

# Fundamentos de la apoptosis celular: interés en endocrinología

L.M. FRAGO, A. ARROBA y J.A. CHOWEN

*Unidad de Investigación. Hospital Niño Jesús. Madrid.*

El número de células de un organismo está regulado por un balance entre la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Sin embargo, el equilibrio entre la proliferación y la muerte de una población celular puede estar alterado por un aumento o una disminución de uno de estos procesos. En particular, cuando la muerte celular ocurre en menor medida de lo normal, se observan alteraciones que conllevan acumulación de células. De igual forma, un aumento de la muerte celular podría ser responsable de la pérdida de células y sus enfermedades asociadas. A este respecto, la muerte celular se ha considerado como un mecanismo relevante que contribuye a la regulación de la vida.

## THE BASICS OF CELLULAR APOPTOSIS: INTEREST IN ENDOCRINOLOGY

**The number of cells in an organism is determined by a balance between cell proliferation, differentiation and death. However, the normal equilibrium between proliferation and death of a specific cell population is sometimes altered by an increase or decrease in either of these processes. For example, when cell death occurs to a lesser extent than required the result is an abnormal accumulation of cells. Likewise, an increase in cell death results in the loss of cells and possibly an associated disease. In this respect, cell death is considered to be an important mechanism for the regulation of life.**

*Key words:* Apoptosis. Caspases. Hormones. Pituitary. Diabetes.

Se han descrito dos vías principales de muerte celular: un proceso pasivo que conduce a la necrosis y un programa activo, denominado apoptosis. La necrosis acontece por anomalías no fisiológicas en el ambiente celular, como pueden ser altas dosis de compuestos tóxicos, hipertermia, hipoxia o infecciones virales. Se caracteriza porque la célula se hincha, la membrana se rompe, el ADN se destruye, hay daño de los orgánulos citoplasmáticos, incluyendo la mitocondria, dilatación del retículo endoplasmático y formación de vacuolas. Como consecuencia del proceso necrótico se pierde la integridad de la membrana con la consiguiente liberación al citoplasma del contenido celular, lo que da lugar a la inflamación de los tejidos circundantes.

La apoptosis es activada por la aparición/desaparición de señales de otras células y por estímulos externos y se caracteriza por una secuencia de cambios morfológicos y por modificaciones bioquímicas<sup>1</sup>. Las características más importantes de las células apoptóticas se pueden resumir en la tabla 1. Al final del proceso, la célula apoptótica o sus fragmentos son fagocitados por células vecinas o macrófagos sin inducir la respuesta inflamatoria.

La muerte celular que ocurre naturalmente como parte del funcionamiento normal de un tejido u órgano fue definida por Lockshin y Williams en 1965<sup>2</sup> como "muerte celular programada", para distinguirla de la muerte accidental debida a daño o toxicidad. En general, la muerte celular programada ocurre vía apoptosis<sup>3</sup>. La apoptosis se describió por primera vez como parte de un proceso natural destinado a eliminar células superfluas o agotadas durante el desarrollo embrionario. En este período, la apoptosis está implicada en procesos tales como la separación de los dígitos, la especialización del sistema inmune, la diferenciación sexual, el recambio de tejidos, la metamorfosis y la atrofia<sup>4</sup>. Desde entonces, se hizo evidente que la muerte que ocurre en las células posnatalmente, en respuesta a agentes fisiológicos, patológicos o farmacológicos, es similar a las muertes que tienen lugar durante la ontogenia<sup>5</sup>. La función de la apoptosis se ha extendido a morfogénesis, homeostasis de tejidos, regulación inmunológica y eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas<sup>4,5</sup>. En todos estos casos una célula afectada detecta que su ambiente o

**TABLA 1. Cambios morfológicos y bioquímicos en células apoptóticas. Principales cambios fenotípicos que tienen lugar durante el proceso de apoptosis**

Exposición de fosfatidilserina
La célula se encoge
Aparecen burbujas en la membrana
Aislamiento de la cromatina
Condensación de la cromatina
Digestión de la cromatina y de regiones internucleosomales
Alteraciones en el potencial de la membrana mitocondrial
Formación de cuerpos apoptóticos

estado físico ha sido comprometido y, como consecuencia, desarrolla un proceso de suicidio usando una maquinaria molecular de muerte celular. Como cada célula de un organismo multicelular puede encontrarse en una situación desfavorable, es concebible proponer que todas las células vivas contienen esta maquinaria<sup>6</sup>. Este proceso puede ser detenido en varios puntos, de modo que existen moléculas desencadenantes y moléculas que detienen la apoptosis, y puede ocurrir por diferentes vías de señalización. La apoptosis también desempeña un papel relevante en la oncogénesis. Así, varias drogas comúnmente usadas en quimioterapia se han descrito como inductoras del programa apoptótico<sup>7</sup>. Como consecuencia, un mejor conocimiento de las vías apoptóticas podría ayudar en la modulación de la respuesta de las células neoplásicas a los compuestos antitumorales.

#### DETECCIÓN DE CÉLULAS APOPTÓTICAS

Se asume que la célula apoptótica evidencia una morfología típica debido al *blebbing* de la membrana, la condensación y la fragmentación de la cromatina, seguido de la formación de cuerpos apoptóticos. La tinción de células con colorantes específicos para ADN (Hoescht, yoduro de propidio, naranja de acridina o DAPI) permite la identificación de células apoptóticas mediante microscopía óptica y por citometría de flujo<sup>8</sup>. Tras la inducción de apoptosis con un fármaco como el etoposido, los núcleos marcados con Hoescht 33258 revelan cambios en la estructura de la cromatina. Posteriormente, aparecen pequeñas regiones condensadas dentro de la envoltura celular. En las últimas fases de la apoptosis se hacen evidentes los cuerpos apoptóticos<sup>9</sup>.

