

ERIPTOSIS, LA APOPTOSIS DEL ERITROCITO*

Martha Angelica Quintanar Escorza y José Víctor Calderón Salinas

RESUMEN

La eriptosis es un tipo de apoptosis que sucede en el eritrocito. Este fenómeno recientemente se ha caracterizado y estudiado bajo este enfoque. La eriptosis comparte mecanismos propios de las etapas finales de la apoptosis, incluyendo la activación de proteasas, la externalización de fosfatidilserina y la formación de microvesículas apoptóticas. La eriptosis es importante para evitar la hemólisis, así como las respuestas inflamatorias o inmunológicas en la destrucción de los eritrocitos. De manera muy interesante, es posible plantear que la eriptosis es solamente el final de una apoptosis que inició cuando el eritroblasto maduraba a eritrocito. El eritroblasto para ser eritrocito debe perder las mitocondrias y el núcleo, lo cual sucede con una apoptosis parcial. La apoptosis del eritroblasto se detiene por un estímulo de diferenciación y por la eritropoyetina que dispara un proceso de antiapoptosis. En el presente trabajo se describen los aspectos moleculares que llevan a la apoptosis parcial y a la eriptosis final de los eritrocitos.

PALABRAS CLAVE: Apoptosis, eritrocito, calcio, caspasas, fosfatidilserina.

ABSTRACT

The eryptosis is a type of apoptosis that takes place in the erythrocyte. This phenomenon has recently been characterized and studied under this approach. The eryptosis shares mechanisms that are typical of apoptosis final stages, including proteases activation, externalization of phosphatidylserine and apoptotic microvesicles formation. The eryptosis is important to avoid the hemolysis, as well as the inflammatory or immunological responses in erythrocytes destruction. In a very interesting way, it is possible to suggest that the eryptosis is the end of an apoptosis that initiated when the erythroblast was maturing to become an erythrocyte. In order to be converted into an erythrocyte, the erythroblast has to lose the mitochondrias and the nucleus, which happens through a partial apoptosis. The erythroblast apoptosis is stopped by a differentiation stimulus and by erythropoietin antiapoptotic activity. In the present work the molecular aspects that induce the partial apoptosis and the final eryptosis of the erythrocytes are described.

KEY WORDS: Apoptosis, erythrocyte, calcium, caspases, phosphatidylserine.

INTRODUCCIÓN

A la apoptosis también se le llama muerte celular programada, es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada; este fenómeno implica una programación celular, genéticamente regulada, para que la célula muera sin causar daño en la organización de los tejidos a que pertenece; es decir que la célula muere sin causar una reacción inmunológica o inflamatoria que

afecte a las células vecinas y con ello mantener la integridad del tejido.

La apoptosis es un mecanismo molecular involucrado en diferentes mecanismos fisiológicos y patológicos que incluyen: desarrollo y remodelación de tejidos, homeostasis celular y defensa contra varias formas de estrés extremo o de daño intenso de una célula.

La apoptosis fue descrita en 1972 por JFR Kerr, como un programa suicida intrínseco de las células, involucrado en el recambio normal de

hepatocitos y que se caracterizó por la condensación del contenido de las células, la ruptura de las membranas nucleares y la formación de cuerpos apoptóticos (pequeñas vesículas de membrana fagocitadas por células vecinas). Es interesante notar que conceptos expresados por Hipócrates en el siglo V a.C. ya implicaban la destrucción fisiológica de células y tejidos. De igual forma y siguiendo esta línea de pensamiento, Virchow en 1858 describía 2 tipos de muerte celular, la necrobiosis y la necrosis; caracterizan-

*Recibido: 21 de agosto de 2006 Aceptado: 5 de septiembre de 2006

Departamento de Bioquímica. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Avenida IPN 2508, Zacatenco. A.P. 14-740. México, D.F. CP. 07000. Tel. (55)5061-3955. Correo E: jcalder@cinvestav.mx

do a la necrobiosis como la muerte espontánea, por partes y natural, claramente opuesta a una muerte violenta como lo sería la necrosis (1). La apoptosis a diferencia de la necrosis es un proceso ordenado, la célula muere limpiamente sin dañar a sus células vecinas con el contenido de su citoplasma, la célula se condensa y reduce su tamaño, se colapsa el citoesqueleto, la membrana nuclear se destruye, el ADN se fragmenta y finalmente la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada.

