

MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y APOPTOSIS

FUNCION DE LAS MITOCONDRIAS

MARTA DUBIN, ANDRES O.M. STOPPANI

*Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina (UBA-CONICET),
Universidad de Buenos Aires*

Resumen La muerte celular fisiológica es un proceso natural programado genéticamente, controlado por mecanismos moleculares complejos, cuyo conocimiento es un objetivo primordial de la biología y la medicina contemporáneas. La apoptosis es un programa metabólico que, activado, induce la muerte celular según secuencias estereotipadas, que culminan con la fragmentación de la célula y la digestión de sus fragmentos por fagocitos. El efecto fisiológico de ese programa es la eliminación de células decadentes, dañadas o superfluas, sin liberar su contenido al entorno. Los procesos apoptogénicos se pueden desarrollar en tres fases, a saber, premitocondrial, mitocondrial y post-mitocondrial. Durante la primera fase, las noxas o señales apoptogénicas (agentes genotóxicos, radicales libres del oxígeno, corticoides, anticuerpos, etc.) actúan sobre las células activando mecanismos específicos, entre ellos proteasas específicas. Como consecuencia de esas señales, se produce la fase mitocondrial en la que las mitocondrias pierden funciones esenciales como el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y el mantenimiento de la homeostasis celular. También se producen radicales libres del oxígeno y se libera el citocromo *c*, se activan las caspasas y las endonucleasas, que pasan al citosol. Durante la tercera fase, se producen daños celulares letales por la acción de los factores apoptogénicos liberados, en particular la degradación de las estructuras proteicas y de los ácidos nucleicos. La contribución de las mitocondrias a la apoptosis es regulada por el poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PMPT) constituido por caspasas, hexoquinasa, citocromo *c*, ATP y ADP, en una zona de confluencia de las membranas mitocondriales interna y externa. El PMPT, es controlado por agentes apoptogénicos o antiapoptogénicos que lo abren o lo cierran según su estructura y las condiciones metabólicas. La apertura incontrolada del PMPT provoca la salida masiva de factores letales que provocan la necrosis celular. La permeabilidad del PMPT puede ser modificada por drogas con acción terapéutica potencial lo que plantea interesantes perspectivas para el desarrollo de quimioterápicos. Se examina la función de la apoptosis en patologías como las enfermedades degenerativas del sistema nervioso, las enfermedades autoinmunes, el SIDA y el cáncer.

Abstract *Programmed cell death and apoptosis. The role of mitochondria.* Physiological cell death and apoptosis are natural processes genetically programmed, subjected to control by complex molecular mechanisms which elucidation is of particular interest for biology and medicine. Mitochondria play an essential role in physiological cell death and apoptosis. Apoptogenic effects develop in three phases, namely: (a) pre-mitochondrial; (b) mitochondrial and (c) post-mitochondrial. During the first phase, apoptogenic signals (genotoxic agents, oxygen free radicals, corticoids, antibodies, etc.) interact with cell receptors activating specific mechanisms including thiol dependent proteases (caspases). As a consequence of those signals, mitochondrial damage results (membrane permeabilization, collapse of the membrane potential, swelling, membrane disruption, inhibition of electron transfer and oxidative phosphorylation). Other consequences of the mitochondrial disruption are the enhancement of free radical production and the exit of cytochrome *c*, caspases and endonucleases to the cytosol. During the third phase of apoptosis, free radicals and activated enzymes attack the cell protein structure and ADN, thus causing cell death. The mitochondrial regulation of apoptosis is controlled by the mitochondrial transitory permeability pore (MTPP) which is constituted by caspases, hexokinases, cytochrome *c*, ATP and ADP. MTPP is subjected to control by apoptogenic or antiapoptogenic agents which open or close it, according to their structure and the cell metabolic conditions. Uncontrolled opening of MTPP determines a massive exit of mitochondrial apoptogenic factors which in the cytosol and the nucleus exert their apoptogenic effects, thus producing cell death. MTPP can be modified by drugs with potential therapeutic actions thus opening interesting therapeutic possibilities. The role of apoptosis in pathologies such as degenerative diseases of the nervous system, autoimmunity diseases, SIDA and cancer is discussed.

Key words: cell death, apoptosis, necrosis, mitochondria, oxygen radicals, cancer

Recibido: 19-I-2000

Aceptado: 6-IV-2000

Dirección postal: Dr. A.O.M. Stoppani, Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4508-3680

Medicina mitocondrial

Las mitocondrias son las proveedoras principales de la energía que utilizan las células para sus funciones específicas. Defectos en la función mitocondrial causan más de 100 enfermedades. La notable expansión del conocimiento de la patología mitocondrial se ha originado en los progresos de la bioquímica, la bioenergética y la biología molecular de las mitocondrias¹. También es importante el descubrimiento de la producción de radicales libres del oxígeno por las membranas mitocondriales. La expresión clínica de los defectos mitocondriales se manifiesta en enfermedades degenerativas de diferentes órganos o tejidos. También se encuentran patologías mitocondriales como causas o signos del envejecimiento. A esta nosología a la que se ha denominado "medicina mitocondrial"¹ se debe agregar la participación de las mitocondrias en los procesos de muerte celular fisiológica¹⁻⁴ tema principal de esta revisión. Por razones de espacio, la bibliografía citada se ha limitado a los artículos más ilustrativos aparecidos durante los últimos años.

Muerte celular y/o apoptosis

Los organismos multicelulares están constituidos por un número predeterminado de células, que es característico para cada especie. Ese número resulta de la suma de dos procesos, a saber, (a) la multiplicación celular y (b) la muerte y eliminación de un número igual de células redundantes. El desequilibrio de esos procesos determina efectos que pueden ser letales, sea por exceso en la destrucción celular, causa de atrofia de tejidos y órganos o por destrucción defectuosa, causa de hiperplasias o neoplasias²⁻⁴. La muerte celular programada²⁻⁴ es de fundamental importancia para explicar procesos biológicos como (a) la formación y maduración de embriones; (b) la senilidad; (c) la formación de queratocitos; (d) la renovación del epitelio de las membranas mucosas y (e) la atrofia de órganos después de la eliminación de las hormonas tróficas, como consecuencia de la castración; (f) la muerte de los neutrófilos. La muerte celular programada² es un término funcional, que se usa para definir la muerte celular como parte normal de la vida de los organismos multicelulares.

La apoptosis (Kerr, 1972) es un término descriptivo que define un tipo de muerte celular con diversas características morfológicas²⁻¹⁶. Es el término más usado actualmente como referente de muerte celular programada. Apoptosis proviene del griego y significa la caída otoñal de hojas y pétalos (Homero). Se ha utilizado el término con diferentes connotaciones: (a) contracción atípica del volumen celular; (b) cambios morfológicos nucleares, acompañados por la contracción exagerada

del volumen celular; (c) la condensación de la cromatina nuclear y la fragmentación del ADN; (d) las alteraciones de las membranas celulares con aumento de la permeabilidad y ampollado ("blebbing"); (e) el aumento de la capacidad para ligar anexina; (f) la activación de proteasas catabólicas (caspasas); (g) la escisión de la queratina⁵⁻¹⁶. Lo más llamativo de las alteraciones apoptóticas son las alteraciones morfológicas. Brevemente, se puede decir que apoptosis es un proceso destinado a eliminar células infectadas o dañadas genéticamente, con efectos opuestos a la mitosis en la regulación del tamaño de los órganos y de los tejidos. Los términos apoptosis y muerte celular programada han originado controversias³ y en general, se acepta su sinonimia cuando la muerte celular depende de la intervención de proteasas (las caspasas). Pero la ausencia de esa intervención no previene necesariamente la muerte celular en cuyo caso el término apoptosis no sería pertinente³. Es interesante señalar que mientras muchas formas de apoptosis representan muerte celular programada, no se puede decir que todas las muertes celulares programadas están comprendidas dentro de la apoptosis. Por ejemplo, una muerte celular con todos los signos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis puede ser inducida por drogas citotóxicas y estímulos físicos. Estos casos de apoptosis no son programados, ya que representan las respuestas celulares a cambios en su entorno aunque la expresión estructural del proceso responde a las características de la apoptosis.