Cuando se analiza por citometría de flujo, la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular es anómala. Al compararlas con la distribución normal, se observa una fracción de células apoptóticas con un contenido en ADN menor que el de células en G1. Cuando la apoptosis es inducida por determinados fármacos, puede aparecer también una acumulación de células en G2, lo que indica que la proliferación celular está impedida por la incapacidad de las células de reentrar en el ciclo celular. Los inductores fisiológicos de la apoptosis, como la privación de factores de crecimiento, también acumulan células con contenido en ADN menor que G1 sin bloquear una fase específica. Esta observación es importante para una mejor comprensión de la relación entre apoptosis y proliferación<sup>9</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las características de la apoptosis es la pérdida de la integridad del ADN concomitante con otras modificaciones morfológicas tempranas. La fragmentación del ADN en la región internucleosomal produce una escalera de bandas de múltiplos de 200 pb que se observa realizando una electroforesis convencional<sup>1</sup>. Sin embargo, esta característica no es el único marcador para identificar células apoptóticas. Alternativamente, el extremo libre presente en el ADN celular permite su visualización por la técnica de TUNEL (*TdT-mediated*

*dUTP nick end labeling*)<sup>10</sup>, que consiste en el marcaje de los fragmentos de ADN utilizando la enzima deoxinucleótido terminal transferasa con dUTP-fluoresceína u otro marcador que permitirá el análisis por microscopía de fluorescencia o confocal.

#### CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS

La degradación de las proteínas que tiene lugar durante el programa de apoptosis es un marcador bioquímico relevante. Un elevado número de proteínas son fragmentadas durante la apoptosis<sup>11</sup>, incluyendo la poli(ADP-ribosa) polimerasa, proteínas del citoesqueleto, como la actina,  $\alpha$ -fodrina, gelsolina y las láminas nucleares cuyos cortes contribuyen al encogimiento de la célula, la formación de las burbujas típicas de la membrana plasmática y la rotura nuclear. De los diferentes sucesos bioquímicos que tienen lugar durante la apoptosis, quizá el más importante es la participación de los miembros de la familia de las caspasas, cisteinproteasas específicas que cortan tras un residuo Asp. Hasta la fecha, se han identificado 14 caspasas de mamífero<sup>6</sup>, y todas ellas se expresan como proenzimas inactivas que son activadas proteolíticamente para formar un complejo catalítico tetramérico<sup>12</sup>.

Las caspasas cortan diferentes proteínas celulares en un proceso de proteólisis limitada en el que un número pequeño de cortes, normalmente sólo uno, tiene lugar en regiones interdominios. El corte puede dar lugar a la activación de la proteína o a la inactivación, pero nunca a la degradación, debido a su alta especificidad de sustrato que distingue a las caspasas como las más estrictas de las endopeptidasas<sup>13</sup>. Es de singular importancia que los zimógenos de las caspasas son, ellos mismos, sustratos para las caspasas, de manera que unas son capaces de activar a las otras de manera jerárquica. El corte proteolítico activador tiene lugar dentro de un corto segmento que conecta las subunidades grande y pequeña del dominio catalítico. La localización del corte dentro de este segmento necesita ser preciso<sup>14</sup>, es el Asp 297 (muy conservado) el que dirige la especificidad del corte dentro de este segmento. La mayoría de las caspasas activadas pueden procesarse, tanto a sí mismas como a otras caspasas si se da el tiempo y la concentración necesarios<sup>15</sup>. La extensión del proceso está regulada por los residuos que rodean a este Asp 297. Así, en tiempos inferiores a 30 min lo que se obtiene son zimógenos sin procesar.

Se considera que existen caspasas activadoras o iniciadoras, encargadas de poner en marcha la cascada proteolítica que termina en el corte y activación de otras ejecutoras, las conocidas como caspasas efectoras. La conexión entre el estímulo de muerte y las cascadas proteolíticas está asegurado por proteínas adaptadoras<sup>6</sup>. Estas proteínas se autoasocian en respuesta a un estímulo apoptótico mediante la unión a un dominio N-terminal largo presente sólo en las caspasas iniciadoras. Estos dominios se conocen como DED o CARD (*caspase recruitment domain*). Acto seguido, se oligomerizan y activan la primera proteasa en la cascada<sup>16</sup>. Por ejemplo, Fas/Apo y otras moléculas del tipo TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) usan como adaptadoras a las proteínas FADD y RAIDD para oligomerizar y autoactivar a las caspasas iniciadoras caspasa-8 y caspasa-2, respectivamente<sup>17,18</sup>. La caspasa-8, entonces, directamente corta y activa a la caspasa-3<sup>19</sup>. La existencia de caspasas iniciadoras por encima de las efectoras en vías específicas de señalización de apoptosis se ha estudiado con ratones nulos para caspasa-8 que son resistentes a la apoptosis inducida por Fas y a TNF- $\alpha$  pero son sensibles a fármacos quimioterápicos, la retirada de suero y dexametasona. En contraste, las células deficientes