Hasta el año 2001, se pensaba que la apoptosis era un fenómeno de células nucleadas y que no podía encontrarse en células sin núcleo, como los eritrocitos. Los trabajos de Berg y de Bratosin indicaron que la apoptosis se podía presentar en células sin núcleo, sus trabajos permitieron demostrar lo que posteriormente se llamaría eriptosis y que estos autores nombraron como "apoptosis de células anucleadas" o "muerte celular programada de los eritrocitos" (2, 3).

EL ERITROCITO

Los eritrocitos de humanos han sido considerados como simples momias de células; sacos de membranas con hemoglobina que flotan en la circulación. Esta visión se deriva del hecho de que los eritrocitos de humanos son estructuras membranales que no tienen mitocondria ni núcleo, lo que lleva a que muchos autores no los consideren células en toda la extensión de la palabra. Otros autores consideran a los eritrocitos como células anucleadas en etapa terminal, con metabolismo, sistemas de transducción de señales, transportes activos y una serie de funciones celulares complejas, que sirven de modelo y de donde se ha obtenido valiosa información sobre múltiples funciones celulares.

Los eritrocitos de mamíferos en etapa fetal, los eritrocitos de anfibios,

de reptiles y de aves en la etapa adulta si tienen núcleo, lo que les da características morfológicas de células nucleadas. Aunque, el material genético de estos eritrocitos si puede ser utilizado para realizar una rudimentaria síntesis *de novo* en estas células, no se han encontrado funciones extraordinarias dependientes del ADN nuclear esta y el transporte de oxígeno continua siendo la función primordial; tampoco se presenta división celular en el torrente sanguíneo. Lo mas probable es que esta característica de presentar un núcleo se puede asociar mas a atavismos evolutivos que a necesidades celulares para la función.

Los eritrocitos son la forma madura y terminal de los eritroblastos. El ciclo de vida de los eritrocitos puede ser dividido en tres fases: la primera que es la eritropoyesis, que consiste en la producción de eritrocitos en los órganos hematopoyéticos, como la médula ósea roja, mismos que se maduran a partir de los pro-eritroblastos policromatofílicos, los cuales se transforman en eritroblastos ortocromáticos y maduran finalmente a eritrocitos. La segunda fase es la concerniente a la salida de los eritrocitos maduros de los órganos eritropoyéticos hacia la sangre. Finalmente, la tercer fase es la destrucción de los eritrocitos que han envejecido en el sistema retículo endotelial. (4).

LA ERITROPOYETINA

Los eritrocitos en el humano tienen una vida media de 120 días, tiempo aproximado en el que se producen señales moleculares de envejecimiento y es retirado de la circulación.

La eritropoyetina es la hormona encargada de regular la cantidad y vida media de los eritrocitos en la sangre. Esta hormona induce eritropoyesis, bajo condiciones fisiológicas y se incrementa su concentración y por ende su estimulación a la producción de eritrocitos bajo diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Uno

de los principales estímulos para la liberación de eritropoyetina es la presión parcial de oxígeno en la sangre. Disminuciones de la presión parcial de oxígeno incrementan la concentración de eritropoyetina y esto induce una salida de eritrocitos al torrente circulatorio y a su vez acelera la velocidad de maduración de los eritroblastos. Disminuciones del flujo, la presión y el volumen sanguíneo o incrementos en la concentración de bióxido de carbono o la disminución del pH de la sangre, se han propuesto también como estímulos para la liberación de eritropoyetina, todos ellos en respuesta y como forma de incrementar la cantidad de eritrocitos circulantes y compensar las alteraciones fisiopatológicas que se desprenden de un suministro deficiente de oxígeno a los tejidos (4).

¿LA MADURACIÓN DE LOS ERITROCITOS ES UNA APOPTOSIS PARCIAL?

La primera fase para la maduración de los eritrocitos es una fase muy controlada, ya que la diferenciación de los eritroblastos lleva consigo lo que se podría considerar un mecanismo de apoptosis parcial que termina en la diferenciación hacia eritrocitos.