Una definición más bioquímica de apoptosis es la propuesta por Orrenius y col. (citado en Ref. 3) según la cual apoptosis es un proceso de muerte celular caracterizado por el aumento de la actividad de las caspasas, efecto sumado a alteraciones morfológicas características de la célula y de su núcleo. Esta definición tiene la virtud de basarse en una alteración bioquímica específica (el aumento de la actividad de las caspasas). Sin embargo, es objetable la exclusión de procesos afines, sin activación de caspasas, como los dependientes de radicales libres del oxígeno y de la sobreexpresión de los factores Bax y Bak³, como se verá ulteriormente. Se debe notar que la activación de los factores apoptogénicos y sus efectos ocurren antes de la citólisis y de la digestión de los fragmentos celulares apoptóticos por células vecinas en especial por los macrófagos^{4,12,13}. Las células apoptóticas no provocan reacciones inflamatorias de las células vecinas, y son eliminadas sin provocar daño tisular inmediato, dos características fundamentales para interpretar la importancia fisiológica de la apoptosis. Por último, la apoptosis se debe diferenciar de la necrosis¹⁷⁻²¹, un proceso pasivo en la que la muerte celular se produce por un daño directo, irreversible, de todas las estructuras celulares, como ocurre en la isquemia severa, por acción de temperaturas extremas, por agentes químicos diversos, o por trauma mecánico, entre otros^{6,12,17-21}. A diferencia

TABLA 1.– Diferencias entre apoptosis y necrosis

Parámetro	Muerte celular	
	Apoptosis	Necrosis
Morfología celular	Contraída	Expandida, con formación de microvesículas y liberación de citoplasma al espacio intercelular
Integridad de membrana plasmática	Sin modificaciones iniciales	Destrucción precoz
Cromatina nuclear	Condensada; localizada en la vecindad de la membrana nuclear	Desintegrada
ADN nuclear	Daño precoz ("strand-breaks")	Daño tardío
Fragmentación del ADN	Ordenada; fragmentos de 180-200 pares de bases; producidos por endonucleasas	Desordenada; producida por nucleasas lisosomales
Tejidos pericelulares	Signos de fagocitosis solamente	Signos de inflamación extensos
Mitocondrias	Sin modificaciones visibles	Hinchadas
Membrana nuclear	Normal	Rota y deformada ("blebbing")
Requerimiento energético	Necesario	Innecesario
Síntesis de proteínas	Necesaria	Detenida

de la apoptosis, la necrosis provoca reacciones manifiestas de los tejidos circundantes. La Tabla 1 reseña las diferencias entre apoptosis y necrosis.

Mitocondrias y apoptosis

Las mitocondrias son agentes protagónicos de la apoptosis y sufren modificaciones importantes durante ese proceso²²⁻²⁸. La intervención de las mitocondrias en la apoptosis ha renovado el interés por el estudio de esas organelas celulares, pues ha permitido comprobar nuevas funciones mitocondriales, ignoradas anteriormente y comprender mejor el papel fisiopatológico de las mitocondrias. Los siguientes efectos demuestran la importancia de la función mitocondrial en la apoptosis: (a) la alteración de la permeabilidad y la disipación del potencial de la membrana mitocondrial interna que precede a menudo a todas las otras modificaciones inherentes a la apoptosis²⁹⁻³⁵; (b) la inhibición de la cadena de transporte de electrones^{36, 37} y de la síntesis de ATP³⁸; (c) la rotura de las membranas mitocondriales con salida de proteínas solubles tanto las pertenecientes a la matriz mitocondrial como las provenientes del espacio intermembrana, entre estas últimas el citocromo *c*³⁹⁻⁴²; (d) la acción antiapoptótica de drogas capaces de estabilizar las membranas mitocondriales^{43, 44}; (e) la producción/interacción de "especies reactivas del oxígeno"⁴⁵⁻⁵⁰ y del nitrógeno^{51, 52} en las membranas mitocondriales,

con acción citotóxica conocida (Boveris y col.^{45, 46} fueron los primeros en observar esa producción); (f) la acción de los factores Bcl-2, sus análogos Bax y Bak que inhiben o activan los mecanismos mitocondriales (se verá en las secciones correspondientes).

Fases de la apoptosis

La evolución de la apoptosis presenta tres fases que se pueden calificar como (a) la fase pre-mitocondrial o de inducción; (b) la fase de daño mitocondrial efectivo (fase efectora) y (c) la fase post-mitocondrial, degradativa o de lisis celular^{27, 28}. La primera fase involucra a la membrana plasmática y sus adyacencias. La segunda fase involucra a las membranas, la matriz mitocondrial. La tercera fase involucra a todas las estructuras celulares incluyendo al núcleo celular y termina con la citolisis. La Figura 1 ilustra sobre el desarrollo de la apoptosis y la función de los diferentes factores que la inducen y/o la regulan. Durante la primera fase las células reciben diferentes estímulos apoptogénicos extracelulares. Entre esos estímulos se cuentan: mutágenos⁵³, drogas citotóxicas^{54, 55}, especies reactivas del oxígeno (EROS)^{56, 60}, anoxia, glucocorticoides⁶¹, inmunoglobulinas, radiaciones ionizantes^{62, 63} y la hipertermia. Los glucocorticoides y las inmunoglobulinas actúan sobre receptores específicos, a saber, GC y FAS (Figura 1). FAS (APO-1 o CD 95)^{9, 64, 65} es una proteína de la membrana plasmática de

