el ADN se encontraba fragmentado, formando una escalera de bandas de ADN con separaciones a intervalos regulares de 200 pares de bases y entre las regiones, entre nucleosomas.<sup>4</sup> Este patrón ya había sido observado anteriormente en estudios bioquímicos de fragmentación espontánea del ADN nuclear de células normales de mamíferos por endonucleasas dependientes de calcio y magnesio.<sup>4</sup> Normalmente, las células apoptóticas son eliminadas por medio de fagocitosis que realizan las células vecinas. Estas células vecinas no son necesariamente células del sistema fagocítico reticulendoendotelial (macrófagos o neutrófilos), sino que se piensa que toda célula nucleada tiene la capacidad de fagocitar células que han muerto por apoptosis.<sup>5</sup>

La apoptosis es también un mecanismo de muerte celular programada. Los neutrófilos, por ejemplo, salen de la médula ósea programados de manera endógena para morir a las 24 horas. Este proceso sólo puede ser alterado, y de manera no muy importante, por factores de crecimiento. En otros tipos de células la señal es exógena y puede proceder de una célula lejana (por vías hormonales endocrinas) o de alguna célula adyacente (por contacto o secreción paracrina). Por ejemplo, la involución prostática que ocurre después de la orquiectomía, secundaria a la supresión de testosterona.<sup>1</sup>

El fenómeno de apoptosis protege a los tejidos vecinos de la inflamación y por lo tanto, del daño tisular. Ya que este proceso se lleva a cabo en minutos, el número de células apoptóticas que se encuentran de manera normal en un tejido es muy pequeño o puede incluso pasar inadvertido. Las células apoptóticas pueden ser detectables histológicamente en un tejido sólo durante un periodo muy corto que puede ser de 30 minutos a 2 horas.<sup>3</sup> Virtualmente todo tipo de célula depende de "factores exógenos de supervivencia" cuya presencia evita que la célula entre en apoptosis. La presencia de cantidades insuficientes de estos factores, (citocinas, hormonas o matriz extracelular) produce la falta de unión con receptores celulares y, por medio de mecanismos aún no totalmente dilucidados, dan como resultado la muerte celular por eliminación.<sup>6</sup>

Los genes responsables de la muerte celular, llamados "genes de la muerte", ya han sido identificados en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Recientemente se ha identificado en mamíferos a una enzima convertidora de IL1- $\beta$ , como un homólogo del gen ced-3 del *C. elegans*.<sup>7</sup>

Así como puede inducirse el fenómeno de apoptosis, también puede disminuirse. Esto se debe a que la susceptibilidad de las células a la apoptosis también puede disminuirse. Esta disminución puede llevarse a cabo mediante la expresión endógena de genes de supervivencia como los de la familia de bcl-2 3. Los genes que estimulan la apoptosis incluyen a una serie de receptores celulares como Fas, proteasas citoplasmáticas, incluyendo a la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  y proteínas nucleares como p53 y c-Myc.<sup>1</sup>

El estudio de los mecanismos y regulación de la apoptosis ofrece para el futuro un enorme potencial terapéutico en diferentes campos: en oncología para la eliminación de tumores; en neurología para evitar la pérdida neuronal por apoptosis; en inmunología para evitar la eliminación apoptótica de los linfocitos de tipo CD4 en los pacientes con SIDA y para estimular la apoptosis de células auto-reactivas en enfermedades autoinmunes, entre otros.

En el campo de la nefrología el estudio de la apoptosis ofrece un mejor entendimiento de los mecanismos de daño renal, tanto a nivel glomerular como tubulointersticial. A nivel glomerular, la muerte celular programada puede ser muy importante para la remodelación del glomérulo después de que ha ocurrido una lesión de tipo inflamatorio, como en las glomerulonefritis proliferativas ya sean posinfecciosas, por IgA, o secundarias a enfermedades sistémicas como las vasculitis con participación renal o el lupus eritematoso generalizado.<sup>3</sup>

