



## **Apoptosis y óxido nítrico, dos de los tópicos más estudiados en investigación biomédica.**

**Manucha, W. A. F.**

**Area de Fisiología Patológica. Departamento de Patología.**

**Area de Química Biológica. Departamento de Morfofisiología.**

**Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo.**

**Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBE-CU).**

**Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).**

**Palabras clave:** apoptosis, óxido nítrico, obstrucción ureteral unilateral, Bcl2, caspasa 3.

**Key words:** apoptosis, nitric oxide, unilateral ureteral obstruction, Bcl2, caspase 3.

### **Resumen**

La regulación del número celular es una propiedad importante de los organismos multicelulares. A cada momento, billones de células mueren para asegurar la funcionalidad del organismo. La Apoptosis es esencial para el normal desarrollo así también así como el normal recambio fisiológico celular. El exceso y/o el defecto pueden manifestarse a través de diferentes tipos de patologías. Óxido nítrico es uno de los factores implicados en la modulación de la Apoptosis pero ha sido tema de controversias. Los principales mecanismos serían las proteínas citoprotectoras a estrés, proteínas quinasas dependientes de GMPc, actividad de caspasa y la liberación del citocromo c. Los datos recopilados indican que los niveles de óxido nítrico relevantes fisiológicamente regulan con eficacia a la apoptosis. La decisión celular de someterse o no a la muerte por apoptosis es el resultado del desequilibrio entre las fuerzas antiapoptóticas y proapoptóticas dentro de cada célula.

### **Abstract**

Regulation of cell number is a crucial property of multicellular organisms. Every moment billions of cells die to secure the functionality of the whole organism. Apoptosis is essential to normal development as well as physiological cell turnover. The excess and/or defect can manifest across different pathologies types. Nitric oxide is a factor involved in apoptosis modulation but that has produced controversies. Principal mechanisms would cytoprotective stress protein, cGMP-dependent protein kinase, caspase activity and cytochrome c release.

The accumulated data indicate that physiologically relevant levels of nitric oxide contribute to apoptosis balance. Decision for a cell to undergo apoptosis is the result of a shift in the balance between the anti-apoptotic and proapoptotic forces within a cell.

## **Introducción**

Una breve introducción nos ubica en la relevancia de nuestro tema. Kerr y colaboradores en 1.972 (1) realizaron las primeras descripciones de la Apoptosis en el ambiente científico y con un promedio de 3.860 publicaciones anuales hoy contamos con alrededor de 135.101 trabajos en cuestión. Por otro lado, Anson en 1.925 (2) hizo lo propio con el óxido nítrico y con alrededor de 1.020 publicaciones por año, hoy existen cerca de 83.672. Si relacionamos directamente al óxido nítrico con la Apoptosis nos encontramos con 4.322 trabajos indexados, siendo tan sólo cuatro los primeros allá por el año 1993, 235 en el 1.998 cuando los Dres. Furchgott, Ignarro y Murad recibieran el Premio Nobel en Medicina por el descubrimiento del óxido nítrico (ON), y finalmente en el año 2007 son 382 (casi dos por día) los trabajos que vinculan al ON con este complejo mecanismo de muerte celular. Resulta por lo tanto muy evidente el inexorable y creciente interés sobre aspectos tan significativos como la apoptosis, el óxido nítrico y su interacción, a fin de comprender mejor la complejidad del funcionamiento de los seres vivos.

## **Implicancias y alcances**

Las investigaciones más recientes confirman que la Apoptosis representa una forma muy eficiente de suicidio celular con características especiales como la muerte individual a diferencia de la necrosis, y que además, estaría modulada por estímulos fisiológicos así también como fisiopatológicos con fagocitosis de células vecinas y carentes de respuesta inflamatoria (1). Existe un gran número de evidencias que destacan el protagonismo de la Apoptosis en el inicio, evolución y/o resolución de múltiples patologías como lo son: SIDA, desórdenes degenerativos (Alzheimer, Parkinson, Retinitis Pigmentosa, Degeneración cerebral), síndromes mielodisplásicos (Anemia Aplásica), lesiones isquémicas (Infarto Miocárdico, ACV, Reperfusión), enfermedades hepáticas por tóxicos (alcohol), cáncer (Linfomas foliculares, carcinomas con p53 mutado, tumores hormono-dependientes de mama, próstata, ovario, desórdenes autoinmunes (Lupus Eritematoso Sistémico, Glomerulonefritis Inmunomediada), Infecciones Virales (Herpes, Varicela, Adenovirus), etc.

