

FORMACION CONTINUADA

Apoptosis en enfermedades renales

B. Rodríguez Iturbe y L. Fernández

Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de Maracaibo y Centro de Cirugía Experimental. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

INTRODUCCION

La existencia de dos mecanismos de muerte celular es conocida desde hace mucho tiempo. Virchow, en su clase XV dictada en 1858¹, usó el término *necrobiosis* para describir un proceso de muerte celular inducida por «un proceso vital alterado», espontáneo y natural, en contraste con la muerte celular violenta por necrosis. Sin embargo, el trabajo de Kerr, Willie y Currie en 1972², se cita justificadamente como el punto de partida de los estudios de apoptosis porque es la primera descripción morfológica sistemática de los cambios observados en células que mueren «fisiológicamente» y se propone la designación de apoptosis (*apo*: desde, *ptosis*: caer o descender) para este proceso de muerte que semeja el «desprenderse de las hojas de los árboles» en otoño. Según sus proponentes, la pronunciación correcta de apoptosis debe omitir la segunda «p» (apo'tosis), pero existen opiniones contrarias^{3,4}.

La apoptosis es un mecanismo existente para la eliminación de células indeseables, o percibidas como tales, sin producir reacción inflamatoria. La apoptosis representa una forma de «suicidio» celular porque resulta de la activación de un sistema intracelular de autodestrucción inducido por una variedad de estímulos y mensajes externos o por la escasez de factores que soportan la vida celular. El aumento explosivo de la investigación en apoptosis en los últimos 5 años es indicación de su importancia en campos biológicos tan diversos como el desarrollo embriológico de organismos multicelulares, en neurociencia, en tolerancia inmunológica y en cáncer.

En el riñón embrionario se ha demostrado que aproximadamente el 3% de los núcleos tienen cambios apoptóticos en la primera semana. En las en-

fermedades renales, la importancia de la apoptosis se está haciendo cada vez más evidente. Esta modalidad de muerte celular se presenta, no solamente en las células residentes del riñón, sino también en los leucocitos infiltrantes; por ende, la apoptosis puede modular la inflamación y la reparación en el tejido renal.

Diferencias entre apoptosis y necrosis

En esta revisión, nos referiremos a la apoptosis como una modalidad de muerte celular que contrasta con la muerte por necrosis, aun cuando elegantes discusiones recientes³ han enfatizado que la necrosis es, *strictu sensu*, la manifestación morfológica final de la muerte celular por cualquier mecanismo en que ésta se lleve a cabo. Existen diferentes morfológicas y funcionales entre la eliminación programada de células indeseables por apoptosis y la muerte accidental por necrosis ocurrida por el efecto tóxico severo ejercido por una variedad de agentes físicos y químicos.

La apoptosis es una forma activa de muerte que involucra la utilización de energía, actividad metabólica y en algunas circunstancias, síntesis proteica. La necrosis es una forma pasiva de muerte donde la célula pierde actividad metabólica.

La necrosis afecta a áreas de tejido y sus características morfológicas incluyen el edema celular y vesiculación previos a la desintegración celular. Estas características se derivan del daño tóxico a la membrana celular que se hace permeable a iones y agua. La estructura mitocondrial se destruye, la síntesis proteica disminuye y aparece floculación de la cromatina nuclear, la cual, sin embargo, tiene una apariencia relativamente normal. En contraste, la apoptosis afecta a células indivi-

Correspondencia: Dr. D. Bernardo Rodríguez Iturbe.
Apartado Postal 1430.
Maracaibo 4001-A, Estado Zulia.
Venezuela

NOTA: Partes de esta revisión fueron presentadas en la conferencia «Apoptosis y proliferación en glomerulopatías» en el III Congreso Iberoamericano de Nefrología. Lisboa, Portugal, 23 al 26 de marzo, 1997.

duales dentro de un área tisular y tiene una morfología específica. La célula se hace redonda y más pequeña por la condensación citoplasmática y la pérdida de las microvellosidades de la superficie. El retículo endoplasmático se dilata pero las mitocondrias y otras organelas permanecen intactas. La cromatina se condensa en agregados con forma de media luna adosados a la periferia del núcleo. Es frecuente encontrar fragmentación del núcleo y citoplasma con la formación de cuerpos apoptóticos unidos a la membrana que pueden ser expulsados y fagocitados, mientras que la membrana permanece intacta.

Una vez comenzada, la apoptosis progresa rápidamente. Estudios funcionales indican que los cambios morfológicos ocurren en minutos y la fagocitosis y degradación es tan rápida que las células apoptóticas son histológicamente detectables por menos de 2 horas en la mayoría de los tejidos. Estudios de Baker y cols.⁵ indican que en la nefritis inducida por anticuerpos anti-Thy-1 el tiempo de remoción celular es de 1,4 horas y que > 4% de las células glomerulares son eliminadas diariamente en los días de mayor respuesta proliferativa. En glomerulonefritis postestreptocócica, datos preliminares indican que la eliminación celular puede ser mucho más rápida⁶.