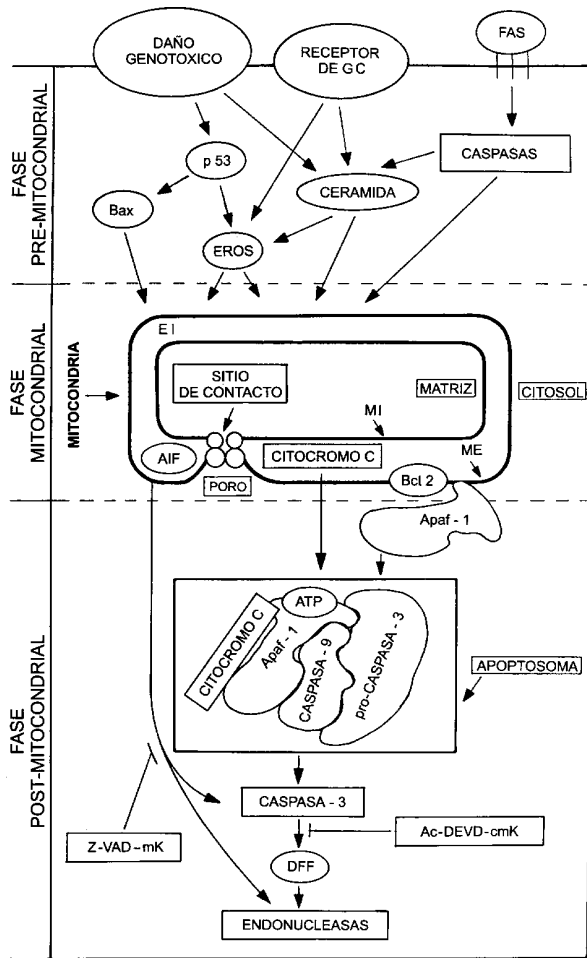


Fig. 1.— Fases de la apoptosis. El esquema representa la membrana celular (línea externa), una mitocondria y el apoptosoma, como estructuras fundamentales de la apoptosis. Los nombres y abreviaturas significan: daño genotóxico, efecto de mutágenos y toxinas. GC, glucocorticoides. FAS, receptor de varios apoptógenos, incluyendo anticuerpos. Bax, miembro de la familia Bcl-2, regulador de caspasas, p53, expresión del gen p53, factor antitumoral. EROS, especies reactivas del oxígeno ceramida, constituyente de esfingolípidos. MI y ME, membranas mitocondriales interna y externa, respectivamente. Caspasas, proteasas tiol-dependientes. Poro, poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PMPT); los círculos son componentes (ver texto); AIF, activador proteolítico de la caspasa-3 y de endonucleasas; APAF-1, ligante de Bcl-2 a la membrana mitocondrial externa. DFF, factor de fragmentación del ADN. Z-VAD-mk, Ac-DEVD-emk inhibidores enzimáticos.

significativa importancia funcional que reacciona a anticuerpos anti-FAS formando complejos apoptogénicos. FAS es un ejemplo de receptor apoptogénico. La acción de FAS se ejerce por medio de radicales libres del oxígeno, por ejemplo, en monocitos⁶⁴, pero en células tumorales el superóxido inhibe la función de FAS⁶⁵. Otro factor apoptogénico importante es la ceramida, un producto de hidrólisis de los esfingolípidos⁶⁶⁻

⁶⁸. La ceramida liga al receptor FAS y libera un mensajero, posiblemente un gangliósido que actúa sobre las mitocondrias. Durante esta fase de la apoptosis, las caspasas activadas actúan sobre las membranas mitocondriales, en particular sobre el poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PMPT)^{27, 28, 69} también llamado canal megamitocondrial (Figura 1, el poro).

Durante la segunda fase de la apoptosis (fase efectora), se producen cambios significativos en la función de las membranas mitocondriales, que se traducen en un incremento de la permeabilidad de las mismas. Se produce la apertura del poro de permeabilidad transitoria (PMPT)⁶⁹. Estos efectos facilitan la salida de iones calcio de la matriz mitocondrial al citosol^{69,72}, el colapso del potencial $\Delta\Psi$ de la membrana mitocondrial²⁹⁻³⁵, el aumento en la producción de radicales libres del oxígeno en la misma⁴⁵⁻⁵⁰, lo mismo que la depleción del GSH (glutatión reducido), del ATP y del ADP en la matriz mitocondrial⁷³. Como resultado de esos efectos, se produce el aumento del volumen mitocondrial (swelling) que culmina en el estallido de la mitocondria (Figura 2). Durante la segunda fase, las células son programadas irreversiblemente para morir. La decisión entre muerte y vida, depende de la información suministrada por proto-oncogenes y genes onco-supresores (Figura 1). La acción específica de esos factores se verá oportunamente. En esta fase se produce la activación de las caspasas y los citados cambios en el voltaje y el potencial redox.

En la tercera fase de la apoptosis, la salida de los factores apoptogénicos mitocondriales, liberados al citosol, sumados a los generados en el mismo citosol promueven la destrucción de las proteínas, del ADN, del ARN y de las membranas celulares consumando así la muerte celular. Algunas proteínas liberadas tienen capacidad para activar caspasas y nucleasas citosólicas. En primer término, el citocromo c que junto con el factor Apaf-1, ATP y caspasa-9 forma el proteosoma (Figura 1). El citocromo c activa a la caspasa-3, que a su vez activa la endonucleasa nuclear. En segundo término, las mitocondrias apoptóticas liberan una proteína activa denominada AIF, que también activa las endonucleasas independientemente del citocromo c. Por último, las proteínas mitocondriales intermembrana incluyen una ADNasa específica que degrada la doble hélice del ADN²⁸. Durante esta última fase, aparecen las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis, a saber, condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la degradación masiva de proteínas esenciales, nucleolisis y finalmente citolisis.

Un comentario especial merece el efecto de la apertura incontrolada del PMPT para el desarrollo de la tercera fase de la apoptosis, en relación con la entrada y salida de iones Ca^{2+} de las mitocondrias⁶⁹⁻⁷². Los iones Ca^{2+} son los reguladores más potentes de la función del PMPT y también activadores efectivos de caspasas. Esos

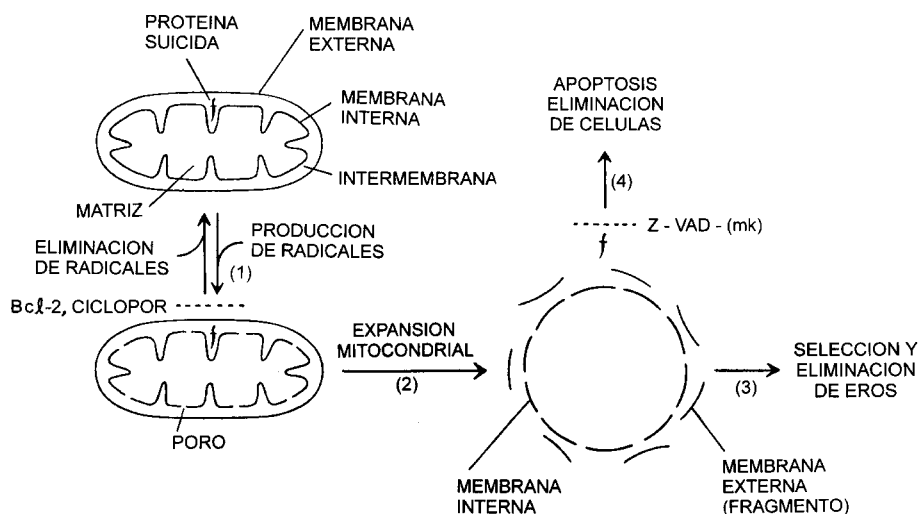


Fig. 2.— Mecanismo de apoptosis por EROS¹³³. Etapa 1: EROS y otros factores apoptogénicos citosólicos actúan sobre la mitocondria induciendo la apertura del poro PMPT y el colapso del potencial $\Delta\Psi$ de la membrana mitocondrial interna, la sobreproducción de EROS es necesaria para la apertura del PMPT. Etapa 2: el desequilibrio osmótico entre matriz y espacio intermembrana produce la expansión (“swelling”) mitocondrial y la membrana externa se rompe. Etapa 3: aumenta la producción de EROS y se seleccionan y se eliminan apoptógenos al citosol. Etapa 4: la liberación de las proteínas del espacio intermembrana como el citocromo c, nucleasas (“proteína suicida”) y las caspasas, completan la apoptosis y facilitan la fagocitosis de la célula. Etapa 4: los inhibidores de caspasas (Z-VAD-(mk)) previenen la citolisis.

iones son captados rápidamente por un transportador unidireccional de la membrana mitocondrial interna y desde la matriz mitocondrial actúan sobre el PMPT regulando la apertura del mismo. Las concentraciones de Ca^{2+} menores de $10 \mu\text{M}$ facilitan la acción de otros reguladores. Como la superficie de la membrana externa es mucho menor que el de la membrana interna, debido a la existencia de crestas en esta última, la apertura del PMPT origina el estallido de las membranas mitocondriales con liberación de las proteínas solubles presentes en el espacio intermembrana y en la matriz mitocondrial. Los efectos descritos en las Figuras 1 y 2 constituyen una versión elemental de la apoptosis y su mecanismo. Las interacciones entre los distintos factores moleculares y enzimáticos que intervienen en ese complejo proceso se sugieren por las flechas indicadoras. Las interacciones posibles superan lo descrito y constituyen temas de investigación de gran actualidad.