## **Nuevos aportes**

En células de mamíferos, la maquinaria apoptótica involucraría al menos dos principales rutas posibles: la vía extrínseca de muerte ce-

lular mediada por una superfamilia de receptores a diversos ligandos (TNF- , CD95L, o TRAIL), denominados receptores de muerte celular y la vía mitocondrial o ruta intrínseca que involucra a los miembros de la familia de proto-oncogenes apoptóticos Bcl2 (3). No obstante, y muy recientemente descrita, se menciona una vía alternativa y diferenciada a estas dos.

Una importante cantidad de mediadores modularían las señales apoptóticas favoreciendo o frenándolas. Siendo las sintasas de ON ubicuas y su producto de gran difusibilidad, más la marcada reactividad química del óxido nítrico en los sistemas biológicos, hacen de esta molécula única, en su rol regulador de la Apoptosis. El ON podría ser considerado como un regulador bifuncional del sistema (4), figura 1. Los efectos citotóxicos del ON han sido confirmados en numerosos sistemas empleando diversos blancos celulares. Las isoformas tipo 1 y 2 de las sintasas de ON han sido motivo de intensos estudios respecto a citotoxicidad, pero por otro lado, también se ha descrito una potente actividad antiapoptótica del ON (5, 6). Los efectos proapoptóticos estudiados serían independientes de la acumulación de GMPc, a excepción de las células de músculo liso vascular. La Apoptosis por ON sería el resultado del daño a nivel del ADN con previa inducción del proto-oncogen p53 que produce detención del ciclo celular (7). No obstante, p53 puede ayudar a reparar células dañadas mediante la inducción de p27 lo cual condiciona una disminución en la fosforilación de pRb (8). Además, se ha demostrado que el estado redox celular contribuye con la compleja interpretación del sistema así también que la citotoxicidad es el resultado de la interacción del ON con el anión superóxido para formar peroxinitritos. En injuria renal por isquemia-reperfusión, ha sido recientemente informado que el ON podría facilitar la liberación de citocromo c de la mitocondria siendo un importante factor en la vía intrínseca apoptótica (9).

Por otro lado, desde 1994 se realizan trabajos a fin de establecer información de cómo interferiría el ON con la maquinaria apoptótica. Los primeros, interpretando la activación de proteínas kinasas dependientes de GMPc y posteriormente por inhibición de las caspasas (10), mecanismo observado en muchos tipos celulares pero no verificado en tejido renal. Además de la inhibición indirecta de la actividad de las caspasas, el ON podría modular la expresión y actividad de las mismas de modo directo, debido a su capacidad de modificar el estado redox por S-nitrosilación (11). La cisteína 163 es esencial para la caspasa 3 y susceptible de modificaciones redox por ON. Tanto la inactivación de las caspasas directa o indirectamente mediada por el ON, lograría reducir la degradación de Bcl2 incrementando la concentración de su proteína. Por lo tanto, y a través de un mecanismo indirecto, el ON también podría prevenir la liberación del citocromo c, frenando la peligrosa activación de las caspasas por esta vía (12).