En la necrosis, el daño de la membrana celular permite la salida de componentes celulares proinflamatorios con propiedades quimiotácticas que promueven infiltración leucocitaria la cual, a su vez, amplifica los fenómenos inflamatorios cuya intensidad dependen en parte de la extensión del área tisular afectada. La ausencia de reacción inflamatoria es una característica crucial en la apoptosis porque la fagocitosis de células apoptóticas se lleva a cabo mientras aún existe integridad de la membrana celular. La eficiencia de la fagocitosis es crucial en el proceso y se lleva a cabo no solamente por macrófagos sino por células de la vecindad, las cuales incluyen, en caso del riñón, a las células mesangiales y las células tubulares⁷.

La fragmentación del ADN es una de las características que diferencia la necrosis de la apoptosis. En la apoptosis se conoce desde los estudios de Willie en 1980⁸ que los cambios morfológicos descritos antes se asocian con la ruptura o disociación internucleosomal de la cromatina. En consecuencia, el ADN se fragmenta en múltiples de 180 a 200 pares de bases. Este hecho condiciona que la electroforesis del ADN de células apoptóticas revele un patrón en «escalera». En el caso de la necrosis, el patrón de electroforético del ADN es continuo, inducido por destrucción de las histonas por proteasas y la exposición de

toda la longitud del ADN a la acción de endonucleasas.

Regulación de la apoptosis

La apoptosis es regulada por factores externos y factores genéticos que pueden suprimir o estimular la apoptosis (tabla I).

Los *estímulos externos* que regulan la apoptosis incluyen factores inductores de muerte celular y factores de crecimiento que favorecen la supervivencia y actúan como antagonistas de la apoptosis. En general, todos los factores que producen necrosis pueden inducir apoptosis si las células sobreviven. Radiaciones ionizantes, drogas anticancerosas e inmunosupresoras pueden inducir apoptosis. Nuestro grupo ha estudiado el efecto de la ciclosporina A como inductor de apoptosis en neutrófilos⁹. Concentraciones de C y A en el rango «terapéutico» (> 125 ng/ml) inducen en la rata incremento en el número de neutrófilos apoptóticos, pero no tienen efecto sobre las células mononucleares. Ciclofosfamida, 500 rads de irradiación, dexametasona, mefalan, ciclosporina A y especies reactivas de oxígeno inducen apoptosis *in vitro* en células mesangiales^{10,11}. La apoptosis inducida por lipoproteínas de baja densidad oxidadas, probablemente es mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno¹².

Tabla I. Algunos factores moduladores de la apoptosis.

Factores externos	
A)	<i>Estimulantes de las apoptosis</i>
	Radiaciones ionizantes, radicales reactivos de oxígeno (ROS), lipoproteínas de baja densidad oxidadas.
	Drogas citotóxicas (agentes alquilantes, antimetabolitos, antagonistas hormonales, glucocorticoides, ciclosporina A).
	Citocinas (TNF, TGF- β , IL-1 β).
	Receptores transmembrana (receptor Fas/APO, rTNF, rNGF, rIFN- γ).
B)	<i>Supresores de la apoptosis</i>
	Factores tróficos de crecimiento (IL-3, IL-4, IL-6, CSF, EGF).
Factores genéticos	
A)	<i>Genes estimulantes de apoptosis:</i>
	ced-3, ced-4 (<i>C. elegans</i>), p53, lpr, Bax (mamíferos), Bcl-x _s , c-myc.
B)	<i>Genes supresores de apoptosis:</i>
	ced-9 (<i>C. elegans</i>), Bcl-2 (mamíferos), Bcl-x _L .

Proteínas transmembrana del tipo de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y del Fas, en unión con sus ligandos respectivos, pueden inducir apoptosis. El receptor FAS/APO-1, también llamado CD95, es una glicoproteína de la superficie celular de la familia de los receptores para TNF- α , descrita inicialmente como una molécula mediadora en la muerte por apoptosis de linfocitos T activados crónicamente¹³ y de linfocitos B autorreactivos. La apoptosis inducida por Fas depende del entrecruzamiento de las moléculas de Fas en la superficie celular¹⁴. En ratones, los modelos genéticos *lpr* y *gld*, asociados con expresión reducida del Fas o ligando del Fas (FasL), respectivamente, desarrollan enfermedad autoinmune. La interacción FasL-Fas es también de extraordinario interés en el trasplante de órganos porque son precisamente los órganos «privilegiados» con tolerancia, como el ojo y los testículos, los únicos que expresan en condiciones normales el FasL. En estos órganos, la interacción FasL-Fas induce apoptosis de los leucocitos infiltrantes permitiendo la supervivencia del injerto^{15,16}.

Por otra parte, una variedad de factores de crecimiento como PDGF, insulín-like GF, CSF, IL-3, IL-4 e IL-6 son capaces de retardar o prevenir el desarrollo de apoptosis (tabla I). Este hecho ha sugerido la posibilidad de que las células estén programadas para su propia muerte y la supervivencia depende de señales originadas en otras células, supresoras de ese programa¹⁷⁻¹⁹.

La *regulación genética* de la apoptosis (revisada en 20, 21) se ha estudiado principalmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el cual, de 1.090 células somáticas formadas, 131 mueren con las características morfológicas de apoptosis. Dos genes, *ced-3* y *ced-4*, son necesarios para la muerte de estas células y son antagonizados por el gen *ced-9*. En los mamíferos el gen *bcl-2*, originalmente identificado en la mayoría de los linfomas no-Hodgkin, suprime la apoptosis inducida por azuro de sodio, colchicina, inhibidores de síntesis proteica, calor, radiación y depleción de factores de crecimiento. La demostración de que el gen *bcl-2* humano previene la muerte de células mediada por los genes *ced-3* y *ced-4* en el *C. elegans*, sugiere que el *bcl-2* es un gen homólogo del *ced-9* anteriormente citado. Estudios recientes indican que existe una proteína homóloga del gen *bcl-2*, denominada *bax* que se heterodimeriza y ejerce funciones de control.