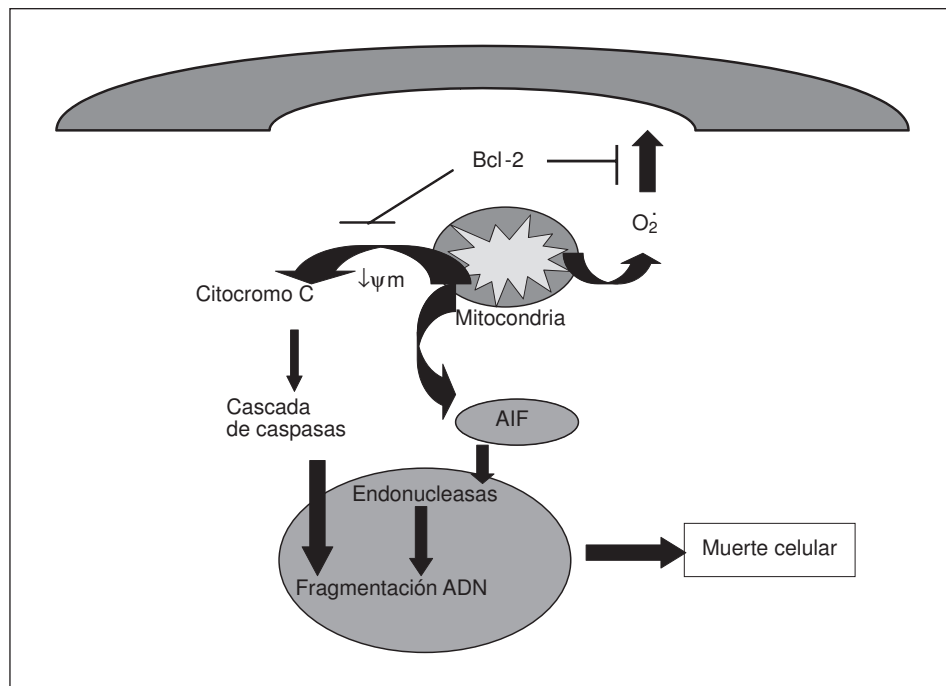


Fig. 1. Función de la mitocondria en apoptosis. El incremento de los valores de calcio citosólicos aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial, este hecho es uno de los desencadenantes de la apoptosis. El citocromo C y el factor inductor de apoptosis (AIF) conducen la cascada proteolítica hasta el daño en el ADN (fragmentación y mutación) y la muerte celular. El citocromo C actúa en forma de complejo multimérico con Apaf-1, activando a la procaspasa-9. Bcl-2 puede bloquear la liberación del citocromo C de la mitocondria, previniendo la activación de la cascada de caspasas y apoptosis.  $\Psi_m$ , potencial de membrana.

tes en caspasa-9 (también iniciadora) permanecen sensibles a señalización por Fas y TNF- $\alpha$  pero son resistentes a irradiación, fármacos y dexametasona.

Otra molécula adaptadora es Apaf-1, que se une a la procaspasa-9 y provoca la autoasociación y activación de la proteasa<sup>20,21</sup>. Esta función de Apaf-1, sin embargo, no está restringida a un estímulo específico sino que participa en una vía de señalización muy común que implica a la mitocondria<sup>22</sup>.

### FUNCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS EN LA APOPTOSIS

El daño mitocondrial se ha interpretado siempre como un signo típico de necrosis donde las organelas se hinchan y se rompen y previenen la producción de ATP y, subsecuentemente, las células mueren por la desestabilización iónica. En los últimos años, se han observado durante la apoptosis cambios significativos pero más sutiles en la mitocondria<sup>23,24</sup>. Aumenta la producción de radicales de oxígeno, hay cambios en el ciclo del calcio, la caída del potencial transmembrana y una permeabilidad aumentada de la membrana externa mitocondrial<sup>23,24</sup>. Invariablemente, además, tiene lugar la liberación de citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citoplasma<sup>25,26</sup>, donde se une a la proteína adaptadora Apaf-1, activando secuencial-

mente a la procaspasa-9 y a la 3<sup>21,22</sup> (fig. 1). Esta vía se considera importante porque los ratones KO de Apaf-1 y caspasa-9 tienen importantes anomalías cerebrales y mueren intraútero sin tener afectada la apoptosis en respuesta a Fas y TNF- $\alpha$ <sup>27,28</sup>. Por tanto, los defectos pueden ser debidos a un retraso en la apoptosis más que a una ausencia y el papel de los componentes de la mitocondria podría ser el de amplificar más que el de ejecutar los procesos de muerte<sup>29</sup>. Se podría decir que el papel de la mitocondria es especialmente importante para la rapidez y efectividad en la eliminación de las células durante el desarrollo embrionario, lo que explicaría los defectos en el cerebro de los ratones nulos para Apaf-1 y Casp-9.

### MECANISMOS CELULARES DE PROTECCIÓN FRENTE A LA APOPTOSIS

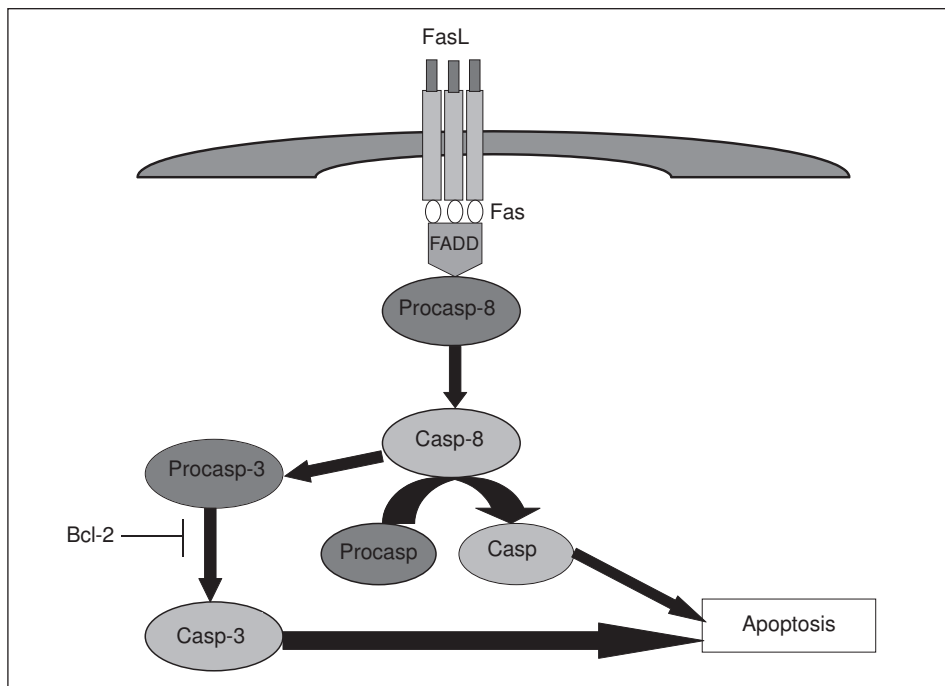
¿Cómo previene una célula de mamífero la muerte celular programada? Por una parte, las células pueden expresar varias proteínas IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis) que pueden actuar como inhibidores directos de las caspasas o intervenir en las vías apoptóticas activadas por Fas/TNF- $\alpha$ <sup>30,31</sup>. Además, hay al menos 16 homólogos humanos de un factor de supervivencia del cual el producto del protooncogén Bcl-2 es el miembro fundador<sup>29</sup>. Aunque Bcl-2 no interacciona ávidamente con Apaf-1, sí previene la liberación