## Apoptosis y óxido nítrico en nefrología

En el riñón la apoptosis puede afectar a células glomerulares, tubulares, fibroblásticas, endoteliales así también como leucocitos infiltrados. Además, existiría un condicionamiento entre la atrofia tubulointersticial y la apoptosis de células tubulares e intersticiales (13). Recientemente se ha demostrado durante la obstrucción ureteral renal, un modelo experimental de fibrosis tubulointersticial, aumento de la apoptosis de células intersticiales. La nefropatía obstructiva es una de las mayores causas de fallo renal especialmente en niños. Mecanismos celulares y moleculares son responsables de la progresión de la atrofia tubular y la fibrosis intersticial, procesos que conducen a la pérdida de la funcionalidad (14, 15). La obstrucción renal hecha en ratones ha demostrado que la inducción de la apoptosis en riñones afectados, tanto en células tubulares como intersticiales manifiesta una característica distintiva que comparte un incremento en la actividad de las caspasas (16). Esta relación sugiere que las caspasas median la apoptosis celular en nefropatía obstructiva. Entre las caspasas evaluadas, el incremento de la actividad de caspasa 3 observado juega un rol central en la apoptosis celular asociada a la nefropatía obstructiva. Similares resultados fueron demostrados en nuestro laboratorio estudiando nefropatía obstructiva neonatal, relacionando apoptosis mitocondrial mediante disminución de la expresión de Bcl2 y activación de caspasa 3 (17). Figura 2

## El óxido nítrico como regulador bifuncional

Al mediador multifuncional ON se lo ha demostrado como antiapoptótico (18) así también como antifibrótico durante la obstrucción ureteral unilateral (19). Los metabolitos urinarios del óxido nítrico se elevan luego de la desobstrucción respecto del riñón obstruido. Experimentos con deleción de ONSi en ratones, demostraron incrementos de la fibrosis intersticial así como de la apoptosis (20). El tratamiento con Arginina incrementó significativamente los metabolitos urinarios de ON mientras que el tratamiento con L-NAME los disminuyó, donde el daño renal, la fibrosis, apoptosis y la infiltración de macrófagos fue significativamente mejorada con el uso de Arginina (21). La inactivación de caspasas mediada por el ON reduce la degradación de Bcl2. Recientemente demostramos en nuestro laboratorio que la incubación de tejido renal con donantes de ON como el nitroprusiato de sodio, induce aumento en la expresión de Bcl2 así como disminución de la actividad de caspasa 3 (22) figura 3. Un nuevo mecanismo antiapoptótico propuesto para el ON sería la inducción alternativa HSP32 (hemoxigenasa) y HSP70, mediante las cuales el ON modularía los niveles intracelulares de antioxidantes (23). De acuerdo con esto, nosotros tratamos ratas obstruidas unilateralmente con un bloqueante de receptores AT1 de Angiotensina II (Losartan) y demostramos disminución de la fibrosis tubulointersticial como así también del estrés

oxidativo relacionado al incremento de la expresión de HSP70 (24) figuras 4 y 5. En estudios preliminares durante la obstrucción y utilizando donantes de ON demostramos disminución en la actividad de caspasa 3 mientras que el uso de un anticuerpo específico contra HSP70 indujo un incremento de la actividad de caspasa 3. Por otro lado, el ON derivado de la ONSi es un importante mediador in vitro de la apoptosis epitelial tubular celular inducida por macrófagos y juega un importante rol en la apoptosis epitelial tubular celular y en la fibrosis tubulointerstitial in vivo (25). Además, se encuentra inducida la expresión de la isoforma 1 de la ONS localizada en la membrana interna mitocondrial durante la isquemia/reperfusión (I/R) y también la producción de ON, mecanismos envueltos en la generación intramitocondrial de peroxinitritos los cuales conducirían a la liberación de citocromo c y la inducción de apoptosis (26). La delección de la proteína de ONSe en ratones conduce a una anomalía focal renal y progresiva que incluye hipoplasia glomerular, apoptosis celular tubular provocando una disrupción tubuloglomerular (27). Estas anomalías comienzan durante la regulación normal de eNOS en el riñón en desarrollo y son similares a las observadas en una variedad de desórdenes renales crónicos. Por lo tanto, resulta crítica la producción de endógena de ONSe renal para la normal maduración e integridad renal.