A nivel experimental, se ha demostrado el papel que juega la apoptosis en el proceso de reparación de la glomerulonefritis proliferativa en diversos modelos de glomerulonefritis que cursan con hipercelularidad. Uno de ellos es el modelo de glomerulonefritis proliferativa en ratas inducida por el anticuerpo contra Thy-1.1. Este modelo se caracteriza por proliferación mesangial, hipercelularidad y expansión de la matriz mesangial, semejante a lo que se observa en las glomerulonefritis proliferativas que ocurren en el hombre.<sup>8</sup> En este modelo experimental hay un periodo transitorio de hipercelularidad masiva glomerular después del cual el glomérulo se recupera y regresa a su estructura y celularidad normales. Esta recuperación glomerular también se ha observado en respuesta al tratamiento de varias enfermedades glomerulares como la glomerulonefritis posestreptocócica, la púrpura de Henoch-Schönlein y otras glomerulonefritis.<sup>8-11</sup> En el modelo experimental anti Thy 1.1,<sup>11</sup> se estudiaron ratas Wistar macho que se siguieron durante seis semanas. La proliferación celular mesangial apareció casi inmediatamente posterior a la administración de anti-Thy y su pico máximo fue de los 7 a 10 días. Posteriormente, el grado de proliferación glomerular disminuyó paulatinamente con reconstrucción de las luces capilares y disminución del número total de células glomerulares. Durante este periodo de recuperación, la proliferación mesangial volvió a su nivel normal de celularidad y la presencia de apoptosis fue muy aparente en el glomérulo. La apoptosis fue muy evidente del día 7 a la semana cuarta y fue máxima del día 10 a la semana segunda. En la semana sexta el glomérulo presentaba una morfología normal. La apoptosis fue identificada por electroforesis del DNA extraído del glomérulo.<sup>11</sup> Los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos presentes durante la etapa de proliferación también disminuyeron por apoptosis. En este estudio se concluyó que la proliferación celular glomerular disminuye paulatinamente, por medio de

apoptosis, durante el periodo de recuperación y remodelación glomerular hasta llegar nuevamente a la celularidad normal.<sup>11</sup> Este hallazgo es muy importante ya que anteriormente se pensaba que todo glomérulo proliferado evolucionaba de manera inevitable e irreversible a la cicatrización por esclerosis,<sup>12</sup> y sin embargo, parece ser que en numerosas enfermedades glomerulares que cursan con proliferación mesangial, ésta puede resolverse permitiendo que tanto la estructura como la función glomerular regresen a la normalidad.<sup>9</sup> Por lo tanto, la apoptosis representa un mecanismo muy importante para la remoción del exceso de células mesangiales e inflamatorias en los procesos inflamatorios glomerulares.<sup>12</sup>

Algunos estudios han mostrado que la apoptosis ocurre de manera normal durante el desarrollo del riñón en la vida embrionaria, para remodelarlo, así como anormalmente como consecuencia de daño renal por diferentes estímulos en la insuficiencia renal aguda, en la endotoxemia y en diversos tipos de glomerulonefritis.<sup>13,14</sup> Los factores que regulan la supervivencia de las células renales en estas circunstancias aún no han sido aclarados. Uno de estos factores es el antígeno Fas. El antígeno Fas fue originalmente definido como el blanco de anticuerpos monoclonales citolíticos.<sup>15</sup> Más tarde se demostró que Fas pertenece a la familia de receptores de membrana que incluye a los receptores del factor de necrosis tumoral, al receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad, CD40, CD27, CD30 y otros.<sup>15</sup> Algunas de estas proteínas regulan la muerte celular por apoptosis. Los anticuerpos humanos anti-Fas inducen apoptosis en células susceptibles humanas y murinas que expresan Fas humano.<sup>16</sup> Sin embargo, no todas las células que expresan Fas son sensibles a la muerte celular medida por Fas. Además, la activación de Fas por anticuerpos monoclonales puede inducir proliferación de linfocitos.<sup>17</sup> El ligando de Fas también pertenece a la superfamilia de citocinas del factor de necrosis tumoral que promueven la muerte celular.<sup>15</sup> Los linfocitos T expresan el ligando de Fas y, a través de éste, se pueden mediar algunas formas de citotoxicidad de tipo T.<sup>15</sup> Las células T se encuentran muy frecuentemente en los sitios de daño renal por lo que las células mesangiales que expresan Fas pueden ser el puente para la producción del daño celular que sigue a las glomerulonefritis.<sup>15</sup> En referencia a lo anterior, otros estudios experimentales han mostrado que la administración de anticuerpos anti-Fas a células mesangiales humanas en cultivo induce citólisis.<sup>15</sup>

La muerte celular por apoptosis también es un mecanismo importante en el daño nefrotóxico secundario a la administración de medicamentos. En un estudio experimental se analizó el papel de la apoptosis sobre los efectos farmacológicos de medicamentos citotóxicos y radiaciones ionizantes en células mesangiales en cultivo de rata.<sup>18</sup> Las células mesangiales se cultivaron con o sin estímulos para inducir apoptosis y se recogieron a las 24 o 48 horas. Se examinó con microscopía de luz, se extrajo el DNA para electroforesis y se realizó la técnica de