TABLA 2. Principales proteínas implicadas en apoptosis

Estímulos	Receptores	Adaptadoras	Iniciadoras	Mediadoras	Efectoras
FasL	Fas	FADD	Caspasa-8	Bid Cit-c Bcl-2	Caspasas: 3, 6, 7
TNF	TNFR1	TRADD	Caspasa-9	Bax Cit-c Bcl-2 Apaf-1	Caspasas: 3, 6, 7
NGF	p75	TRAF2	Caspasa-1, 2		Caspasa-3

Algunas vías son específicas del tipo celular, pero en la misma célula puede activarse más de una vía, dependiendo del estímulo.

Fig. 2. Señalización de Fas. Fas es miembro de la superfamilia de receptores del TNF (tumor necrosis factor), que pertenece a la familia de receptores transmembrana. Se ha demostrado que Fas es un mediador importante en la muerte celular por apoptosis. La unión de Fas ligando (FasL) induce la trimerización de Fas. La activación de Fas genera el reclutamiento de proteínas con dominios de muerte (FADD). La procaspasa-8 se une a Fas por FADD, y una vez activada la caspasa-8 se produce la activación de otras procaspasas.



del citocromo c desde la mitocondria, de manera que se bloquea la activación de Casp-9/Casp-3 antes o independientemente de Apaf-1<sup>32</sup>. Aunque la acción de Bcl-2 todavía no se conoce con certeza parece ser que afecta a la mitocondria en sí. No obstante, otro potente miembro antiapoptótico de la familia, Bcl-xl, sí interacciona con Apaf-1 y previene la activación de la caspasa-9<sup>33,34</sup>.

Durante los últimos 10 años, ha crecido el interés acerca de la influencia de la apoptosis sobre la sensibilidad de los tumores a los tratamientos anticáncer. Una razón importante es que la apoptosis es un programa definido de muerte celular que está marcadamente influido, tanto positiva como negativamente, por una gran variedad de genes, muchos de los cuales están mutados o regulados anómalamente en los cánceres humanos. Entre los más importantes se encuentran los ya descritos miembros de la familia de Bcl-2 y el gen supresor de tumores p53. Diversos estudios genéticos han conducido a la hipótesis de que tumores con mutaciones en p53, valores altos de Bcl-2 o índices altos de la relación Bcl-2:bax conllevan resistencia a los tratamientos anticáncer.

## APOPTOSIS DISPARADA POR RECEPTORES DE MUERTE

Una de las vías más estudiadas, resumida en la tabla 2, ha sido la que implica a los receptores de muerte transmembrana pertenecientes a la familia de receptores R1 del TNF, que incluye al receptor p75 de las neurotrofinas y a Fas (CD95). Todos ellos son proteínas de membrana con un dominio rico en cisteína en la parte extracelular y un dominio transmembrana sencillo. Además, algunos de estos receptores presentan una secuencia corta denominada dominio de muerte (DD) en la región citoplasmática. Tras la unión de ligandos específicos, estos receptores transmiten una señal letal que concluye con una muerte apoptótica clásica. Naturalmente, hay muchos otros sistemas efectores de muerte celular; algunos fisiológicos, como la privación de factores de supervivencia solubles o de sustancias de adhesión al sustrato, así como el encuentro con células citotóxicas, irra-

diación o fármacos quimioterápicos. Pero la mayoría de ellos conllevan procesos que conectan con vías estudiadas para el TNF o CD95L.

Básicamente, las vías de muerte iniciadas por los receptores de muerte son:

1. Activación de una caspasa iniciadora (caspasa-8) que directamente activa a las caspasas efectoras (caspasa-3 y 7). Estas últimas son las responsables de los diversos fenómenos que caracterizan la muerte apoptótica.

2. La caspasa iniciadora (caspasa-8) produce en el citosol una molécula procesada (Bid/CAF) que actúa sobre la mitocondria para la liberación de citocromo c y otras proteínas desde el espacio intermembrana. El citocromo c entonces activa a la caspasa 9 que conducirá a la activación de caspasas efectoras.

3. El TNF- $\alpha$  dispara una vía que da lugar a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria. Las células se hinchan y se colapsan de forma súbita. Esto es típico de necrosis. No hay mediación de caspasas.

4. El TNF- $\alpha$  u otros estímulos pueden conducir a estrés oxidativo, normalmente con producción de ROS por mitocondrias activadas. Estas moléculas, entonces, causan liberación de citocromo c desde la mitocondria, y ocasionan la activación de caspasas efectoras.

5. TNF y CD95L pueden activar a la proteína ASK-1 (*apoptosis signal-regulating kinase*) que vía JNK y p38 MAPK conduce a la activación de factores de transcripción que aumenta la expresión de CD95L. Por mecanismos autocrinos o paracrinos se induce la muerte celular por las vías 1 o 2, anteriormente descritas.