En el ratón, el gen *lpr* impone la producción de la proteína transmembrana APO1/Fas, cuya importancia ha sido discutida anteriormente.

Otros genes humanos como el gen de supresión tumoral p53, y el gen *c-myc*, cuya función es crucial para la división celular después de la estimulación por factores de crecimiento, pueden favorecer el desarrollo de apoptosis.

Metabolismo de la apoptosis

Existen revisiones recientes del metabolismo de la apoptosis²²⁻²⁴. Puede considerarse en la apoptosis una fase de inducción, una fase efectora y una fase de degradación que concluyen con fagocitosis de la célula apoptótica sin reacción inflamatoria²³. Los eventos iniciales de la apoptosis están relacionados con las características del estímulo y su interacción con la membrana celular; son mecanismos, por así decirlo, privados. Los receptores de TNF y Fas comparten lo que es conocido como secuencia de muerte celular en la cual reaccionan con tres proteínas citoplasmáticas (FADD, RIP, TRADD).

Una vez que la apoptosis entra en su vía efectora los eventos son comunes, existe una caída del potencial transmembrana en la mitocondria que precede los cambios metabólicos y, en la apoptosis dependiente de TNF y Fas-L, existe una generación de ceramida, inducida por la actividad de esfingomielinasa en la membrana plasmática. La ceramida puede actuar como segundo mensajero de la apoptosis. Hay un aumento del calcio intracelular, lo cual presumiblemente puede activar enzimas dependientes de Ca⁺⁺, como las endonucleasas que fraccionan el ADN y las transglutaminasas que entrelazan las proteínas citosólicas. Igualmente, proteasas calcio-dependientes, como la calpaína, pueden degradar el citoesqueleto celular. Las proteasas pueden también liberar las ADNasa I y ADNasa II de su unión con la actina y permitir así su acción como endonucleasas. En la expresión completa de la apoptosis se encuentra depleción del glutatión no-oxidado, producción de radicales reactivos de oxígeno, fragmentación del ADN y exposición aberrante de residuos de fosfatidil serina en la superficie celular. De hecho, estos residuos son la base de la detección temprana de la apoptosis, valiéndose de la afinidad de la anexina por los radicales de fosfatidil-serina; la condensación de la cromatina es un fenómeno más tardío.

Fagocitosis de las células apoptóticas

La fagocitosis de células apoptóticas ha sido objeto de revisiones recientes²⁵. El proceso es extraordinariamente eficiente. En aproximadamente una hora

las células apoptóticas dejan de ser detectables en el tejido.

La forma como los macrófagos reconoce las células intactas que deben ser eliminadas es objeto de intensa investigación. Hasta el presente se han postulado tres mecanismos de identificación de células apoptóticas:

1. La pérdida de carbohidratos como el ácido siálico puede exponer radicales N-acetilgalactosamina, galactosa y N-acetilglucosamina susceptibles de ser reconocidos por lectinas de las células fagocíticas. Este mecanismo ha sido sugerido por trabajos que demuestran inhibición de la fagocitosis de linfocitos apoptóticos cuando los macrófagos son preincubados con carbohidratos que tienen afinidad específica para lectinas²⁵. Sin embargo, no existen diferencias entre linfocitos apoptóticos y no-apoptóticos en cuanto a la fijación cuantitativa de lectinas marcadas, ni tampoco en el contenido de glicoproteínas siálicas²⁵.

2. Participación del receptor vitronectin. El receptor $\alpha_v\beta_3$ «vitronectin» (VnR) de la familia de las integrinas tiene un papel importante en la adhesión de las células a la matriz celular. Este receptor se fijaría en ligandos presentes en la superficie de las células apoptóticas; entre estos ligandos, el que parece particularmente importante es la trombospondina secretada por el macrófago²⁵. En efecto, la trombospondina tiene afinidad con los receptores $\alpha_v\beta_3$ y CD36 y serviría de puente molecular entre la superficie de la célula apoptótica y la célula encargada de fagocitarla. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra ambas subunidades del receptor vitronectin y contra la trombospondina inhiben la fagocitosis de células apoptóticas.

3. Receptores para la fosfatidilserina. La parte exterior de la membrana celular contiene predominantemente fosfolípidos neutros mientras que los fosfolípidos aniónicos, como la fosfatidilserina, están restringidos a la parte interna. Las alteraciones morfológicas en la apoptosis se asocian con cambios posicionales que exteriorizan la fosfatidilserina y existe evidencia indirecta de que los macrófagos poseen receptores capaces de reconocer la fosfatidilserina.

TECNICAS UTILIZADAS PARA DETECTAR APOPTOSIS

La detección de apoptosis incluye la observación de alteraciones morfológicas típicas, la demostración de un patrón en «escalera» en el análisis electroforético del ADN extraído, y tinciones que permiten identificar la fragmentación del ADN o la extrusión

Tabla II. Técnicas principales usadas para la detección de apoptosis.