La eritropoyetina además de inducir eritropoyesis, también es capaz de detener la apoptosis de los eritroblastos, una vez que los dirige a su maduración. La eritropoyetina induce una serie de cambios moleculares, entre los que resulta una modulación positiva de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L y una disminución de la actividad de caspasas.

De manera muy interesante la maduración de estas células requieren de la activación de caspasas-3, -6 y -7 que están involucradas en la desaparición de orgánulos durante el proceso de formación de eritrocitos. Experimentos en donde se inhibe a las caspasas se compromete la maduración previniendo que los eritroblastos puedan llegar a eritrocitos. Las caspasas

de manera característica se activan en el proceso apoptótico y su inhibición reduce o evita la apoptosis en células nucleadas, este paralelismo favorece la idea de un fenómeno secuencial de apoptosis parcial en la maduración y que se completa con la eliminación del eritrocito del torrente circulatorio.

El proceso de maduración también requiere la participación de enzimas hidrolíticas del ADN (ADNsas); la ADNasa II es necesaria en el eritroblasto para el proceso de enucleación en la maduración lo que llevará finalmente a una célula sin núcleo. Se ha reportado que la ADNasa II del eritroblasto proviene de macrófagos por un proceso llamado remoción heterofágica; es decir un proceso en el cual vesículas con enzimas digestivas y proapoptóticas secretadas por los macrófagos, se integran a eritroblastos para completar la maduración y contribuir a la digestión del núcleo y culminar con esta etapa apoptótica (1, 4).

DIFERENCIAS Y SIMILITUDES ENTRE ERIPTOSIS Y APOPTOSIS

Si bien la apoptosis y la eriptosis comparten algunas características, también se diferencian claramente en otras. Las diferencias estriban, evidentemente, en la ausencia de núcleo y mitocondria en los eritrocitos. Sin embargo, las similitudes permiten identificar que se trata de un fenómeno similar adaptado a las características propias de los eritrocitos. Es interesante resaltar que si juntamos la apoptosis parcial del eritroblasto y la eriptosis vemos como si el eritrocito sufriera la primera parte de la apoptosis en el eritroblasto y la segunda en el eritrocito maduro que es removido y eliminado de la circulación.

Los primeros fenómenos de la apoptosis, tales como la lisis nuclear, la fragmentación del ADN, la translocación del citocromo-C, la depolarización y la lisis mitocondrial y nuclear no se presentan en la eriptosis, pero si en el eritroblasto durante el pro-

ceso que da origen al eritrocito. El eritroblasto también presenta activación de caspasas y evidentemente cambios de la membrana plasmática que incluyen alteraciones de forma y contracción celular. Las etapas más avanzadas de la apoptosis se identifican claramente en la eriptosis del eritrocito, la pérdida de potasio intracelular, la activación de canales de calcio, la activación de escramblasas (enzimas translocadoras de fosfolípidos), la contracción celular, la activación de caspasas, la activación de esfingomielinasa y la externalización de fosfatidilserina; eventos que no se presentan en el eritroblasto y que para el eritrocito son mecanismos necesarios para su retención por macrófagos en el sistema retículo endotelial y así, llevar cabo su destrucción no inflamatoria con la formación de vesículas similares a las vesículas apoptóticas (5).

CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS QUE INDUCEN LA ERIPTOSIS

La eriptosis puede ser empleada fisiológicamente por el organismo para destruir eritrocitos envejecidos, sin daño necrótico (hemolítico), favoreciendo la identificación de los eritrocitos envejecidos por las células del sistema retículo endotelial (macrófagos). El envejecimiento del eritrocito se caracteriza por un incremento en las concentraciones de calcio intracelular libre, debido a un incremento en las permeabilidades a calcio que pueden iniciarse por choque osmótico, estrés mecánico, depleción de energía o incremento de los procesos oxidativos que sobrepasen los sistemas de protección antioxidante. La eriptosis en última instancia es importante para prevenir la hemólisis dentro del sistema circulatorio, que evidentemente provoca cambios similares a la inflamación con liberación de enzimas degradativas como son las proteasas y las lipasas. La destrucción de los eritrocitos den-

tro de los vasos sanguíneos provocaría alteraciones de las condiciones fisiológicas de la sangre, alteraciones en la coagulación, daño a la microcirculación y daños renales, entre otros (6).