## VÍA DE MUERTE CELULAR PROTOTÍPICA

La muerte celular inducida por CD95L esquematizada en la figura 2 ocurre de la siguiente manera: los ligandos unidos a membrana se agrupan a su receptor CD95, cuyo dominio citoplasmático contiene la región característica de 85 aminoácidos denominada DD. Esta región del receptor re-

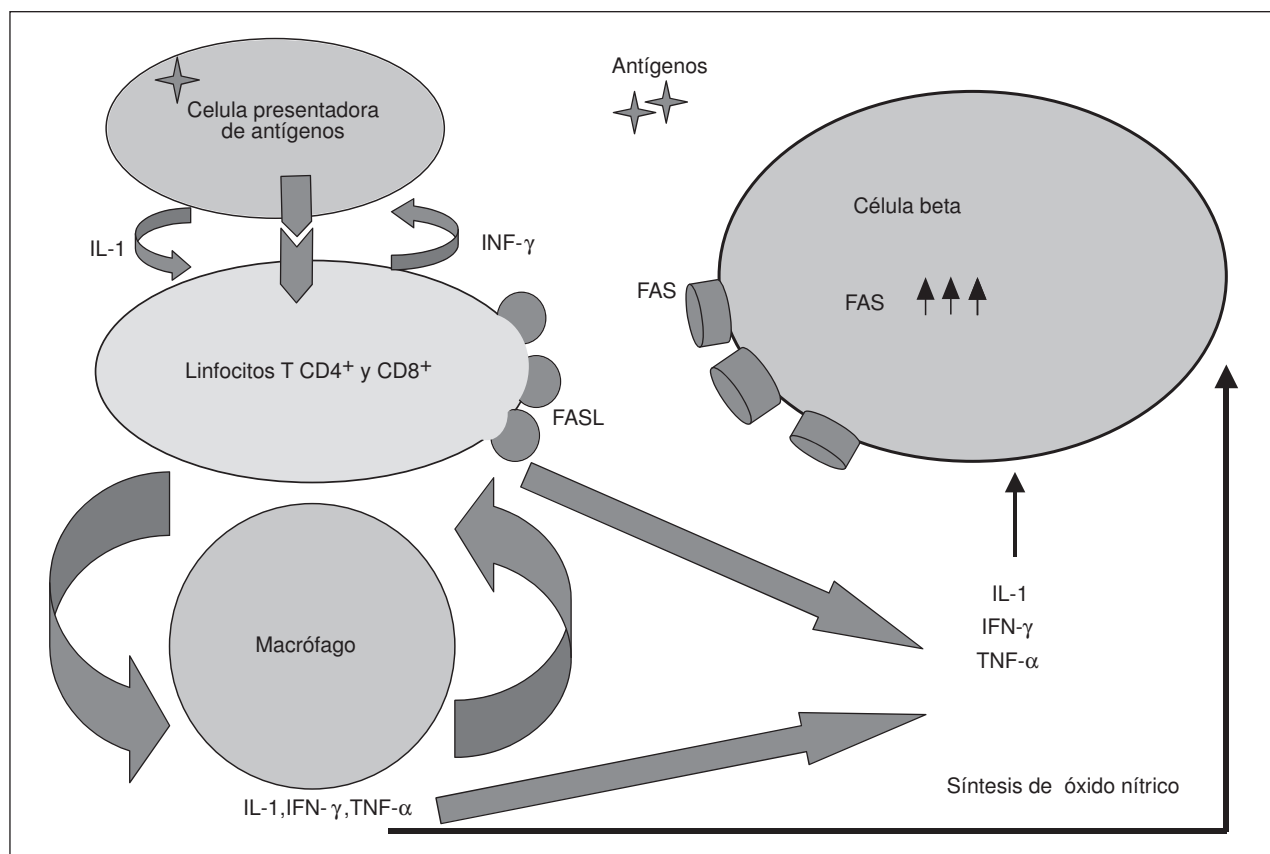


Fig. 3. Posibles mecanismos de destrucción de la célula  $\beta$  en la diabetes tipo 1. Las células T activadas podrían inducir la apoptosis por tres mecanismos: el primero ocurriría vía Fas/FasL. El segundo se produciría por la activación de los macrófagos y la vía de la síntesis del óxido nítrico. El tercero implicaría a la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y al interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

cluta varias copias de DD de otra proteína, FADD. La parte aminoterminal de FADD es un dominio efector de muerte (DED), por unión homofílica con el prodominio del zimógeno de la caspasa-8 que contiene 2 DED<sup>35</sup>. La proximidad inducida de dos o más zimógenos con una actividad baja conduce a la autoactivación con liberación de caspasa-8 activa en el citoplasma<sup>13</sup>. Esta caspasa iniciadora actúa sobre varios sustratos citosólicos como CAF o Bid, que hace que disminuya el potencial de membrana mitocondrial y que se libere citocromo c al citoplasma<sup>36</sup>. Bid requiere Bax, una proteína de la familia de Bcl-2 proapoptótica para su acción en la mitocondria<sup>37</sup>. El citocromo c en presencia de dATP o ATP induce un cambio conformacional de la proteína adaptadora Apaf-1 y/o liberación de Bcl-2, de manera que Apaf-1 no sólo se une a la caspasa 9 sino que dimeriza, lo que permite la yuxtaposición de 2 procaspasas-9 resultando en la autoactivación y liberación de caspasa-9 madura<sup>34</sup>. Esta última activa a las caspasas efectoras 3 y 7<sup>15</sup> que actúan sobre multitud de sustratos que afectan a la integridad del citoesqueleto, a la estructura de la lámina nuclear y al ADN, entre otros, mientras que los sistemas de reparación permanecen inactivados<sup>38</sup>.

Las caspasas efectoras pueden actuar sobre sustratos por encima de la mitocondria creando un *loop* positivo (caspasas-3 corte a la pro-casp-8)<sup>39</sup>. Otro efecto de *feedback* positivo puede ser que la caspasa-3 corte a Bcl-2 generando un efector tipo Bax<sup>40</sup>.

En algunas células llamadas tipo I, la caspasa-8 puede activar directamente las caspasas efectoras sin requerir liberación de citocromo c<sup>41</sup>. Se distinguen de las de tipo II en la formación de cantidades grandes de caspasa-8 activa en lo que se conoce como DISC (*death inducing signalling complex*) y por la ausencia de un efecto inhibidor de Bcl-2. DISC está formado por Fas, la proteína adaptadora FADD y la caspasa-8.