Apoptosis, especies reactivas del oxígeno (EROS) y del nitrógeno

Especies reactivas del oxígeno (EROS): superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, son potentes promotores de la apoptosis⁵⁶⁻⁶⁰. La acumulación de EROS

en las mitocondrias es el resultado del balance entre dos procesos: (a) la producción de esos radicales por reacciones redox en la membrana mitocondrial interna y (b) eliminación de los mismos por mecanismos desintoxicantes conocidos. Entre esos últimos mecanismos, el dependiente del glutatión (GSH/GSSG)^{47, 73} tiene un importante papel pero se debe tener en cuenta que, la depleción del GSH produce la apertura del PMPT²⁸, un efecto apoptogénico. El PMPT tiene dos mecanismos sensibles a EROS, uno que se equilibra con el GSH de la matriz, y otro que es directamente inactivado por EROS²⁸. La sobreproducción de EROS puede ser también la consecuencia de una expresión exagerada de la proteína p53 o de la acción de la ceramida. Otro factor importante en la producción de apoptosis es el óxido nítrico (ON) y su derivado el peroxinitrito⁷⁴⁻⁷⁹. Concentraciones nanomolares de ON inhiben rápida y reversiblemente a la citocromo oxidasa mitocondrial^{51, 76} y en esa forma estimulan la producción de EROS. La producción fisiológica del ON es catalizada por la ON-sintasa, enzima inducida por citoquinas en células como los macrófagos y los astrocitos donde se producen concentraciones de ON del orden de $1.0 \mu\text{M}$. Esas concentraciones de ON son capaces de inhibir la respiración de las mismas células generadoras de ON o de células próximas. En células del cerebro, la inhibición de la citocromo

oxidasa por ON determina la liberación de ácido glutámico responsable de la toxicidad del ON en esas células⁷⁹. El ON inhibe además la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo I, efecto que se explica por la nitrosilación de grupos tioles. En presencia del anión superóxido el ON produce peroxinitrito que tiene varios efectos inhibidores^{74, 75}. El peroxinitrito inhibe a la aconitasa y la creatina quinasa, aumenta la salida de protones al citosol. Todos esos efectos llevan a la apertura del PMPT, cuyas consecuencias apoptogénicas se han comentado.

Apoptosis y caspasas

Las caspasas⁸⁰⁻⁹² son proteasas dependientes de tioles (residuos de cisteína), caracterizadas por su especificidad para hidrolizar péptidos y proteínas en la vecindad de residuos aspárticos. Su especificidad catalítica ha originado el término "caspasa" en el que la "c" representa al residuo cisteína de la enzima y "aspasa" representa residuos aspárticos de la proteína sustrato^{82,84}. Por su estructura y actividad proteolítica específica, se conocen por lo menos 10 caspasas que se ordenan por los números correspondientes, caspasa-1, caspasa-2, caspasa-3, etc. Las caspasas actúan en las mitocondrias, en el citosol y en el núcleo celular e incluyen los grupos siguientes^{82, 84}: (a) mediadores de la inflamación (caspasa-1, -4 y -5); (b) efectores de la apoptosis (caspasa-3, -7 y -2); (c) activadoras de caspasas apoptogénicas (caspasas-6, -8, -9 y -10). Todas las caspasas tienen en su sitio activo una secuencia pentapeptídica QACXG (o sea Glu-Ala-Cys-X-Gly; X puede ser Arg, Glu o Gly). En la célula se sintetizan como pro-enzimas inactivas (procaspasas) que se pueden activar por autocatálisis. La actividad proteolítica depende del estado redox⁸⁹ y del balance pro-oxidante/anti-oxidante^{86, 87} en la célula. Algunas caspasas son reguladas por el receptor FAS^{89, 92}, por el citocromo *c* y por el factor inductor de la apoptosis AIF que pasan de las mitocondrias al citosol²⁷ como consecuencia del daño mitocondrial inducido por la apoptosis.

La actividad proteolítica de las caspasas está limitada por la naturaleza de las proteínas sustrato⁸²⁻⁸⁵. Así el sustrato, PARP (poli-(ADP-ribosa)polimerasa), es hidrolizado por la caspasa-3 en dos fragmentos, uno de los cuales contiene el extremo N-terminal y liga el ADN, mientras que el otro fragmento contiene el extremo C-terminal que ejerce la actividad catalítica. Otra proteína sustrato atacada por las caspasas es la proteína quinasa ADN-dependiente, una enzima que interviene en la reparación de la doble-hélice del ADN. Durante la apoptosis esa proteína-quinasa es degradada por la caspasa-5 pero no por las caspasas-1, -4 y -6. Su degradación produce

una disminución significativa de la aptitud celular para reparar ADN lo que suprime una función homeostática esencial y facilita la degradación de la cromatina del núcleo. Otro sustrato es la laminina, una proteína importante de la membrana del núcleo. La caspasa-6 parece ser la responsable de su degradación cuya cinética es más lenta que la de las otras proteínas hidrolizadas por caspasas. Los oncogenes activan a las caspasas⁸⁸. Así, extractos de células "transformadas" por el oncogén adenovirus EA, ("extractos transformados") activan la apoptosis, efecto que no se observa con los extractos testigos "no-transformados". La actividad oncogén-dependiente de los extractos transformados, se debe a la acción del factor APAF-1, activo sobre la caspasa-9, lo que indica que esa caspasa es el "iniciador" de la actividad apoptótica. La caspasa-3 activa selectivamente al receptor⁸⁹⁻⁹² a FAS, la familia de receptores del factor de necrosis tumoral⁸⁹. La actividad de las caspasas diferencia la apoptosis de la necrosis celular⁸⁵. La activación de la caspasa-3 por el calcio activa la apoptosis nuclear y correlaciona los movimientos del calcio⁷² con el desarrollo pleno de la apoptosis. Las mitocondrias pueden liberar por lo menos dos factores fundamentales en la apoptosis: (1) el AIF que es capaz de activar a la caspasa 3, y a endonucleasas; (2) el citocromo *c*, que con dATP, el factor Apaf-3 y la caspasa 9, constituye el apoptosoma (Figura 1). Como resultado de esa conjunción de factores, se activa la caspasa-3 que cliva y activa el factor de fragmentación del ADN (DFF), un activador de endonucleasas que actúan sobre el ADN nuclear. Por su parte, el citocromo *c* activa las caspasas en su forma holo, con el grupo hemo unido, aunque parece ser que esa estructura más su función como aceptor de electrones son esenciales para la actividad sobre las caspasas. Parecería muy factible que la activación primaria de las caspasas no es suficiente para disparar la cascada apoptótica y que la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales liberados por las caspasas es requerida para llevar a cabo el proceso apoptótico. Las caspasas actúan como ejecutantes principales de la apoptosis inducida por drogas⁹⁰ mientras que en la apoptosis iniciada por los receptores apoptogénicos activados, las caspasas forman, además, una parte integral del mecanismo que conduce a la muerte celular.