La eriptosis también puede iniciarse en el caso de infección de los eritrocitos con parásitos como la malaria o por virus hemolíticos como el parvovirus. También algunas enfermedades metabólicas pueden provocar un incremento de la eriptosis y reducir la vida media de los eritrocitos, estas enfermedades incluyen: la anemia sideroblástica ideopática adquirida, la deficiencia de hierro, la talasemia, la anemia falciforme, o las deficiencias de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa que es la deficiencia enzimática más frecuente en humanos. Así mismo, es posible encontrar datos de eriptosis en intoxicaciones con metales tales como mercurio y plomo (7, 8). En todos estos casos la externalización de fosfatidilserina permite que los eritrocitos sean identificados por macrófagos circulantes o por macrófagos del sistema reticuloendotelial que inician respuestas inmunológicas y terminan el proceso eriptótico del eritrocito afectado (4, 6).

MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS

Los principales mecanismos moleculares involucrados en el inicio de la eriptosis son la disminución de la carga energética de la célula (relación ATP/ADP, AMP) y la disminución del poder reductor del eritrocito a través de la relación NADP/NADPH y la de glutatión reducido/oxidado, así como por el estrés osmótico. Alguna de estas tres señales moleculares o las tres son el punto de convergencia de los factores que pueden provocar eriptosis (envejecimiento, estrés metabólico, daño toxico, infecciones, etc.) (9) (Fig. 1).

Las tres formas de estrés metabólico que pueden inducir eriptosis (energético, oxidativo y osmótico) producen un incremento de calcio intracelular