Cuando el TNF se une a su receptor TNF-RI (o TNF-R55) se libera la proteína SODD, una proteína silenciadora que normalmente está unida a la región intracelular del receptor<sup>42</sup>. TNF-RI, además, contiene dominios DD que reclutan a la proteína adaptadora TRADD a través de sus dominios DD. TRADD se une a FADD y esta vía inicia una cascada apoptótica iniciada por la caspasa-8 ya descrita. Pero TRADD puede interactuar también con TRAF2 (*TNF associated factor*) y con RIP (*rec interacting factor* con secuencias DD). Esta última activa p38 MAPK, jun N-terminal cinasa (JNK) y, quizá e incluso más importante, activa a NF-KB, responsable de la rápida expresión de un grupo de genes que codifican para proteínas que protegen de la muerte celular, por ejemplo A20<sup>43</sup>, TRAF1, TRAF2 y las proteínas inhibidoras de apoptosis c-IAP1 y c-IAP2<sup>44</sup>. La rápida síntesis de estas proteínas de rescate explica en parte por qué la actinomicina D o la cicloheximida son potentes sensibilizadores de la muerte inducida por TNF-RI<sup>45</sup>.



## APOPTOSIS EN EL SISTEMA ENDOCRINO

Las hormonas, las citocinas y los factores de crecimiento actúan como protectores específicos o generales de la apoptosis. Sin embargo, en determinadas condiciones fisiológicas o patológicas también pueden inducir la muerte celular programada. Las hormonas esteroideas son potentes reguladores de la apoptosis en la hipófisis, la glándula mamaria, la próstata, el ovario y los testículos. En enfermedades autoinmunes como la enfermedad tiroidea autoinmune y la diabetes mellitus, se ha descrito que el sistema inmune por sí mismo no daña el órgano en última instancia, sino que son las células diana (células tiroideas y células beta de los islotes pancreáticos) las que se suicidan por apoptosis<sup>46</sup>. Cómo influyen las hormonas en la muerte celular programada y, por tanto, cómo la apoptosis afecta a las glándulas endocrinas es importante para el diseño de nuevas estrategias para prevenir y tratar enfermedades que afectan a los tejidos endocrinos.

## APOPTOSIS EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS

El eje hipotálamo-hipófisis durante el desarrollo sufre remodelaciones en las que están implicados procesos de apoptosis<sup>47</sup>, y son unas zonas más proclives que otras a sufrir apoptosis<sup>48</sup>. Al igual que ocurre en otros sistemas, en el eje hipotálamo-hipofisiario, la apoptosis tiene lugar por la interrelación de diferentes vías. La relación entre la hipófisis y las hormonas sexuales implica un control apoptótico: durante el embarazo y la lactancia de las ratas aumenta el número de células lactotrofas<sup>49</sup>, y al cesar la lactancia disminuye<sup>48</sup>. Se ha visto que en estos procesos, la apoptosis está regulada por las proteínas Bcl-2 y Bax<sup>48</sup>. En función de la mayor expresión de una u otra se produce apoptosis o se protege frente a la muerte celular.

Estudios llevados a cabo en rata ponen de manifiesto que una subpoblación de neuronas en el hipotálamo expresa Bcl-2 y que esta expresión está afectada por los esteroides sexuales. La “upregulación” de la expresión de Bcl-2 en ratas durante el aumento de estrógenos en plasma sugiere que las fluctuaciones naturales de los valores periféricos de estradiol pueden regular la expresión de Bcl-2. La progesterona al contrario que el estradiol disminuye la expresión de los receptores nucleares de estrógenos<sup>50</sup>.

Los mecanismos de acción de los estrógenos tiene lugar tras la unión a un receptor nuclear, sin embargo, también se habla de la existencia de receptores de membrana para estrógenos<sup>51</sup>. Se ha descrito una interacción intracelular entre estrógenos y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I). La abundante coexpresión del receptor de estrógenos y del receptor de IGF-I en multitud de áreas cerebrales sugiere que la interacción entre estrógenos e IGF-I puede ocurrir en diferentes lugares del sistema nervioso central (SNC). Se han identificado tres vías de confluencia:

1. Vía de la MAPK que puede bloquear a la JNK<sup>52</sup> y actuar sobre el receptor nuclear de estrógenos activando al factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*), que se une al promotor del gen Bcl-2<sup>53</sup>.

2. Vía de la PI<sub>3</sub>K que regula la activación de la PKB o AKT, que una vez activada bloqueará la expresión de dos proteínas proapoptóticas como Bad y caspasa-9<sup>51</sup>.

3. Acción sobre el gen Bcl-2 tras la unión del complejo ligando-receptor a un elemento de respuesta a estrógenos (ERE)<sup>54</sup>, que actuando a modo de *enhancer* aumenta la expresión de Bcl-2 y su efecto neuroprotector.

Bcl-2 es un punto de convergencia de distintas vías implicadas en la protección frente a apoptosis<sup>51</sup>.

## CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS EN TESTÍCULOS

El control de la apoptosis de las células germinales durante la espermatogénesis es especialmente importante. Este control está mediado por señales derivadas de las células de Sertoli, estrechamente asociadas a las células germinales y por señales exteriores a los testículos<sup>55</sup>. La señalización intracelular que determina el destino de la célula germinal implica a los miembros de la familia de Bcl-2. La apoptosis de las células germinales puede estar influida por un descenso de factores de supervivencia en las células de Sertoli<sup>56</sup>. Una combinación de hormonas esteroideas y peptídicas con factores de crecimiento reducen la apoptosis y aumentan la supervivencia de las células de Sertoli en cultivo. La membrana basal de las células de Sertoli desempeña un papel importante en supervivencia<sup>57</sup>. En ausencia de membrana basal, la FSH y otros reguladores de la función de las células de Sertoli no pueden prevenir la apoptosis de las células de Sertoli.

## CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS EN LA PRÓSTATA

Tanto en tejidos normales como en neoplásicos, los andrógenos actúan como reguladores endógenos específicos de la muerte celular programada, estimulan la síntesis de ADN y de mitógenos en células prostáticas ejerciendo un efecto antagónico sobre la muerte celular. Los estrógenos tienen efectos opuestos a los andrógenos, estimulando la muerte celular en la próstata<sup>58</sup>.

## CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS EN EL OVARIO

La atresia de los folículos ováricos en los mamíferos se inicia por la apoptosis de las células de la granulosa en respuesta a la deprivación hormonal. Las células de la granulosa son las principales productoras de las hormonas sexuales responsables de la función cíclica del ovario. La muerte celular programada en el ovario tiene un papel crucial limitando el número de folículos que pueden ovular y así evitar el desarrollo de más embriones de los que pueden completarse con éxito<sup>59</sup>. Por ello, solamente una pequeña proporción de folículos escapa a la muerte celular programada. Durante la oogénesis, el número de células germinales disminuye bruscamente por apoptosis cuando se inicia la meiosis. La apoptosis de los oocitos afecta a las células germinales primordiales, a los oocitos en paquítina y a los folículos primordiales tempranos<sup>60</sup>. La apoptosis de los oocitos implica a Fas y a la familia de Bcl-2.

Los factores de crecimiento IGF-I e insulina, los estrógenos, la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona foliculostimulante (FSH) son factores de supervivencia de los folículos; los andrógenos y la hormona liberadora de gonadotropina potencian la apoptosis del folículo. El IGF-I es un importante factor de diferenciación y supervivencia de las células de la granulosa, esta última función la realiza activando la vía de la PI3K/AKT<sup>61</sup>. El IGF-I (producido de forma endógena) media en parte el efecto de las gonadotropinas en la inhibición de la apoptosis.

## CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS EN LA GLÁNDULA MAMARIA

El crecimiento normal de la glándula mamaria implica proliferación, diferenciación, apoptosis y remodelación de la membrana basal a través de la estimulación ovárica del

**TABLA 3. Apoptosis y diabetes tipos 1 y 2. Diferentes mecanismos de estimulación y de las vías de señalización que podrían mediar la apoptosis en la diabetes tipos 1 y 2**

	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2
Estimuladores	IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ Ceramide (?), Bcl-2 $\downarrow$	Ácidos grasos, amilina TNF- $\alpha$ (?), ceramida, bcl-2 $\downarrow$
Efectores	JNK Óxido nítrico, caspasas	JNK (?) Óxido nítrico, caspasas (?)

ciclo menstrual y durante el ciclo de embarazo y lactancia. La regulación de estos procesos requiere la acción concertada de estrógenos y progesterona. La regresión de la glándula mamaria lactante se induce por la disminución de las concentraciones de prolactina y hormonas glucocorticoideas<sup>62</sup>. La retirada de las hormonas lactogénicas dispara un programa de muerte celular epitelial que se caracteriza por una disminución de la expresión génica de la caseína y un aumento de expresión de genes asociados a apoptosis como el TGF- $\beta$ <sup>63</sup>.

#### CONTROL HORMONAL DE LA APOPTOSIS EN EL ÚTERO

Los estrógenos, la progesterona, la dihidrotestosterona y la dexametasona inhiben la apoptosis del epitelio uterino. En el endometrio de primates la progesterona y el estradiol tienen efectos proliferativos o antiapoptóticos. Sin embargo, tras una prolongada exposición del estroma endometrial a progesterona se produce apoptosis y puede contribuir a la hemorragia menstrual<sup>64</sup>.

La progesterona y los estrógenos controlan la diferenciación y la apoptosis endometrial mediante el control de la expresión génica de la familia de Bcl-2. La expresión de Bcl-2 disminuye tras el tratamiento hormonal, mientras que Bax aumentaba. En resumen, el balance entre Bax y Bcl-2 está alterado durante la diferenciación de las células del estroma y deben desempeñar un papel significativo en el desarrollo placentario<sup>65</sup>.

#### ENFERMEDADES ENDOCRINOLÓGICAS Y APOPTOSIS

Las alteraciones en los mecanismos de supervivencia contribuyen a la patogenia de un número de enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, las infecciones virales, enfermedades autoinmunes, alteraciones neurodegenerativas y sida. Los tratamientos diseñados para regular la apoptosis pueden cambiar la progresión natural de algunas de estas enfermedades. En las enfermedades autoinmunes como la enfermedad tiroidea autoinmune o la diabetes mellitus son las células afectadas las que se suicidan por apoptosis.

#### DIABETES

Dada la necesidad vital de insulina, pero también el peligro de un exceso en su secreción, la función y la cantidad de células beta están estrechamente reguladas, lo que ha dado lugar a una célula altamente especializada que es receptiva a estímulos proliferativos pero también de apoptosis que se han relacionado con diabetes tipo 1 y 2. Las células endocrinas de los islotes de Langerhans del páncreas, incluyendo a las células beta, productoras de insulina, se renuevan cada 40-50 días mediante procesos de apoptosis, proli-

feración y diferenciación de nuevas células (neogénesis) a partir de células epiteliales progenitoras localizadas en los conductos pancreáticos<sup>66</sup>. Existen señales inmunológicas, inflamatorias y metabólicas que causan apoptosis de las células beta pancreáticas (tabla 3). Entre los factores relevantes para la diabetes tipo 1 se encuentran las citocinas proinflamatorias, el óxido nítrico, las especies reactivas de oxígeno y el ligando de Fas. En la patogenia de la diabetes tipo 2 están implicados los ácidos grasos libres, la glucosa, la sulfonilurea y la amilina. Además, hay evidencia de que existe una convergencia en las vías de señalización hacia un efector común en la apoptosis que sufren las células beta del páncreas en la diabetes tipo 1 y 2<sup>67</sup>. Estos estudios recientes con interleucina 1 (IL-1) beta implican las cascadas de proteínas cinasas activadas por estrés, JNK<sup>68</sup>.

#### APOPTOSIS Y DIABETES TIPO 1

La apoptosis es el mecanismo más frecuente en la destrucción de las células beta en la diabetes de origen inmunológico. Los macrófagos y las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> median la insulinitis y diabetes en modelos animales. Por tanto, existen diversas posibilidades teóricas sobre cómo el sistema inmune destruye las células beta (fig 3):

- Las células T CD8<sup>+</sup> causan destrucción de células beta por la vía de la perforina/granzima, que conlleva la inserción de los complejos tubulares de la perforina en la membrana celular y la muerte osmótica y no apoptótica. Sin embargo, los ratones deficientes en perforina desarrollan diabetes con más frecuencia.