Técnica	Descripción
Microscopia óptica y electrónica ^{2,26}	Cambios morfológicos (condensación cromatínica, encogimiento citoplasmático).
Electroforesis de ADN ⁸	Patrón en escalera de ADN degradado en uno o múltiples nucleosomas.
TUNEL ⁵¹	Adición enzimática (TdT) de nucleótidos marcados en fragmentos de ADN de una doble hebra.
ISNT ⁵²	Adición enzimática (ADN polimerasa I) de nucleótidos marcados en fragmentos de ADN de una sola hebra.
Tinción con: yoduro de propidio ⁵³	Entra en células con aumento de la permeabilidad de la membrana (células necróticas y fases tardías de la apoptosis).
Hoescht 33342 ⁵⁴	Entra en todas las células y tiñe el núcleo permitiendo observar una condensación cromatínica.
Anexina V-FITC ⁵⁵	Detecta fosfatidil serina en la superficie celular para la cual tiene gran afinidad la anexina.

de la fosfatidilserina a la superficie externa de la célula. La **tabla II** resume esta metodologías.

Las características morfológicas de la apoptosis fueron descritas anteriormente: la condensación cromatínica y el encogimiento citoplasmático son aspectos fundamentales. Estos hallazgos son detectables por microscopia de luz y electrónica pero son relativamente tardíos^{2,26}.

La electroforesis del ADN en gel de agarosa permite detectar el patrón en «escalera» que resulta de la degradación del ADN genómico por endonucleasas en fragmentos de uno o múltiples nucleosomas (180 a 220 pares de bases)⁸.

La fragmentación del ADN a nivel unicelular puede determinarse con técnicas que permiten el marcaje enzimático del terminal fragmentado del ADN. Estas técnicas son la translación *in situ* (ISNT) que emplea la polimerasa I de ADN y actúa sobre ADN de una sola hebra, y la conocida como TUNEL que emplea la deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) para permitir el marcaje de rupturas en ADN de doble hebra (terminales 3'-OH DNA libres). En ambas técnicas el marcaje se realiza con trifosfato de uracilo (dUTP), que a su vez se hace evidente con estreptavidina-fluoresceína.

Existen métodos no enzimáticos de tinción celular para la detección de apoptosis. Estos son la tinción con yoduro de propidio, que permite evaluar si la

membrana está intacta o si es permeable al colorante (en etapas tardías de apoptosis), y la tinción con anexina V marcada con fluoresceína. Este último método utiliza la avidéz de la anexina por los radicales de fosfatidilserina, que se encuentran normalmente en la parte interna de la membrana plasmática y se exteriorizan tempranamente en la célula en apoptosis.

APOPTOSIS EN LA ENFERMEDAD RENAL

Receptores de apoptosis y genes reguladores de apoptosis se expresan normalmente en el riñón. En el riñón de ratón se ha demostrado mRNA para el ligando de Fas²⁷ pero aún no está definido qué tipo de células están involucradas. El Fas se ha demostrado en células mesangiales *in vitro*²⁸ y el gen bcl-2 se expresa en el riñón adulto normal, en niveles moderados en la cápsula de Bowman y túbulo contorneado distal y en menor grado en otras áreas del nefrón²⁹.

Apoptosis en enfermedad renal experimental

La apoptosis se ha estudiado en enfermedades congénitas del riñón, en varios tipos de glomerulonefritis y en el daño tubular por obstrucción urinaria y por isquemia (tabla III).

Tabla III. Enfermedades renales y apoptosis.

Enfermedad	Referencias
<i>Experimentales</i>	
Riñón poliquístico en ratones myc, pcy	30, 31, 32
Uropatía obstructiva	33, 34, 35, 36
Necrosis tubular aguda isquémica	37, 38
Daño tubular por tóxicos y drogas	39, 40, 41
Nefrectomía subtotal	42
Nefritis anti-membrana basal	43
Nefritis mesangioproliferativa (anti-Thy-1)	5, 44
Nefrosis por aminonucleósido de puromicina	45
<i>Clínicas</i>	
Enfermedad poliquística renal hereditaria	30
Nefritis lúpica	42, 46, 48
Nefropatía por HIV	49
Nefropatía por IgA	42, 46, 47
Púrpura de Henoch-Schoenlein	46
Glomerulonefritis postestreptocócica	48
Otras glomerulopatías*	46, 48, 50

*Incluyen GN mesangioproliferativa idiopática, GN membranoproliferativa, GN membranosa, esclerosis focal segmentaria, nefropatía de cambios mínimos, rechazo del injerto renal.

Riñón poliquístico. La participación de la apoptosis en la formación quística y pérdida de tejido renal en la enfermedad poliquística ha sido convincentemente demostrada. Los modelos genéticos cpk y pcy de ratones con riñón poliquístico tienen en etapas pre-urémicas apoptosis en células tubulares y fragmentación en escalera del ADN³⁰. Además tiene una expresión prolongada del ARNm de la clusterina (TRPM-2, SGP-2) en el epitelio de la pared quística; la presencia de clusterina está asociada con el proceso de apoptosis, probablemente como indicador de supervivencia del mismo³¹. Más recientemente, Veis y cols.³² han demostrado que el ratón con delección homocigótica del gen bcl-2 presenta riñones poliquísticos y muere tempranamente.