TUNEL. Las células expuestas a drogas citotóxicas (dexametasona, ciclofosfamida, melfalan y ciclosporina A) o radiaciones ionizantes, mostraron un aumento estadísticamente significativo en el número de células apoptóticas con respecto a controles normales, por microscopía de luz. La fragmentación del DNA de las células apoptóticas también se visualizó por medio de su tinción característica por el método de TUNEL y mostró un aumento estadísticamente significativo en el número de células en apoptosis. El número de células en apoptosis observadas con la técnica de TUNEL fue significativamente mayor que las mostradas por microscopía de luz. Las dosis de medicamentos que se utilizaron fueron a las concentraciones terapéuticas en plasma que se utilizan para tratar enfermedades glomerulares. Esto sugiere que las drogas citotóxicas utilizadas para tratar a las enfermedades glomerulares, a dosis terapéuticas, pueden inducir apoptosis en células mesangiales y funcionar en parte por medio de este mecanismo.<sup>18</sup>

Un medicamento muy utilizado en nefrología es la ciclosporina A. Este medicamento ha revolucionado el mundo de los trasplantes de órganos y actualmente se utiliza también para el tratamiento de numerosas enfermedades autoinmunes.<sup>19</sup> A pesar de sus ventajas, la ciclosporina A se ha asociado con numerosas complicaciones renales entre las que se incluyen: nefrotoxicidad aguda, fibrosis tubulointersticial crónica y de manera poco frecuente, microangiopatía trombótica.<sup>20</sup> La nefropatía tubulointersticial que produce es irreversible y seguramente contribuye a la pérdida del injerto por nefropatía crónica. En un modelo experimental de nefropatía crónica por ciclosporina en ratas<sup>21</sup> se encontró que los animales desarrollaban algo muy semejante a lo que ocurre en el hombre, con lesiones arteriales y la fibrosis. Las ratas que recibieron ciclosporina A y una dieta baja en sal y presentaron lesiones tubulares tempranas con proliferación tubular e intersticial, depósito de matriz extracelular en el intersticio e infiltración por células mononucleares (linfocitos y macrófagos) asociada a la expresión tubular de la molécula de adherencia osteopontina. La infiltración inicial de células inflamatorias mononucleares disminuyó paulatinamente con un aumento progresivo de la fibrosis. Esta desaparición de la población celular del parénquima fue secundaria a la presencia de una apoptosis marcada y acelerada. La presencia de apoptosis se determinó por la técnica de TUNEL y por microscopía de luz. En este trabajo se concluyó que la inducción de apoptosis por la ciclosporina A se correlaciona con la presencia de fibrosis intersticial.<sup>21</sup>

En cuanto a las lesiones tubulointersticiales, la apoptosis se ha relacionado también con el daño renal en la uropatía obstructiva.<sup>22</sup> La obstrucción ureteral unilateral produce lesiones características en el riñón afectado tanto funcionales como morfológicas. En los primeros días posteriores a la obstrucción ureteral se produce una disminución en la filtración glomerular y del flujo sanguíneo con la presencia de edema y

macrófagos intersticiales.<sup>23</sup> Si la ligadura se mantiene por un largo periodo de tiempo el riñón afectado desarrolla hidronefrosis y pérdida de tejido lo cual se refleja en una reducción importante en el peso total del riñón y, a nivel histológico, por atrofia tubular, fibrosis intersticial e inflamación. Aunque estos cambios se han documentado tanto a nivel experimental como en tejidos humanos, la patogénesis no se ha estudiado completamente. En un estudio experimental en el que se estudiaron ratas Sprague-Dawley en las que se produjo uropatía obstructiva crónica por ligadura ureteral unilateral se determinó la presencia de apoptosis tubular y glomerular a diferentes días postligadura.<sup>23</sup> Esto se analizó sacrificando a los animales en diferentes fechas postligadura y buscando a las células apoptóticas por la técnica de TUNEL. También se marcaron las células con anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos nucleares asociados con proliferación para detectar a las células que estaban proliferando. Los resultados mostraron que la apoptosis estaba aumentada y que por lo tanto estaba relacionada con la presencia de atrofia tubular y pérdida de parénquima renal en la uropatía crónica de tipo obstructivo.<sup>23</sup>

Por último, también se ha asociado a la apoptosis con la nefropatía crónica del injerto renal o rechazo crónico. La nefropatía crónica del injerto se caracteriza por una progresión gradual y persistente que lleva invariablemente a la pérdida del injerto. La apoptosis en el injerto podría estar asociada a factores externos. En un estudio retrospectivo en el que se analizaron las biopsias renales tomadas por protocolo de 20 pacientes pediátricos trasplantados, nueve receptores de trasplante hepático y siete pacientes con glomerulopatía primaria de tipo cambios mínimos, se encontró que los pacientes con injerto renal presentaban un aumento en la apoptosis relacionada con la nefropatía crónica del injerto (rechazo crónico).<sup>24</sup>