Si bien son tres las isoformas de ONS las que producen ON en sistemas biológicos, estas difieren en sus funciones, secuencia aminoacídica, modificaciones post-translacionales y localización celular. Resulta claro el hecho que el ON puede suprimir o activar la muerte celular programada según su concentración, presencia concomitante de intermedios reactivos del oxígeno y la participación de la inducción de mecanismos de defensa intracelulares.

#### Perspectivas futuras

El adecuado manejo de los niveles tisulares de óxido nítrico, podría representar una alternativa muy interesante en el tratamiento no sólo de la obstrucción ureteral unilateral sino de múltiples patologías de larga data y que cursan con disminución o incremento de la apoptosis. El conocimiento de la etiología, etiopatogenia y fisiopatología de los mecanismos apoptóticos aún no se ha completado a pesar de los numerosos grupos dedicados a su estudio. Futuros estudios deberían establecerse a fin de determinar al óxido nítrico como un posible factor predictor de alteraciones fisiológicas.

#### Referencias

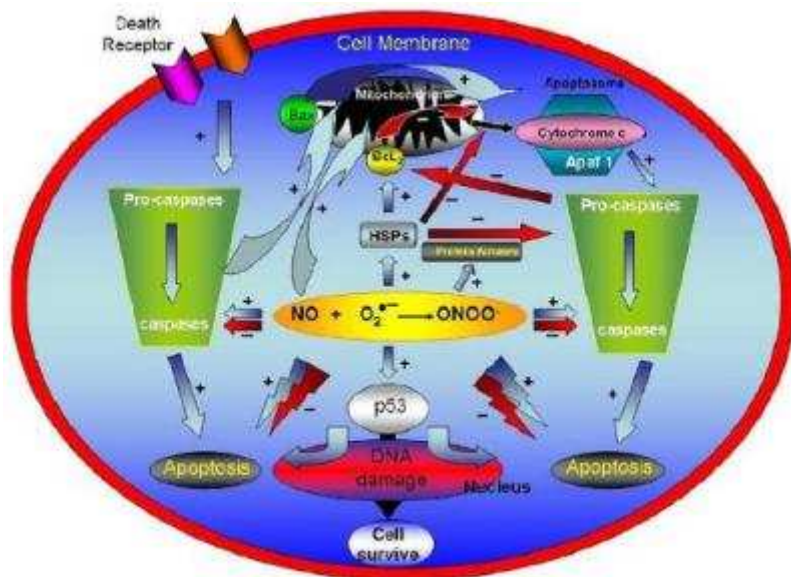
1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26(4):239-257.

2. Anson ML, Mirsky AE. On the combination of nitric oxide with haemoglobin. *J Physiol*. 1925, 60(1-2):100-102.
3. Fischer U, Schulze-Osthoff K. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(2):187-215.
4. Kin Y, Bombeck Ch, Billiar TR. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research*, 1999, 84:253-256.
5. Albina JE, Cui S, Mateo RB, Reichner JS. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*, 1993, 150(11):5080-5085.
6. Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stampler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*, 1994, 79(7): 1137-1146.
7. Li KL, Du XL, Song RH, Zhao L, He YN, Zhang JG, Chen L. Effect of p53 on the variation of renal tubular epithelial cells after kidney ischemia/reperfusion injury. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2007, 23(1):6-10.
8. Freedman DA, Folkman J. Maintenance of G1 checkpoint controls in telomerase-immortalized endothelial cells. *Cell Cycle*, 2004, 3(6):811-816.
9. Vinas JL, Sola A, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(6):992-1003.
10. Nagai-Kusuhara A, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Negi A, Seigel GM cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells. *Exp Eye Res*, 2007, 84(1):152-162.
11. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 1997, 272(49):31138-31148.
12. Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem*, 1998, 273(47):31437-31441.
13. Chevalier RL, Goyal S, Kim A, Chang AY, Landau D, LeRoith D. Renal tubulointerstitial injury from ureteral obstruction in the neonatal rat is attenuated by IGF-1. *Kidney Int*, 2000, 57(3):882-890.
14. Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Role of superoxide in apoptosis induced by growth factor withdrawal. *Semin. Nephrol*, 1998, 275(5 Pt 2):F691-702.
15. Chevalier RL. Obstructive nephropathy: towards biomarker dis-