Reguladores de la apoptosis: Bcl-2 y análogos; Bax, Bak y p53

Las proteínas Bcl-2 constituyen una familia de reguladores de la apoptosis⁹³⁻⁹⁸. Algunas de ellas Bcl-2, Bcl-Xl y Bcl-2w inhiben, mientras que otras (Bax, Bak, Bik, Bad, Bim, etc) estimulan el desarrollo de la apoptosis. La asociación de Bcl-2, un homólogo de la proteína Ced-9 del

Caenorhabditis elegans, con la membrana mitocondrial externa⁹⁴ concuerda con la función mitocondrial en la apoptosis, función independiente de la conocida generación de ATP. Esa nueva función mitocondrial podría ser la producción de radicales libres del oxígeno en la membrana interna, regulada por Bcl-2 (acción antioxidante).

Bcl-2 y Bcl-XI previenen la depolarización de la membrana interna y de esa manera previenen la apoptosis⁹⁵⁻⁹⁷. El dominio hidrofóbico C-terminal de Bcl-2 se fija en la membrana mitocondrial externa mientras que el N-terminal se orienta al citosol. Bcl-2 se fija a la membrana mitocondrial externa en la proximidad del PMPT, cuya apertura regula y por lo tanto, todos los efectos inherentes a la misma²⁹. Bcl-2 inhibe también la liberación de la ceramida, la producción de los radicales libres del oxígeno, la oxidación de la cardiolipina de las membranas y la difusión del Ca²⁺ de la matriz mitocondrial al citosol⁹³. La sobreproducción de Bcl-2 impide o disminuye la acción de agentes apoptogénicos como el citocromo *c*⁹⁴, el atracilósido, el t-butilhidroperóxido, el Ca²⁺ (a concentraciones bajas) y la protoporfirina IX. Bcl-2 facilita la retención de proteínas alojadas en el espacio intermembrana, como el citocromo *c* y compleja a la proteína APAF-1 que liga el citocromo *c* a las caspasas. En contraste con la acción de Bcl-2, la proteína Bak⁹⁹ induce el colapso de la membrana interna, libera citocromo *c* y activa la caspasa-3²⁴. Todos esos efectos son inhibidos por la ciclosporina. El mecanismo de acción de las proteínas Bcl-2 no se conoce bien pero es probable que éstas actúen constituyendo poros de permeabilidad o ligando otras proteínas reguladoras de la apoptosis. En general, las proteínas de la familia Bcl-2 actúan por (a) formación de dímeros con otras proteínas del grupo; (b) regulación de poros; (c) formación de complejos con otras proteínas reguladoras. Por último, la proteína Bak, otro agente pro-apoptótico, no actúa directamente sobre la mitocondria, sino por medio de la proteína Bcl-XI con la que forma complejos inhibiendo su acción antiapoptótica.

La proteína p53 es un potente antagonista del crecimiento de tumores¹⁰⁰⁻¹⁰⁵. Es un polipéptido de 393 aminoácidos, secuencia que se puede dividir en cuatro unidades polipeptídico funcionales: (a) residuos 1 al 43 (secuencia transactivadora); (b) los residuos 100 al 300 (secuencia que liga específicamente al ADN); (c) residuos 320 al 360 (secuencia oligomerizante) y (d) los residuos 330 al 339 (secuencia para la localización y ligadura inespecífica del ADN). La proteína p53 se caracteriza por su capacidad para inducir apoptosis y detener la multiplicación celular (ciclo de la mitosis). Las células de los organismos deficientes en el gen p53 no hacen apoptosis como respuesta a las radiaciones ionizantes^{63, 100} y a los citostáticos como el fluorouracilo, el etopósido y la adriamicina. La proteína se sintetiza por transcrip-

ción del gen p53, cuya mutación selectiva favorece el desarrollo de tumores. Como contraparte de ese efecto, algunos tumores producen durante su desarrollo una disminución de la expresión de p53.

La proteína p53 tiene funciones que implican la ligadura al ADN¹⁰², como la activación de la transcripción y el control del acceso de la célula al proceso de apoptosis. La regulación de la reparación del ADN es esencial para el control del crecimiento de los tumores y por lo tanto, para el resultado del tratamiento clínico del cáncer. En este contexto cabe destacar que a) la mutación del gen p53 es frecuente en los tumores humanos y del ratón; (b) p53 controla la respuesta celular al daño al ADN y la mitosis, a través de otro factor regulador p21.

Apoptosis, patología y clínica

En las secciones precedentes se definió a la apoptosis como un mecanismo de muerte celular caracterizado por alteraciones estructurales y bioquímicas específicas. Ese mecanismo es constitutivo en la gran mayoría de los organismos, y puede ser activado por una amplia variedad de agentes biológicos químicos o físicos^{1, 5, 8, 9, 11, 106} y tienen una función esencial en numerosas patologías^{5, 11, 105}. Las patologías relacionadas con la apoptosis se pueden clasificar en dos grandes grupos: (a) las asociadas con la inhibición de la apoptosis y (b) las asociadas con la activación de la apoptosis. La Tabla 2 incluye enfermedades en las que el papel de la apoptosis parece importante. Por el objetivo de esta revisión parece oportuno comentar algunos aspectos de esas patologías.

TABLA 2.- Importancia fisiopatológica de la apoptosis

Enfermedades dependientes de activación de la apoptosis	Enfermedades dependientes de inhibición de la apoptosis
1. Enfermedades neurodegenerativas	1. Cáncer: Linfomas; Carcinomas con mutación del gen p53; Cáncer de mama; Cáncer de próstata; Cáncer de ovario.
2. SIDA	2. Enfermedades autoinmunes
3. Displasias medulares (anemia aplásica)	Lupus eritematoso sistémico
4. Reperfusión post-isquemia	Glomerulonefritis
5. Intoxicaciones por fármacos y xenobióticos	3. Virosis: Herpes; Poxvirus; Adenovirus

Enfermedades degenerativas del sistema nervioso

La apoptosis tiene importante función en la esclerosis lateral amiotrófica, las enfermedades de Alzheimer, de Parkinson, la corea de Huntington, la ataxia de Friedriehs, y presumiblemente, el síndrome senil (envejecimiento)^{110, 106}. Esas patologías pueden involucrar la acción de diferentes noxas. Estudios con neuronas en desarrollo (cultivos) muestran las acciones apoptogénicas específicas que pueden contribuir a la fisiopatología del sistema nervioso. Entre esos agentes se encuentran intermediarios metabólicos o citotóxicos, como el ácido glutámico, la 6-hidroxidopamina, la dopamina, la superóxido dismutasa mutada, la toxina parkinsoniana MPTP, fragmentos de amiloide y una proteína del virus del SIDA¹⁰⁶. En general, las concentraciones bajas de neurotóxicos inducen apoptosis mientras que las concentraciones altas inducen necrosis neuronal¹⁰⁶. Las alteraciones de las membranas mitocondriales de las neuronas dañadas por los agentes apoptogénicos son similares a las observadas con otras células. Se debe destacar la función de los radicales libres del oxígeno¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, del ON¹¹⁰, del calcio¹¹¹ y la del poro PMPT^{28, 29}, cuya apertura permite la salida de los factores apoptogénicos mitocondriales al citosol neuronal. El papel de EROS es notable en la esclerosis lateral amiotrófica, en la que la mutación de la superóxido dismutasa priva a la célula de un mecanismo antioxidante esencial¹¹²⁻¹¹³. En la ataxia de Friedriehs, el acúmulo de hierro por metabolismo defectuoso de la ferritina determina mayor producción de EROS, que sumado a la deficiencia de la proteína mitocondrial frataxina, es la causa de la enfermedad¹¹⁴. Es sabido que los radicales libres del oxígeno oxidan a las proteínas de la mielina¹¹⁵, una molécula esencial para el funcionamiento de las neuronas. El daño mitocondrial en las neuropatías concuerda con las alteraciones del ADN mitocondrial^{114, 116}. Por otra parte, el ON y/o su derivado el peroxinitrito dañan a las proteínas neuronales, porque nitrán los residuos de tirosina¹¹⁷. La acción de EROS en la enfermedad de Parkinson ha sido postulada en diferentes oportunidades^{108, 118-120} y lo mismo ocurre con la enfermedad de Alzheimer¹²¹⁻¹²³.