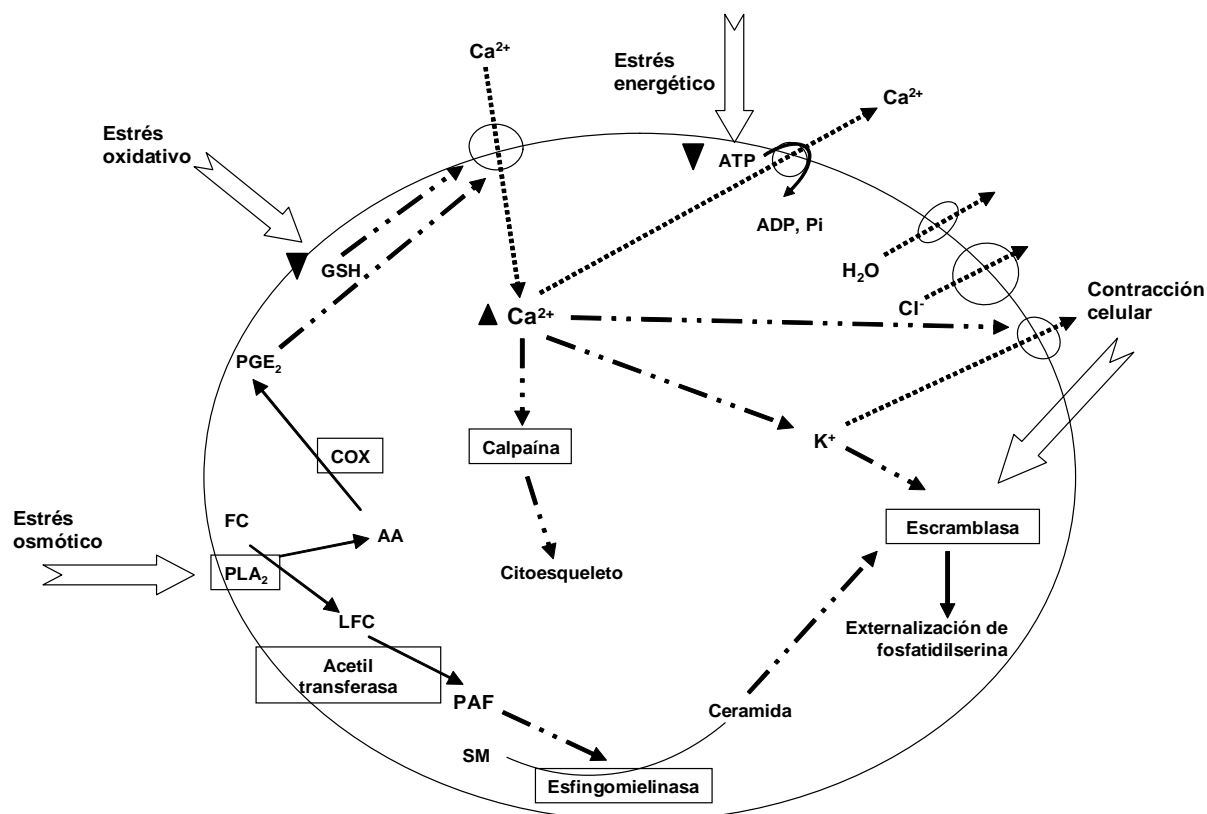


Figura 1. Mecanismos moleculares del proceso apoptótico en eritrocitos. Esquema de un eritrocito en eriptosis. Fosfolipasa A2 (PLA2), ácido araquidónico (AA), fosfatidilcolina (FC), lisofosfatidilcolina (LFC), factor de activación plaquetaria (PAF), esfingomielina (SM), glutatión reducido (GSH). Las líneas indican (— Sustrato a metabolito); (--- transporte); (— · — efecto regulatorio), ▲ indica un incremento, ▼ indica una disminución.

libre, aun cuando lo hacen por diferentes vías. En el caso del estrés energético la reducción de ATP afecta a la ATPasa de calcio, reduciendo su actividad y con ello la salida de calcio, con el consecuente incremento de calcio intracelular. Para el caso del estrés oxidativo, la reducción de glutatión reducido incrementa la permeabilidad a calcio a través del canal de cationes, permitiendo una mayor entrada de calcio y con ello el incremento de este catión en el interior del eritrocito. Por su parte el estrés osmótico, activa a la fosfolipasa A₂, que libera ácido araquidónico de la fosfatidilcolina, dicho ácido es convertido por la enzima ciclooxigenasa a prostaglandina E₂, la cual estimula al canal catiónico del que depende la entrada de calcio. Adicionalmente en diferentes experimentos se ha podido demostrar que los tres tipos de estrés (oxidativo, ener-

gético y osmótico) pueden activar a la ciclooxigenasa (Fig 1).

El incremento de calcio intracelular libre activa al canal Gardós (canal de potasio dependiente de calcio), que provoca la salida de potasio, que a su vez induce la salida de agua y de cloro, generando una contracción del eritrocito. Tanto el incremento del calcio intracelular, la disminución de potasio y la contracción de la célula, activan a una escramblasa de fosfatidilserina, lo que provoca la externalización de fosfatidilserina (Fig. 1).

Otra forma de activar a la escramblasa de fosfatidilserina depende de la ceramida, la acción de la fosfolipasa A₂ no solo genera ácido araquidónico, también genera un lisoderivado, el cual es transformado por una acetil transferasa en el factor de activación plaquetario (PAF: 1-O-alquil-2(R)acetil-gliceril-3-

fosforilcolina); factor involucrado en la regulación de procesos inflamatorios, trombosis y efectos cardiovasculares. El PAF es capaz de estimular a la esfingomielina y que genera ceramida, la cual actúa como un segundo mensajero para la señal de apoptosis en células nucleadas y que en este caso es capaz de estimular a la escramblasa de fosfatidilserina y con ello contribuir a la externalización de este fosfolípido (Fig. 1).

Otra enzima involucrada en la eriptosis y que es también una señal apoptótica en células nucleadas es la μ -calpaína, una proteasa de cisteína. Esta proteasa es activada por incrementos de calcio intracelular libre y después de sufrir autoproteólisis degrada proteínas del citoesqueleto, entre ellas a la espectrina y la fodrina desestabilizando con ello a las mem-

branas e induciendo la formación de microvesículas ("blebbing"), características de la apoptosis, y causando modificaciones en la forma del eritrocito (8, 10, 11) (Fig. 1).

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA ERIPTOSIS

La eriptosis puede ser útil para entender factores o elementos que inducen daño a los eritrocitos o les provocan envejecimiento prematuro y también puede ser un modelo para entender la apoptosis, en modelos evidentemente menos complejos que las células nucleadas.