- covery and gene therapy. *Nat. Clin. Pract. Nephrol*, 2006, 2(3):157-168.
16. Truong LD, Choi YJ, Tsao CC, Ayala G, Sheikh-Hamad D, Nassar G, Suki WN. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspasas. *Kidney Int*, 2001, 60(3):924-934.
  17. Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Vallés P. *BJU Int*, 2007, 100(1):191-198.
  18. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern JM, Jha S, Pigato J, Lemer ML, Poppas DP, Vaughan ED Jr, Felsen D. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*, 2000, 58(6):2301-2313.
  19. Hegarty NJ, Young LS, Kirwan CN, O'Neill AJ, Bouchier-Hayes DM, Sweeney P, Watson RW, Fitzpatrick JM. Nitric oxide in unilateral ureteral obstruction: effect on regional renal blood flow. *Kidney Int*, 2001, 59(3):1059-1065.
  20. Hochberg D, Johnson CW, Chen J, Cohen D, Stern J, Vaughan ED Jr, Poppas D, Felsen D. Interstitial fibrosis of unilateral ureteral obstruction is exacerbated in kidneys of mice lacking the gene for inducible nitric oxide synthase. *Laboratory Investigation*, 2000, 80(11):1721-1728.
  21. Ito K, Chen J, Seshan SV, Khodadadian JJ, Gallaher R. Dietary arginine supplementation attenuates renal damage after relief of unilateral ureteral obstruction in rats. *Kidney Int*, 2005, 68(2):515-528.
  22. Manucha W, Vallés P. Cytoprotective role of nitric oxide associated with HSP70 expression in neonatal obstructive nephropathy. *Nitric oxide: Biology and chemistry*, 2007 (in press).
  23. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol*, 1997, 17(9):5317-5327.
  24. Manucha W, Carrizo L, Ruete C, Molina H, Vallés P. Angiotensin II type I antagonist on oxidative stress and heat shock protein 70 (HSP 70) expression in obstructive nephropathy. *Cell. Mol. Biol*, 2005, 51(6):547-555.
  25. Kipari T, Cailhier JF, Ferenbach D, Watson S, Houlberg K, Walbaum D, Clay S, Savill J, Hughes J. Nitric oxide is an important mediator of renal tubular epithelial cell death in vitro and in murine experimental hydronephrosis. *Am. J. Pathol*, 2006, 169(2):388-399.
  26. Vinas JL, Sola A, Hotter G. Mitochondrial NOS upregulation during renal I/R causes apoptosis in a peroxynitrite-dependent manner. *Kidney Int*, 2006, 69(8):1403-1409.

27. Forbes MS, Thornhill BA, Park MH, Chevalier RL. Lack of endothelial nitric-oxide synthase leads to progressive focal renal injury. *Am. J. Pathol*, 2007, 170(1):87-99.

## Figuras



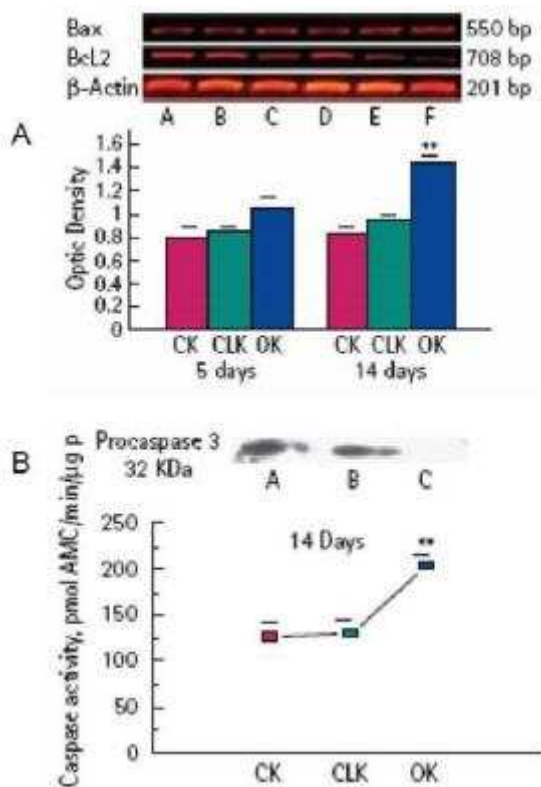
**Figura 1**

*Principales mecanismos de inducción e inhibición apoptóticos propuestos en el riñón*