Las modificaciones mitocondriales y citosólicas en las neuronas de los pacientes de Alzheimer, de Parkinson y de Huntington son demostrativas^{106, 118-123}. Las alteraciones del núcleo de las neuronas, especialmente la condensación de la cromatina y las roturas ("strand-breaks") del ADN son menos evidentes. Esas alteraciones son esenciales para aceptar la existencia de apoptosis. Por ello, parece razonable considerar a las alteraciones mitocondriales y citosólicas como signos de un proceso primario que se puede denominar "pre-apoptosis". Las modificaciones nucleares en cerebros de Alzheimer, aparecen lentamente durante la evolución clínica de la

enfermedad, tienen una distribución dispersa, y se suman al aumento del factor p53 y de las transaminasas¹⁰⁶. Las alteraciones "pre-apoptóticas", agravadas por la isquemia relativa por aterosclerosis¹²⁴, las deficiencias nutricionales, y la acción de los peróxidos, contribuyen al desarrollo pleno de la enfermedad. Los mecanismos apoptogénicos postulados concuerdan con la disminución del transporte de electrones mitocondrial, en particular, de la citocromo oxidasa, en pacientes con Alzheimer.

Enfermedades por autoinmunidad

Los linfocitos-T y los linfocitos-B son constituyentes esenciales del sistema inmunitario. Ante estímulos exógenos (múltiples y variados) los linfocitos producen receptores específicos para esos antígenos, convirtiéndose en linfocitos inmunes. Cuando estos linfocitos reaccionan con antígenos endógenos se convierten en "autorreactivos"¹¹. Normalmente los linfocitos autorreactivos son detectados durante su desarrollo y destruidos por apoptosis. De esa manera, la apoptosis constituye un mecanismo esencial para el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria¹¹. Si el reconocimiento y la destrucción no se produce oportunamente, los linfocitos autorreactivos producen enfermedad por autoinmunidad. Un ejemplo de esa patología es el lupus eritematoso sistémico del hombre y su equivalente, el síndrome linfoproliferativo del ratón¹¹. Normalmente, el gen *lpr* codifica al receptor de la membrana plasmática FAS (Figura 1). El ligando endógeno de FAS es el producto del gen murino *gld*. FAS y su ligando endógeno son esenciales para la activación de la apoptosis de los linfocitos-T correspondientes, y por ello, la deficiencia en el producto del gen *lpr* o del gen *gld*, impide la apoptosis de los linfocitos autorreactivos y como consecuencia de ello, se produce el síndrome linfoproliferativo del ratón. En el hombre, la inhibición de apoptosis de los linfocitos-T autorreactivos resulta de un mecanismo diferente, a saber, el exceso de factor Bcl-2⁹.

En el SIDA, la linfopenia y la inmunodeficiencia características de esa enfermedad dependerían de una mayor propensión de poblaciones de linfocitos-T a la muerte por apoptosis¹¹. La glicoproteína *gp120* del virus HIV podría ser el agente sensibilizante de esos linfocitos. La ligadura de *gp120* por el receptor CD4 de esas células seguida por la floculación de las mismas por el anticuerpo para *gp120* activaría a los linfocitos-T CD4 para la apoptosis. Esos efectos podrían transmitirse a células no infectadas, por intermedio del receptor CD4. Otros factores que contribuirían a la mayor actividad apoptótica de los linfocitos de individuos infectados con HIV es la elevación de citoquinas (TNF2 α), sobre la producción de EROS y la disminución de antioxidantes como el GSH

en las células infectadas. Esta última posibilidad concuerda con el efecto favorable de antioxidantes como la N-acetilcisteína sobre la evolución del SIDA^{11,125}. En este contexto, parece oportuno recordar que la falta de respuesta *in vitro* de los linfocitos-T a agentes apoptogénicos específicos durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas experimental del ratón, se debe a la apoptosis¹²⁶.

Cáncer

Cáncer, apoptosis y producción de EROS¹²⁶ son procesos directamente relacionados¹²⁷⁻¹²⁹. Los retinoides inducen la apoptosis de diferentes células neoplásicas por producción de EROS¹³⁰. La velocidad de multiplicación y muerte de las células mutadas, regula el crecimiento de un tumor. Si el índice de apoptosis es alto, el tumor crece lentamente, pero si es bajo, el tumor crece rápidamente. La relación multiplicación/apoptosis celular no es absoluta porque algunas células tumorales inhiben la apoptosis en su entorno. La apoptosis, es un proceso útil que previene la transformación maligna porque las células mutadas o dañadas, sufren más fácilmente apoptosis que las normales¹¹. Observaciones sobre el cáncer hepático de la rata¹²⁹ han permitido evaluar la importancia de la apoptosis sobre el crecimiento del cáncer inducido por acetato de ciprosterona, nafenopirina o activina. Se ha comprobado que la proporción de células apoptóticas crece en los hepatocitos pre-neoplásicos o neoplásicos. En esas condiciones, la muerte celular compensa transitoriamente la formación de células malignas. Los carcinógenos desplazan al equilibrio en favor de la replicación de los hepatocitos transformados, en forma reversible porque si se suprime el carcinógeno se recupera la estructura normal.

De gran importancia para la evolución de algunos tipos de cáncer son los factores Bcl-2, Bax y p53^{104,131,132}, ya mencionados en esta revisión. Bcl-2 es un supresor mientras que Bax es un promotor de la muerte celular. Cuando Bcl-2 está sobre-expresado, las células son menos sensibles a la quimioterapia. El agente del gen Bcl-2 es la proteína p26-Bcl-2 y la relación Bcl-2/Bax es un buen indicador de la respuesta del cáncer, por ejemplo del cáncer de próstata, al tratamiento. La proteína p53 es el componente principal del mecanismo por el cual las células humanas normales detienen su crecimiento y activan el programa apoptótico, ante el daño al ADN. La mutación de p53 impide dichas funciones.

Conclusión

El progreso reciente en el conocimiento de la muerte celular programada y de la apoptosis constituyen anticipos de otros descubrimientos, seguramente trascendentes, que deberán ocurrir en un futuro próximo.

Para que ese progreso se cumpla la investigación clínica, apoyada por la Biología Celular, la Biología Molecular y la Bioenergética, tendrá función protagónica.