Uropatía obstructiva. La participación de la apoptosis en la pérdida de masa renal producida por la uropatía obstructiva fue sugerida inicialmente en estudios realizados por Gobe y Axelsen³³, quienes observaron que la obstrucción ureteral completa inducía apoptosis en las células tubulares y fagocitosis de cuerpos apoptóticos por células vecinas. Estudios posteriores de Kennedy y cols.³⁴ en ratas con obstrucción ureteral parcial demostraron que la fragmentación apoptótica del ADN y el número de células apoptóticas aumentaban en las 3 semanas siguientes a la obstrucción. Más recientemente, Troung y asociados³⁵ estudiaron la obstrucción ureteral crónica y demostraron que la apoptosis y la proliferación de células tubulares aumenta en los primeros 25 días y luego se reduce rápidamente; en contraste, en el compartimento intersticial, la proliferación, la apoptosis y el daño cicatrizal aumentan progresivamente³⁵. El mecanismo mediante el cual se activa la apoptosis en la uropatía obstructiva no está completamente definido, pero es probable que el proceso se presente en respuesta a una reducción de los factores de supervivencia; esta interpretación está favorecida por la demostración de niveles bajos de ARNm de EGF en células tubulares y la disminución de la apoptosis que puede inducirse en este modelo por la administración de EGF³⁶.

Necrosis tubular aguda isquémica. La participación de la apoptosis en la regulación de la hiper celularidad tubular que sigue al daño isquémico ha sido estudiada por Shimizu y Yamanaka³⁷ en experimentos de isquemia por oclusión unilateral de la arterial renal por 60 minutos. En este modelo, el daño de isquemia-reperfusión induce una necrosis generalizada que es seguida por una fase de regeneración del epitelio tubular. Las lesiones de isquemia/reperfusión se asocian con incrementos en la expresión del ARNm para la clusterina, los cua-

les están directamente relacionados con la duración de la isquemia³⁸. El porcentaje de células apoptóticas se incrementó en dos fases: primero, un aumento ligero en el día 3º y más tarde comenzó un aumento de células apoptóticas que llegó a un máximo el día 8º, para descender lentamente a niveles normales en 6 meses³⁷. La segunda fase de incremento en la apoptosis sigue a la hiperplasia de células epiteliales que aparece cubriendo los túbulos y probablemente representa un mecanismo para controlar el aumento del número de dichas células.

Daño tubular por tóxicos y drogas. Se ha demostrado la participación de la apoptosis en la resolución de la hiperplasia renal inducida por nitrato de plomo, en nefrotoxicidad por gentamicina y después de la administración de diuréticos. Ledda-Columbano y cols.³⁹ demostraron que una inyección única de nitrato de plomo induce un efecto mitogénico inmediato que comienza a resolverse a partir del 3er día y se completa en dos semanas. La eliminación del exceso de células fue realizado mediante apoptosis, la cual aumentó casi 30 veces por encima del valor control el tercer día después de la administración del mitógeno. El daño tóxico inducido por el aminoglicósido gentamicina se asocia con aumento de la apoptosis en la fase de regeneración; en el túbulo proximal la apoptosis aumenta cinco veces el día 10º. La proliferación observada en el túbulo distal ocurre en dos fases; en la primera de ellas la apoptosis se incrementa, mientras que no existe aumento de apoptosis en la fase tardía de la proliferación tubular distal⁴⁰. Loffing y cols.⁴¹ estudiaron el efecto de la administración de tiazidas por minibombas subcutáneas en ratas y demostraron que estas drogas producen desarreglo estructural del epitelio tubular distal que pierde sus características de epitelio de transporte y presentan evidencias de apoptosis.

Nefrectomía subtotal. La participación de la apoptosis en la eliminación de células observada en la glomeruloesclerosis progresiva fue explorada por Sugiyama y cols.⁴² en el modelo de nefrectomía 5/6. Estos investigadores identificaron células apoptóticas en el glomérulo, intersticio y túbulos del riñón remanente. El número de células apoptóticas en el glomérulo aumentó en la 8ª semana y en los túbulos en las semanas 4ª y 8ª, coincidiendo con la proteinuria, la insuficiencia renal y los cambios escleróticos. La apoptosis en estas circunstancias fue interpretada como un mecanismo dañino que facilitaba el desarrollo de la esclerosis.

Nefritis anti-membrana basal. Shimizu y cols.⁴³ estudiaron la participación de la apoptosis en la glomerulonefritis crescéntrica inducida por la inyección

de anticuerpos anti-membrana basal. En este modelo, el día 3º se presenta una reacción inflamatoria intensa con infiltración leucocitaria y en los días 7º al 18º aparece una severa lesión necrotizante con formación de crecimientos glomerulares. Finalmente, después de 2 a 3 meses la mayoría de los glomérulos se han colapsado y están escleróticos. Células apoptóticas aparecieron desde el día 7º y aumentaron en número hasta llegar a un tope en el segundo mes, sugiriendo que este tipo de muerte celular está involucrado en la transformación esclerótica de los glomérulos hiper celulares.