En conclusión, el mecanismo de muerte celular por apoptosis juega un papel muy importante en la patogénesis de las nefropatías, tanto tubulointersticiales como glomerulares. La manipulación de este proceso podría ofrecer la oportunidad de mejorar el manejo de pacientes con obstrucción renal, lesiones por fármacos nefrotóxicos o con proliferación glomerular en los procesos inflamatorios o inmunológicos que afectan el riñón.

## Referencias

1. Safirstein RL, Boventre JV. Molecular response to ischemic and nephrotoxic acute renal failure. En: Schlondorf & Boventre, eds. Molecular nephrology. New York: Marcel Dekker Inc, 1995: 839-834.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239.
3. Savill J. Apoptosis: will cell death add life to nephrology? Nephrol Dial Transplant 1995: 1977-1979 (Editorial comments).
4. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature (Lond) 1980; 284: 555.
5. Savill J, Smith J, Sarraf C, Ren Y, Abbot F, Rees A. Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. Kidney Int 1992; 42: 924-936.
6. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. Nature 1992; 356: 397-400.
7. Miura M, Zhu H, Rotello R et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 $\beta$ -converting enzyme, a mammalian homologue of the *C. elegans* cell death gene ced-3. Cell 1993; 75: 653-660.
8. Yamamoto T, Wilson CB. Quantitative and qualitative studies of antibody induced mesangial cell damage in the rat. Kidney Int 1987; 32: 514-525.
9. Cameron JS. The long term outcome of glomerular disease. In: Diseases of the kidney (4<sup>th</sup> ed), editada por Schrier RW, Gottschalk CW. Boston: Little Brown, 1988: 2127.
10. Glasscock RJ, Adler SG, Ward HJ, Cohen AH. Primary glomerular disease. In: The kidney (5<sup>th</sup> ed), editada por Brenner BM, Rector FC Jr. Philadelphia: Saunders, 1995.
11. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamamoto N. Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. Kidney Int 1995; 47: 114-121.
12. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Jhonson RJ, Savill J. Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. J Clin Invest 1994; 94: 2105-2116.
13. Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racusen LC, Solez K. Primary acute renal failure ("acute tubular necrosis") in the transplanted kidney: Morphology and pathogenesis. Medicine 1989; 68:173-187.
14. Savill J. Apoptosis: A mechanism for regulation of the cell complement of inflamed glomeruli. Kidney Int 1992; 41: 607 - 612.
15. González-Cuadro S, López-Armada MJ, Gómez-Guerrero C, Subirá D, García-Sahuquillo A, Ortiz-González A, Neilson EG, Egido J, Ortiz A. Anti-Fas antibodies induce cytolysis and apoptosis in cultured human mesangial cells. Kidney Int 1996; 49: 1064-1070.
16. Itoh N, Yonehara S, Ishi A, Yonehara M. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991; 76: 959-962.
17. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, Ramsdell F, Lynch DH. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. J Exp Med 1993; 178: 2231-2235.
18. Cha DR, Feld SM, Nast C, La Page J, Adler S. Apoptosis in mesangial cells induced by ionizing radiation and cytotoxic drugs. Kidney Int 1996; 50:1265-1571.
19. Powles AV, Cook T, Hulme B, Baker BS, Lewis HM, Thomas E, Valdimarrson H, Fry L. Renal function and biopsy findings after 5 years' treatment with low-dose cyclosporin for psoriasis. Br J Dermatol 1993; 128: 159-165.
20. Young BA, Marsh CL, Alpers CE, Davis CL. Cyclosporine associated thrombotic microangiopathy/hemolytic uremic syndrome following kidney and kidney/pancreas transplantation. Am J Kid Dis 1996; 4: 561-571.
21. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shanklnad SJ, Couser WG, Bennett W, Johnson RJ. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporin-associated interstitial fibrosis. Kidney Int 1998; 53: 897-908.
22. Wilson D, Klahr S. Urinary tract obstruction. In: Diseases of the Kidney (5<sup>th</sup> ed), editado por Schrier RW, Gottschalk CW. Boston: Little Brown and Co, 1993: 657-687.
23. Truong LD, Petruska G, Yang G, Gurpinar T, Shappel S, Lechago J, Rouse D, Suki WN. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. Kidney Int 1996; 50 : 200-207.