Efectos Pro-apoptóticos: 1)- acumulación de la proteína p53 (supresor de tumores); 2)- formación de peroxinitritos; 3)- activación de pro-caspasas y caspasas.

Efectos Anti-apoptóticos: 1)- modulación del estado redox; 2)- inhibición de la liberación de citocromo c; 3)- inhibición de la actividad de caspasas; 4)- inducción de proteínas citoprotectoras y de proteínas kinasas dependientes de GMPC.





**Figura 2**

*A- Expresión de Bcl2, Bax y su relación en cortezas de riñones obstruidos durante 5 y 14 días*

El ARNm de Bcl2 y Bax fue determinado por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Líneas A, B y C: Control, contralateral y riñones obstruidos (5 días). Líneas D, E y F: control, contralateral y riñones obstruidos (14 días).

La intensidad de productos de PCR fue establecida por análisis densitométrico.

Los histogramas muestran la concentración relativa de ARNm para Bcl2, Bax y to B-actina.

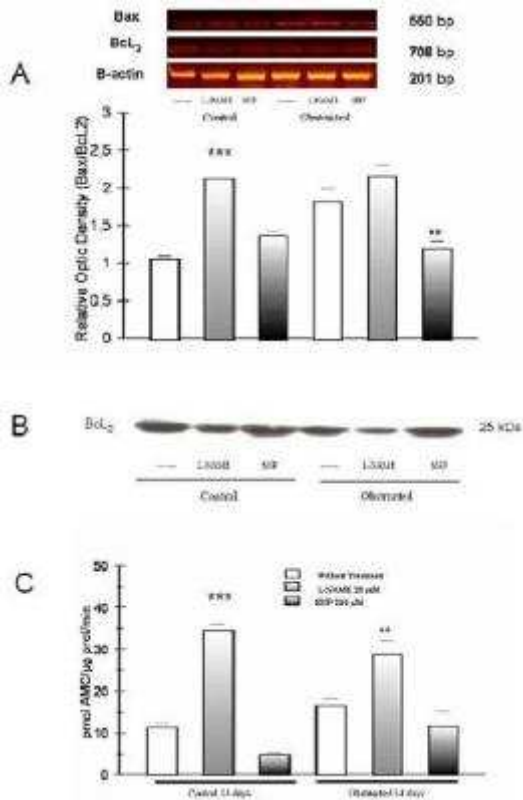
Riñones obstruidos de 14 días comparados con los controles  $**p < 0.01$  y con los contralaterales,  $**p < 0.01$ .

Los datos representan la media  $\pm$  ESM de seis experimentos independientes.

*B- Expresión y actividad de caspasa 3*

Análisis por Western Blot para procaspasa 3 (32 kDa) y actividad de caspasa 3 en cortezas de riñones controles, contralaterales y obstruidos de 14 días.