Agradecimientos: este trabajo se realizó con subsidios de la Universidad de Buenos Aires y la Fundación Alberto J. Roemmers. MG Gutiérrez y MAE Verón prestaron eficaz ayuda técnica.

Bibliografía

- Luft R. The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8731-8.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999; 96: 245-54.
- Vaux DL. Caspases and apoptosis-biology and terminology. *Cell Death Differentiation* 1999; 6: 493-94.
- Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J-L, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; 9: 1279-87.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* 1995; 267: 1456-62.
- Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 1208-14.
- Vaux DL, Haecker G, Strasser J. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76: 777-9.
- Haecker G, Vaux DL. Viral, worm and radical implications for apoptosis. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 99-100.
- Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1286-96.
- Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 26-30.
- Orrenius S. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human diseases. *J Intern Med* 1995; 237: 529-36.
- Bär PR. Apoptosis - The cell's silent exit. *Life Sci* 1996; 59: 369-78.
- Umansky SR. Apoptosis: Molecular and cellular mechanisms (A Review). *Mol Biol* 1996; 30: 285-95.
- Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis - the story so far. *Experientia* 1996; 52: 933-41.
- Cummings MC, Winterford CM, Walker NL. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 88-101.
- Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 1-9.
- Palomba L, Sestili P, Cattabeni F, Azzani A, Cantoni O. Prevention of necrosis and activation of apoptosis in oxidatively injured human myeloid leukemia U937 cells. *FEBS Lett* 1996; 390: 91-4.
- Moynault A, Luciani MF, Ghimini G. ABC1, the mammalian homologue of the engulfment gene ced-7, is required during phagocytosis of both necrotic and apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 1998; 26: 629-34.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 177-96.
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E: Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 69-73.
- Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta B, Petit PX, Kroemer G. Mitochondrial implication in accidental and programmed

- cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembrane* 1997; 29: 185-93.
22. Wallace KB, Eells JT, Madeira VMC, Cortopassi G, Jones DP. Mitochondria-mediated cell injury. *Fund Appl Toxicol* 1997; 38: 23-37.
 23. Mignotte B, Vayssiere J-L. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 1998; 252: 1-15.
 24. Juin P, Tremblais K, LeCabellec MT, Grégoire M, Meflah K, Vallete FM. Potentiation of apoptosis by mitochondria in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 185-91.
 25. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondrial and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999; 264: 687-701.
 26. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; 44: 44-51.
 27. Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, et al. Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radical Biol Med* 1999; 26: 396-409.
 28. Kroemer G: Mitochondrial control of apoptosis: an overview. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 1-15.
 29. Dubinsky JM, Brustovetsky N, Pinelis V, Kristal BS, Herman C, Li X: The mitochondrial permeability transition: the brain's point of view. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 75-84.
 30. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; 182: 367-77.
 31. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 384: 53-7.
 32. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Melnicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Rep* 1997; 17: 43-52.
 33. Satoh T, Enokido Y, Aoshima H, Uchiyama Y, Hatanaka H. Changes in mitochondrial membrane potential during oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1997; 50: 413-20.
 34. Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome *c* release. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6353-64.
 35. Qian T, Herman B, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition mediates both necrotic and apoptotic death of hepatocytes exposed to Br-A23187. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 154: 117-25.
 36. Wolvetang EJ, Johnson KL, Krauer K, Ralph SJ, Linnane AW. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett* 1994; 339: 40-4.
 37. Higuchi M, Proske RJ, Yeh ETH. Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome *c* release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 1998; 17: 2515-24.
 38. Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, Franceschi C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996; 378: 107-10.
 39. Kantrow SP, Pinatodosi CA. Release of cytochrome *c* from liver mitochondria during permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 669-71.
 40. Cai J, Yang J, Jones DP. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome *c*. *Biomed Biochim Acta* 1998; 1366: 139-49.
 41. Zhivotovskiy B, Hanson KP, Orrenius S. Back to the future: the role of cytochrome *c* in cell death. *Cell Death Differentiation* 1998; 5: 459-60.
 42. Martinou I, Desagher S, Eskes R, et al. The release of cytochrome *c* from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol* 1999; 144: 883-9.
 43. Xia Z, Lundgren B, Bergstrand A, DePierre JW, Nässberger L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-XL. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 1199-1208.
 44. Kagedal K, Bironaite D, Öllinger K. Anthraquinone cytotoxicity and apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Free Rad Res* 1999; 31: 419-28.
 45. Boveris A, Cadenas E, Stoppani AOM. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1973; 156: 617-30.
 46. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome *c* from beef heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180: 248-57.
 47. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
 48. Giulivi C, Boveris A, Cadenas E. Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316: 909-16.
 49. Tada-Oikawa S, Oikawa S, Kawanishi M, Yamada M, Kawanishi S. Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis. *FEBS Lett* 1999; 442: 65-9.
 50. Shoji Y, Uedono Y, Ishikura H, Takeyama N, Tanaka T. DNA damage induced by tumour necrosis factor- α in L929 cells is mediated by mitochondrial oxygen radical formation. *Immunol* 1995; 84: 543-8.
 51. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increase superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 85-92.
 52. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273: 11038-43.
 53. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res* 1991; 250: 3-16.
 54. Slater AFG, Nobel CS, Orrenius S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biomed Biochim Acta* 1995; 1271: 59-62.
 55. Powis G, Briehl M, Oblong J. Redox signalling and the control of cell growth and death. *Pharmac Ther* 1995; 68: 149-73.
 56. Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J Clin Invest* 1998; 102: 1961-8.
 57. Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 231-45.
 58. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 1997; 414: 552-6.
 59. Higuchi M, Honda T, Proske RJ, Yeh ETH. Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene* 1998; 17: 2753-60.
 60. Clément M-V, Ponton A, Pervaiz S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased

- superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett* 1998; 440: 13-8.
61. Briehl MM, Cotgreave IA, Powis G. Downregulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis. *Cell Death Differentiation* 1995; 2: 41-6.
 62. McKenna WG, Bermnhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Maity A, Muschel RJ. Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblasts: influence of H-ras on the G2 delay. *Oncogene* 1996; 12: 237-45.
 63. Bracey TS, Miller JC, Preece A, Paraskeva C. τ -radiation-induced apoptosis in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines can occur in the absence of wild type p53. *Oncogene* 1995; 10: 2391-6.
 64. Um H-D, Orenstein JM, Wahl SM. Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway. *J Immunol* 1996; 156: 3469-77.
 65. Clément MV, Stamenkovic I. Superoxide anion is a natural inhibitor of Fas-mediated cell death. *EMBO* 1996; 15: 216-25.
 66. Ghafourifar P, Klein SD, Schucht O, et al. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. *J Biol Chem* 1999; 274: 6080-4.
 67. Richter C, Ghafourifar P: Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 27-31.
 68. Reiners JJ, Clift RE. Aryl hydrocarbon receptor regulation of ceramide-induced apoptosis in murine hepatoma 1c1c7 cells. A function independent of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *J Biol Chem* 1999; 274: 2502-10.
 69. Martinou J-C. Key to the mitochondrial gate. *Nature* 1999; 399: 411.
 70. Richter C. Pro-oxidants and mitochondrial Ca^{2+} : their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Lett* 1993; 325: 104.
 71. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biol Med* 1999; 26: 463-71.
 72. Juin P, Pelletier M, Oliver L, et al. Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 1998; 273: 17559-64.
 73. Esteve JM, Mompou J, Garcia de la Asuncion J, et al. Oxidative damage to mitochondrial ADN and glutathione oxidation in apoptosis: studies *in vivo* and *in vitro*. *FASEB J* 1999; 13: 1055-64.
 74. Augusto O, Radi R, Gatti RM, Vasquez-Vivar J. Detection of secondary radicals from peroxynitrite-mediated oxidations by electron spin. *Methods Enzymol* 1996; 269: 848-54.
 75. Castro LA, Robalinho RL, Cayota A, Meneghini R, Radi R. Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1998; 359: 215-24.
 76. Brown GC, Borutaite V: Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 17-25.
 77. Laskin JD, Mariano TM: Nitric oxide as a cellular mediator of apoptosis. In: *Cellular and Molecular Biology of Nitric Oxide*, (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1999; pp. 269-91.
 78. Rössig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, et al. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation *in vivo*. *J Biol Chem* 1999; 274: 6823-26.
 79. Murphy MP. Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 401-14.
 80. Yamamoto Y, Takahashi SY. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. *Comp Biochem Physiol* 1993; 106: 35-45.
 81. Draoui M, Cohen P. Proteases in apoptosis. *Cell Death Differentiation* 1996; 3: 253-4.
 82. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16.
 83. Zhivotovsky B, Burgess DH, Vanags DM, Orrenius S. Breakthroughs and views. Involvement of cellular proteolytic machinery in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 481-8.
 84. Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem & Biol* 1998; 5: 97-103.
 85. Samali A, Nordgren H, Zhivotovsky B, Peterson E, Orrenius S. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 6-11.
 86. Fadeel B, Anlin A, Henter J-I, Orrenius S, Hampton MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood* 1998; 92: 4808-18.
 87. Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S. Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 328-35.
 88. Fearnhead HO, Rodriguez J, Govek E-E, Guo W, Kobayashi R, Hannon G, et al. Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13664-9.
 89. Deaciuc IV, Fortunato F, D'Souza NB, Hill DB, Schmidt J, Lee EY, et al. Modulation of caspase-3 activity and Fas ligand mRNA expression in rat liver cells *in vivo* by alcohol and lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 349-56.
 90. Sun X-M, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 5053-60.
 91. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999; 189: 381-93.
 92. Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, et al. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13618-23.
 93. Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-6.
 94. Adachi S, Cross AR, Babior BM, Gottlieb RA. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome c during Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272: 21878-82.
 95. Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biomed Biochim Acta* 1998; 1366: 127-37.
 96. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-x(L) regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91: 627-37.
 97. Kahn A. Bcl-2 inhibe-t-il l'apoptose en s'opposant à l'action des radicaux oxygènes? *Med/Scie* 1994; 10: 208-9.
 98. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in *in vivo* precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144: 903-14.
 99. Pardo FS, Su M, Borek C, Preffer F, Dombkowski D, Gerweck L, et al. Transfection of rat embryo cells with mutant p53 increases the intrinsic radiation resistance. *Radiat Res* 1994; 140: 180-5.

100. Milner J. ADN damage, p53 and anticancer therapies. *Nature Med* 1995; 1: 879-80.
101. Moll UM, Ostermeyer AG, Haladay R, Winkfield B, Frazier M, Zambetti G. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G₁ checkpoint after ADN damage. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1126-37.
102. Sugrue MM, Wang Y, Rideout HJ, Chalmers-Redman RME, Tatton WG. Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 123-30.
103. Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, et al. Mechanisms of hypo-xia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 8039-45.
104. Johnson MI, Robinson MC, Marsh C, Robson CN, Neal DE, Hamdy FC. Expression of Bcl-2, Bax, and p53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: relationship with apoptosis and proliferation. *Prostate* 1998; 37: 223-9.
105. Uren AG, Vaux DL. Molecular and Clinical Aspects of Apoptosis. *Pharmac Ther* 1996; 72: 37-50.
106. Tatton WC, Olanow CW. Apoptosis in neurodegenerative disease: the role of mitochondria. *Biomed Biochim Acta* 1999; 1410: 195-213.
107. Ben-Yoseph O, Boxer PA, Ross BA. Oxidative stress in the central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway. *Develop Neurosci* 1994; 16: 328-36.
108. Colton CA, Pagan F, Snell J, Colton JS, Cummins A, Gilbert DL. Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons. *Exp Neurol* 1995; 132: 54-61.
109. Sendtner M, Thoenen H. Oxidative stress and motoneuron disease. *Curr Biol* 1994; 4: 1036-9.
110. Beal MF. Mitochondria, NO and neurodegeneration. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 43-54.
111. Murphy AN, Fiskum G. Bcl.2 and Ca²⁺-mediated mitochondrial dysfunction in neural cell death. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 33-41.
112. Ihara Y, Mori A, Hayabara T, Kawai M, Namba R, Nobukuni K, et al. Superoxide dismutase and free radicals in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: relationship to clinical data. *J Neurol Sci* 1995; 134: 51-6.
113. Plaitakis A, Shashidharan P. Amyotrophic lateral sclerosis, glutamate, and oxidative stress. In: *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, (Eds.), Raven Press, New York, 1995; pp. 1531-43.
114. Tabrizi SJ, Schapira AHV. Secondary abnormalities of mitochondrial DNA associated with neurodegeneration. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 99-110.
115. DiMauro S, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies. *Advan Neurol* 1993; 50: 1197-208.
116. Bongarzone ER, Pasquini JM, Soto EF. Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by *in vitro* generated reactive oxygen species. *J Neurosci Res* 1995; 41: 213-21.
117. Good PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1996; 149: 21-8.
118. Kopin IJ. Parkinson's disease: past, present, and future. *Neuropsychopharmacology* 1993; 9: 1-12.
119. Schapira AHV. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Neuropath Applied Neurobiol* 1995; 21: 3-9.
120. Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng T-I, Stephens SE. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. In: *Mitochondria and Cell Death*, (Eds.), Portland Press, London, 1999; pp. 85-97.
121. Bruce AJ, Malfroy B, Baudry M. b-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures. Protection by EUK-S, a synthetic catalytic free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 2312-6.
122. Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 1995; 16: 661-74.
123. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, et al. Brain Regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 1995; 65: 2146-56.
124. Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 697-98.
125. Greenspan HC, Aruoma PL. Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity. *Immunol Today* 1994; 15: 209-13.
126. Lopes MF, DosReis GA. Apoptosis is a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 913-8.
127. Schulte-Hermann R., Grasl-Kraupp B, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105: 363-7.
128. Desoize B. Anticancer drug resistance and inhibition of apoptosis. *Anticancer Res* 1994; 14: 2291-4.
129. Schulte-Herman R, Bursch W, Grasl-Kraupp B, Müllanuer L, Ruttkay-Nedecky B. Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver. *Mutat Res* 1995; 333: 81-7.
130. Sun S-Y, Yue P, Lotan R. Induction of apoptosis by the N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and its association with reactive oxygen species, nuclear retinoic acid receptors, and apoptosis-related genes in human prostate carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 403-10.
131. Lee JM, Bernstein A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor genes. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 149-461.
132. Mackey TJ, Borkowski J, Amin P, Jacobs SC, Kyprianou N. Bcl-2/Bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology* 1998; 52: 1085-90.
133. Skulachev VP. Hypothesis: why are mitochondria in apoptosis. Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cells. *FEBS Lett* 1996; 397: 7-10.
134. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis; doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 151-65.
135. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP dependent formation of Apaf 1/caspase 9 complex initiates a apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-89.