Nefritis mesangioproliferativa. El modelo de nefritis inducida por anticuerpos anti-Thy-1 se ha utilizado para estudiar el papel de la apoptosis en el proceso de reparación de la glomerulonefritis mesangioproliferativa y para demostrar la capacidad fagocítica ejercida por las células mesangiales, sobre sus vecinas en proceso de apoptosis. Baker y cols.⁵ demostraron que la apoptosis aumenta cerca de 10 veces en este modelo experimental y la secuencia temporal del incremento en el número de células, mitosis y células apoptóticas es similar. Estos estudios sugieren fuertemente que la apoptosis es el mecanismo de control más importante de la hiper celularidad en la proliferación mesangial experimental y de esta forma facilita el proceso de reparación en este modelo experimental. Similares hallazgos y conclusiones fueron obtenidas por Shimizu y cols.⁴⁴.

Nefrosis por aminonucleósido de puomicina (PAN). La participación de la apoptosis en la nefrosis inducida por una dosis única de PAN y su relación con la proliferación celular en glomérulos, túbulos e intersticio, ha sido estudiada en nuestros laboratorios⁴⁵. Se observó aumento de la apoptosis en el glomérulo en la primera semana y en los túbulos en la primera y segunda semanas. El incremento de células apoptóticas tuvo una secuencia temporal semejante al incremento en células PCNA positivas en el intersticio y en los túbulos. Todos los hallazgos retornan a valores normales en la 7ª semana. Los resultados sugieren que también en este modelo de enfermedad, la apoptosis es un mecanismo principal en el proceso reparativo del daño renal.

Apoptosis en la enfermedad renal en humanos

Riñón poli quístico. La contrapartida en el humano de los estudios de apoptosis en ratones con riñones poli quísticos ha sido investigada por Woo³⁰, quien ha demostrado que el ADN del tejido renal de los pacientes está fragmentado con

un patrón en escalera. Además, los quistes, los glomerulos y los túbulos quísticos y no-quísticos presentan células apoptóticas. En contraste, no se encontró apoptosis tubular en pacientes con nefropatía por IgA, nefrosclerosis, nefropatía diabética, necrosis tubular aguda y rechazo agudo o crónico de injerto renal.

Nefritis lúpica. Takemura y cols.⁴⁶ investigaron la presencia del receptor Fas y del gen Bcl-2 en 80 biopsias de varias glomerulonefritis. En seis casos de nefritis lúpica proliferativa difusa (tipo IV, clasificación OMS) encontraron aumentado el número de células que expresaban Fas y Bcl-2. Los autores sugieren que la sobre-expresión de Bcl-2 tiene un papel en la proliferación mesangial y en la hiper celularidad glomerular. Bcl-2 también han sido celulares⁴⁷. Sugiyama y cols.⁴², utilizando *in situ* marcaje con nucleótidos, demostraron células con fragmentación del ADN en casos de nefritis lúpica y encontraron correlación entre el número de células apoptóticas y el índice de esclerosis, pero no con el índice de proliferación. Esta falta de correlación entre apoptosis y proliferación fue observada en la nefritis proliferativa (tipo IV, OMS) en estudios realizados en nuestros laboratorios⁴⁸. En nuestros estudios no fue posible demostrar un incremento en apoptosis en la nefritis lúpica comparada con valores control obtenidos en riñones de donantes cadavéricos que no pudieron ser utilizados para trasplante. Es evidente que este material «control» no ofrece un valor normal de referencia en apoptosis pero, de cualquier forma, el hallazgo central de nuestra investigación fue que la apoptosis en la nefritis lúpica proliferativa tiene valores considerablemente más bajos que la apoptosis observada en otras glomerulonefritis proliferativas de curso autolimitado⁴⁸.

Nefropatía en la infección con HIV. La nefropatía con HIV se presenta como una esclerosis focal segmentaria que evoluciona hacia una glomerulopatía colapsante. La patogénesis de esta glomerulopatía no está establecida, pero los péptidos del HIV y los complejos péptido-anticuerpo son inmunomoduladores y pueden determinar apoptosis en células linfoides. En el glomérulo, el número de células apoptóticas en esta entidad no es diferente del encontrado en la esclerosis focal segmentaria idiopática; sin embargo, hay un incremento de la apoptosis en las áreas tubulointersticiales⁴⁹ y este hecho puede tener una importante patogenética.

Nefropatía por IgA. Sugiyama y cols.⁴² encontraron un incremento en el número de células apoptóticas en la nefropatía por IgA que se correlacionaba con el deterioro de la función renal y con el índice de la esclerosis. Además, existe un

aumento de la expresión del antígeno Fas y del gen Bcl-2 en células mesangiales y células del capilar glomerular. Técnicas de hibridización *in situ* permitieron demostrar un incremento en ARNm para Bcl-2 y que estas células son diferentes a las que expresan Fas. La demostración de Fas en glomerulos afectados sugiere la participación de la apoptosis; y la detección de Bcl-2 en los podocitos en regiones cercanas a las zonas escleróticas intraglomerulares hablan en favor de los trastornos de la regulación de la apoptosis en la progresión de la fibrosis glomerular⁴⁶.

Glomerulonefritis postestreptocócica. Estudios de nuestro grupo indican que existe un incremento marcado en la apoptosis en esta enfermedad⁴⁸. De hecho, los números más altos de apoptosis glomerular (MEDIA \pm EEM, $3,06 \pm 1,48$ por sección glomerular) y tubulointerstitial ($6,25 \pm 4,08/0,065$ mm²) fueron encontrados en esta glomerulonefritis. Se encontró una correlación directa y positiva entre el número de células apoptóticas y el número de células PCNA-positivas, sugiriendo que el mecanismo principal de control y reparación del daño inflamatorio es la apoptosis.