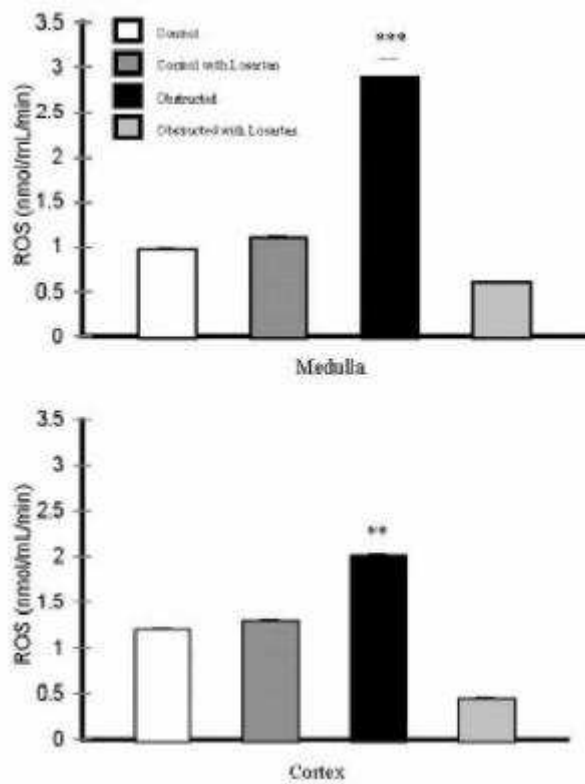
La actividad se determinó midiendo los niveles del fluorocromo DEVD-AMC. La actividad se expresó como pmol AMC/min/μg proteína. Riñones obstruidos versus controles y contralaterales,  $P < 0.01$ ,  $n=4$ .



**Figura 3**

*Efecto "In Vitro" del tratamiento con Nitroprusiato de Sodio (NPS) y L-NAME sobre la inducción de la apoptosis*

En homogenatos de 14 días (controles y obstruidos), la incubación con NPS por 24 horas demostró ausencia del índice apoptótico así como de la actividad de caspasa 3. Lo contrario se observó al tratar los homogenatos pero con el inhibidor L-NAME (\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.001$ ) respectivamente.

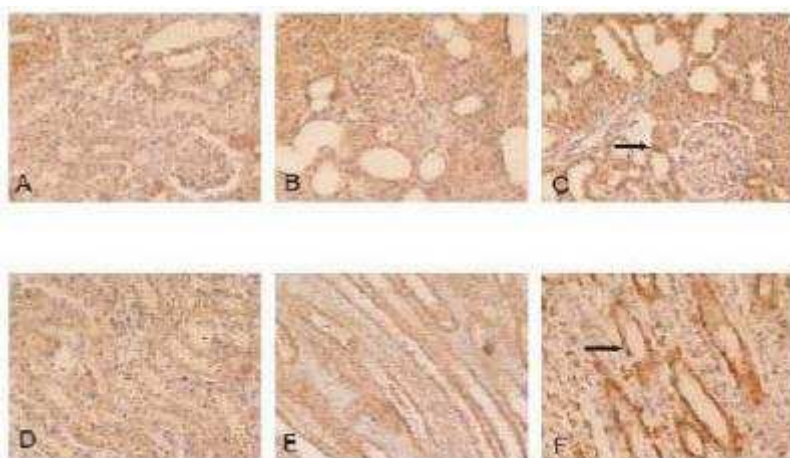


**Figura 4**

*Efecto del Losartan sobre la concentración del anión superóxido y radical hidroxilo (ROS) durante la obstrucción*

Se demostró incremento de las especies reactivas del oxígeno en cortezas obstruidas no tratadas respecto a las controles,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ . El Losartan disminuyó la concentración de estas especies significativamente  $**p < 0.01$ .

Mientras que en las médulas los resultados fueron semejantes



**Figura 5**

*Análisis inmunohistoquímico para HSP70. Expresión de HSP70 en riñones obstruidos y controles antes y después del tratamiento con Losartan.*

A) Corteza Control, se observa inmunoreacción para HSP70 en el borde de los túbulos colectores proximales. B) Corteza de riñón obstruido por 24 horas. Leve incremento de HSP70 en células tubulares proximales y túbulos colectores corticales; C) Corteza de riñón obstruido después del tratamiento con Losartan. La inmunoreacción positiva para HSP70 se incrementó en el citoplasma de túbulos proximales y corticales distales; D) Médula de riñón control, débil inmureacción observada en túbulos colectores medulares; E) Médula de riñón obstruido por 24 horas. Células positivas para HSP70 aparecen en túbulos colectores medulares; F) Médula de riñón obstruido después del tratamiento con Losartan. Mayor inmunoreacción positiva para HSP70 aparece en túbulos colectores medulares. Magnificación x 400