El estudio de la eriptosis puede ser la base para entender mecanismos fisiopatológicos de enfermedades metabólicas e infecciosas que afectan a los eritrocitos; así mismo, nos puede permitir profundizar en el conocimiento de los mecanismos empleados por algunos parásitos intra-eritrocitarios, para permanecer y reproducirse en los eritrocitos sin dar señales para su remoción de la circulación y que no sean

atacados inmunológicamente. Así mismo el entender estos mecanismos nos permitirán tener alternativas para evitar la destrucción prematura de eritrocitos en enfermedades tóxicas o en toxemias endógenas como los síndromes urémico-hemolíticos o en las sépsis.

Finalmente, es posible que el entender la eriptosis nos dé alternativas para profundizar en el conocimiento de anemias asociadas a enfermedades autoinmunes.

CONCLUSIONES

La evidencias actuales en este campo de estudio indican cada vez con mas precisión que el eritrocito es capaz de sufrir una variante de apoptosis llamada eriptosis, lo que le permite removerlo de la circulación y destruirlo sin causar procesos de hemólisis y respuestas inmunológicas, que afecten la circulación a los órganos de remoción donde se encuentra el sistema retículo endotelial. Si se considera la maduración y después la destrucción del

eritrocito, podemos observar que el inicio de la apoptosis se da en eritroblasto en el proceso de maduración hacia eritrocito (apoptosis parcial) y se termina aproximadamente 120 días después en el proceso de destrucción del eritrocito (eriptosis). Esto implica pensar en dos posibilidades: una con un programa bioquímico que se consuma después de dejar en receso la apoptosis que se inició en el eritroblasto y que requiere señales moleculares que la vuelvan a reactivar. La otra posibilidad es la generación de una célula que se encuentra muriendo por apoptosis con una entropía muy lenta pero continua hasta su destrucción, completando la apoptosis. El estudio de estos procesos en diferentes fenómenos y patologías nos permitirá continuar entendiendo si el fenómeno de eriptosis se da en una célula muerta que se mantiene en la circulación momificada o si es una respuesta a un programa bioquímico establecido y el cual está en espera de que encontremos sus mecanismos reguladores.

REFERENCIAS

- Conti AA, Lippi D, Gensini GF (2005) The historical evolution of the concept of apoptosis in rheumatic diseases. *Reumatismo*. 57(1):57-61.
- Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, Ameisen JC (2001) Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ*. 8(12):1143-1156.
- Berg CP, Engels IH, Rothbart A, Lauber K, Renz A, Schlosser SF, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S (2001) Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ*. 8(12):1197-1206.
- Daugas E, Cande C, Kroemer G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ*. (12):1131-1133.
- Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T (2006) Osmotic shock-induced suicidal death of erythrocytes. *Acta Physiol (Oxf)* 187(1-2):191-198.
- Hermle T, Shumilina E, Attanasio P, Akel A, Kempe DS, Lang PA, Podolski M, Gatz S, Bachmann R, Bachmann C, Abele H, Huber S, Wieder T, Lang F (2006) Decreased cation channel activity and blunted channel-dependent eryptosis in neonatal erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. [Epub ahead of print].
- Quintanar-Escorza MA, González-Martínez Mt, Navarro L, Maldonado M, Arévalo B, Calderón-Salinas JV (2006) Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocyte of lead-exposed workers. Submitted to the *Toxicol Appl Pharmacol*.
- Quintanar Escorza Martha Angélica. Tesis de doctorado (2006) Departamento de Bioquímica CINVESTAV.
- Lang KS, Lang PA, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber SM, Lang F (2005) Mechanisms of suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem*. 15(5):195-202.
- Lang KS, Duranton C, Poehlmann H, Myssina S, Bauer C, Lang F, Wieder T, Huber SM (2003) Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ*. 10(2):249-256.
- Lang PA, Kempe DS, Myssina S, Tanneur V, Birka C, Laufer S, Lang F, Wieder T, Huber SM (2005) PGE(2) in the regulation of programmed erythrocyte death. *Cell Death Differ*. 12(5):415-428.