Otras glomerulopatías. En diferentes estudios se ha evaluado la apoptosis en las biopsias renales de pacientes con esclerosis focal segmentaria, glomerulonefritis mesangioproliferativa, glomerulonefritis membrano-proliferativa, glomerulonefritis membranosa, nefropatía de cambios mínimos y en el rechazo agudo del injerto renal^{46, 48, 50}. En general, la apoptosis está incrementada en las enfermedades con proliferación e infiltración leucocitaria. En el rechazo agudo se ha demostrado apoptosis en las células endoteliales, en el mesangio y en células del epitelio tubular. Pero no está definido si la apoptosis representa una forma específica de eliminación celular o si ocurre como reacción inespecífica a la isquemia⁵⁰.

Apoptosis en las glomerulopatías proliferativas

En razón a los estudios comentados anteriormente, es evidente que la apoptosis no tiene un papel uniforme en las enfermedades renales. Por una parte, es probable que la apoptosis sea un mecanismo benéfico de reparación del daño en las glomerulonefritis proliferativas, minimizando la reacción inflamatoria intrarrenal. Por otra parte, la apoptosis de las células glomerulares ha sido señalada como factor facilitador de la esclerosis glomerular.

En las nefropatías hiper celulares, nuestro grupo ha propuesto evaluar la intensidad de la apoptosis en

relación con la intensidad de la proliferación existente. En la **figura 1** se aprecia la proliferación y la apoptosis en varias nefropatías. Esta relación se mantiene en niveles normales en la nefritis de curso benigno. Son necesarios estudios de seguimiento para definir si la relación proliferación/apoptosis tiene implicaciones pronósticas en las glomerulonefritis proliferativas.

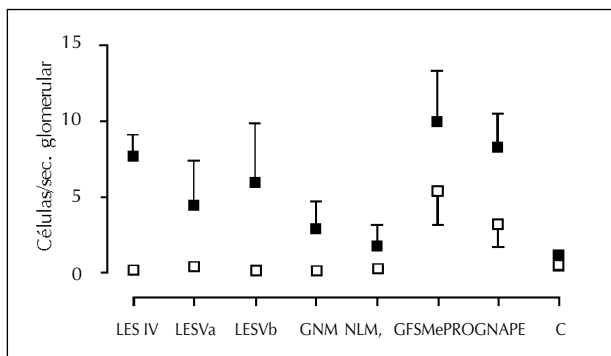


Fig. 1.—Proliferación y apoptosis en las glomerulonefritis clínicas. Proliferación (cuadrados negros, ■) estimada como el número de células positivas para PCNA (antígeno nuclear de proliferación) por sección glomerular. Apoptosis (cuadrados blancos, □) estimada como el número de células con fragmentación de ADN por sección glomerular, detectadas con adición enzimática de nucleótidos marcados (método TUNEL). Valores representan el promedio ± ES. LES = lupus eritematoso sistémico, NLM = nefropatía de lesión mínima, GFS = glomeruloesclerosis focal y segmentaria, GNAPE = glomerulonefritis aguda postestreptocócica, GNM = glomerulonefritis membranosa, MePRO = glomerulonefritis mesangioproliferativa, C = grupo control. Datos modificados de *Nephrol Dial Transplant* 12: 273-280, 1997 (referencia 48).

Reconocimiento

Trabajos de nuestros laboratorios referidos en esta revisión reciben apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), del Consejo de Desarrollo Científico (CONDES) de la Universidad del Zulia y de la Asociación de Amigos del Riñón (Maracaibo).

BIBLIOGRAFIA

1. Virchow: Lecture XVI. Translated by: Chance F. *Cellular Pathology: twenty lectures*. London: John Churchill, New Burlington Street, p. 318, 1860.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.

3. Majno G, Joris I: Apoptosis, necrosis and oncosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15, 1995.
4. Funder J: Apoptosis: two p or not two p? *Nature* 371: 98, 1994.
5. Baker AJ, Mooney A, Hughes J y cols.: Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 94: 2015-2116, 1994.
6. Szabolcs MJ, Ward L, Buttyan R, D'Agati V: Apoptosis in human renal biopsies (abstract). *J Am Soc Nephrol* 5: 844, 1994.
7. Savill J, Smith J, Sarraf C y cols.: Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Int* 42: 924-936, 1992.
8. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980.
9. Marín C, Araujo-Marín L, Mosquera J y cols.: La ciclosporina A (CyA) incrementa la apoptosis de neutrófilos circulantes en humanos y ratas (abstract). *Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão* 11: 77, 1997.
10. Ryong Cha D, Feld SM, Nast C y cols.: Apoptosis in mesangial cells induced by ionizing radiation and cytotoxic drugs. *Kidney Int* 50: 1565-1571, 1996.
11. Sugiyama H, Kashiwara N, Yamasaki Y y cols.: Reactive oxygen species induce apoptosis in cultured mesangial cells (abstract). *J Am Soc Nephrol* 5: 796, 1994.
12. Sharma P, Reddy K, Franki N y cols.: Native and oxidized low density lipoproteins modulate mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 50: 1604-1611, 1996.
13. Trauth BC, Klas C, Peters AMJ y cols.: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245: 301-304, 1989.
14. Dhein J, Daniel PT, Trauth BC y cols.: Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 149: 3166-3172, 1992.
15. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM y cols.: Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270: 1189-1192, 1995.
16. Bellgraw D, Gold D, Selaury H y cols.: A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377: 630-632, 1995.
17. Duke RC y Cohen JJ: IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 5: 289-294, 1986.
18. Colotta F, Re F, Polentarutti N y cols.: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80: 2012-2020, 1992.
19. Mekori YA, Oh CK, Metcalfe DD: IL-3-Dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. *J Immunol* 151: 3775-3784, 1993.
20. Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130, 1993.
21. Rose LM, Latchman DS, Iseberg DA: Bcl-2 and Fas, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity* 17: 271-278, 1994.
22. Carson DA, Ribeiro JM: Apoptosis and disease. *The Lancet* 341: 1251-1254, 1993.
23. Savill J: Apoptosis and renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypert* 4: 263-269, 1995.
24. Rudin CH, Thompson CB: Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Ann Rev Med* 48: 267-281, 1997.
25. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14: 131-136, 1993.

26. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH: Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136: 593-608, 1990.
27. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand. *Cell* 75: 1169-1178, 1993.
28. González-Cuadrado S, López-Armada MJ, Gómez-Guerrero C y cols.: Anti-Fas antibodies induce cytolysis and apoptosis in cultured human mesangial cells. *Kidney Int* 49: 1064-1070, 1996.
29. Chandler D, El-Naggar AK, Brisbay S y cols.: Apoptosis and expression of the bcl-2 protooncogene in the fetal and adult human kidney. *Hum Pathol* 8: 789-796, 1994.
30. Woo D: Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* 333: 18-25, 1995.
31. Harding MA, Chadwick LJ, Gattone II, Calvet JP: The SPG-2 gene is developmentally regulated in the mouse kidney and abnormally expressed in collecting duct cysts in polycystic kidney disease. *Dev Biol* 146: 483-490, 1991.
32. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SI: Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys and hypopigmented hair. *Cell* 75: 229-240, 1993.
33. Gobe GC, Axelsen RA: The role of apoptosis in the development of renal cortical tubular atrophy associated with healed experimental renal papillary necrosis. *Pathology* 23: 213-223, 1991.
34. Kennedy WA, Stenberg A, Lackgren G y cols.: Renal tubular apoptosis after partial ureteral obstruction. *J Urol* 152: 658-664, 1994.
35. Truong LD, Petrusavska G, Yang G y cols.: Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int* 50: 200-207, 1996.
36. Kennedy WA, Buttyan R, Sawzuk IS: Epidermal growth factor suppresses renal tubular apoptosis following ureteral obstruction (abstract). *J Am Soc Nephrol* 4: 738, 1993.
37. Shimizu A, Yamanaka N: Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 64: 171-180, 1993.
38. Rosenberg ME, Paller MS: Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int* 39: 1156-1161, 1991.
39. Leda Columbano GM, Columbano A, Coni P y cols.: Cell deletion by apoptosis during regression of renal hyperplasia. *Am J Pathol* 135: 657-662, 1989.
40. Nouwen EJ, Verstrepen WA, Buysens N y cols.: Hyperplasia, hypertrophy, and phenotypic alterations in the distal nephron after acute proximal tubular injury in the rat. *Lab Invest* 70: 479-492, 1994.
41. Loffing J, Loffing-Cueni D, Hegyi I y cols.: Thiazide treatment of rats provokes apoptosis in distal tubule cells. *Kidney Int* 50: 1180-1190, 1996.
42. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H y cols.: Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 49: 103-111, 1996.
43. Shimizu A, Nakao N, Muroga K y cols.: Apoptosis in progression process of experimental crescentic glomerulonephritis (abstract). *J Am Soc Nephrol* 5: 769, 1994.
44. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y y cols.: Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 47: 114-121, 1995.
45. Mosquera J, Fernández L, Pons H y cols.: Increased apoptosis in acute puromycin aminonucleoside nephrosis (abstract). *Nephrol Dial Transplant* 11: A55, 1996.
46. Takemura T, Murakami K, Miyazato H y cols.: Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 48: 1886-1892, 1995.
47. Nakopoulou I, Stefanaki K, Papadakis J y cols.: Expression of bcl-2 oncoprotein in various types of glomerulonephritis and renal allografts. *Nephrol Dial Transplant* 11: 997-1002, 1996.
48. Soto H, Mosquera J, Henríquez C y cols.: Apoptosis in proliferative glomerulonephritis: decreased apoptosis expression in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 12: 273-280, 1997.
49. Bodi I, Abraham AA, Kimmel PL: Apoptosis in human immunodeficiency virus-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis* 26: 286-291, 1995.
50. Goulesbrough DR, Harrison DJ: Apoptotic cell death during renal transplant rejection. *J Clin Pathol* (letter) 43: 437-438, 1990.
51. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 1945-1951, 1993.
52. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb HJ: Analysis of TNF α -induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am J Pathol* 139: 251-254, 1991.
53. Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG: Discrimination of viable and nonviable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 8: 413-420, 1987.
54. Labarca C, Paigen N: A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 344-352, 1980.
55. Martin SJ, Reutelingsperger CP, Mc Gahan AJ y cols.: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182: 1545-1556, 1995.