- Células T activadas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> expresan FasL, que tras la unión a Fas causa la muerte apoptótica de las células beta. Citocinas como la IL-1 aumentan la expresión de Fas. Tras diversos estudios, parece que la función de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> es activar a los macrófagos tras la estimulación antigénica. Estos macrófagos activados facilitan la destrucción de los islotes por un mecanismo dependiente de la vía de síntesis del óxido nítrico<sup>69</sup>.

- Los macrófagos y las células T pueden afectar la viabilidad de las células beta por medio de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Estas citocinas destruyen las células beta *in vitro*<sup>70</sup>. En estudios *in vivo* se ha descrito que los receptores circulantes y anticuerpos neutralizantes IL-1, los receptores de TNF- $\alpha$  y los anticuerpos de IFN- $\gamma$  previenen la diabetes tipo 1 sin afectar al sistema inmune de células T<sup>71</sup>.

De todos los estudios se recoge la idea de que la destrucción de las células beta y la diabetes tipo 1 dependen de la interacción entre macrófagos, células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup> que establecen una lesión inflamatoria crónica en la que los mediadores solubles como el óxido nítrico y las citocinas son importantes moléculas efectoras.

#### APOPTOSIS Y DIABETES TIPO 2

La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina y una secreción insuficiente de insulina por disminución del número de células beta. En islotes cultivados en medio rico en glucosa (16,7 mmol/l) aumentan los procesos de apoptosis; sin embargo, la expresión de Bcl-2 no se ve afectada, mientras que Bcl-xl disminuye y la expresión de los genes proapoptóticos *Bad*, *Bid* y *Bik* aumenta. Por tanto, en los islotes humanos los valores de glucosa pueden modular el balance entre los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl<sup>72</sup>.

En ratas diabéticas Zucker (*fa/fa*) los islotes presentan valores muy elevados de ácidos grasos libres que aumentan la apoptosis a través de diferentes mecanismos: la estimula-

ción de la esfingomielinasa y generación de ceramida; aumento de expresión de óxido nítrico y disminución de la expresión de Bcl-2. La leptina aumenta los valores de Bcl-2 y de esta manera previene la apoptosis de los islotes<sup>73</sup>.

El tratamiento con sulfonilurea a tiempos largos en ratones ob/ob dispara una apoptosis dependiente de Ca<sup>2+</sup><sup>74</sup>. Concentraciones elevadas de glucosa causan una disfunción de las células beta y una desensibilización a la glucosa e inducen la apoptosis en ratones ob/ob, aunque la glucosa puede también ejercer una función protectora.

Finalmente, el depósito amiloide de amilina en los islotes contribuye al deterioro de la función de las células beta<sup>75</sup>. Por tanto, existen amplias evidencias de factores metabólicos implicados en la patofisiología de la diabetes tipo 2 y también que factores farmacológicos usados para el tratamiento de la diabetes tipo 2 pueden causar apoptosis.

## ENFERMEDADES TIROIDEAS

### Tiroiditis de Hashimoto

La tiroiditis de Hashimoto (TH) es una enfermedad de origen autoinmune, en la que la apoptosis está implicada en su patogenia a través de la señalización de Fas.

Esta enfermedad se caracteriza por una respuesta inmune a los antígenos tiroideos y una intensa infiltración en la glándula tiroidea, esto lleva a la destrucción de las células foliculares y a un hipotiroidismo crónico<sup>76</sup>. Estos datos sugieren que en la TH las células foliculares sufren apoptosis mediante la estimulación de la vía de Fas/FasL y la inhibición de Bcl-2. Los linfocitos infiltrados no parecen estar implicados directamente pero proveen del entorno de citocinas apropiado que da lugar a la "upregulación" de Fas y FasL y, por tanto, de la maquinaria apoptótica.

### Carcinomas de tiroides

Muchos tumores son resistentes a apoptosis y expresan FasL constitutivamente. Esto sugiere que poseen algún tipo de mecanismo, como los ligandos de muerte para luchar con el sistema inmune. El resultado puede ser la depleción de linfocitos antitumor, inmunosupresión y escape inmunológico<sup>77</sup>.

Al contrario de una célula tiroidea normal, los carcinomas papilares, foliculares y de Hurthe presentan inmunorreactividad para FasL, especialmente en áreas pobres en diferenciación, mientras que en carcinomas medulares su expresión es baja o no existe.

### Bocio

En condiciones normales, el tamaño de la glándula tiroidea en el adulto es constante porque la proliferación celular se contrarresta con los procesos de muerte celular. Este balance está desequilibrado en esta enfermedad, resultado de una hiperplasia de las células foliculares de la glándula tiroidea. Se ha estudiado el efecto del yodo y se ha descrito que concentraciones bajas inhiben la apoptosis pero a dosis altas se induce apoptosis vía Fas<sup>78</sup>.

Estos hallazgos indican que el delicado balance entre proliferación y apoptosis es importante para el control de la masa de la glándula tiroidea.

## CONCLUSIONES

La integridad de los organismos multicelulares depende no sólo de la estricta regulación de la proliferación y la diferenciación, sino también de la regulación de la muerte celular. Aquí se han descrito los principales componentes de las

vías de muerte celular. Los agentes que suprimen la apoptosis son de uso potencial en el tratamiento clínico. Para esto, es importante conocer las diferentes vías de supervivencia y sus conexiones con las vías de muerte celular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-307.
2. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death: cytology of degeneration in the intersegmental muscles of silkworm. *J Insect Physiol* 1965; 11: 123-133.
3. Schwartz LM, Smith S, Jones MEE, Osborne BA. Do all programmed cell death occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 980-984.
4. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354.
5. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
6. Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 1999; 6: 497-507.
7. Sen S, D'Incalci M. Apoptosis: biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Lett* 1992; 307: 122-127.
8. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P et al. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997; 27: 1-20.
9. Scovassi I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosylation) and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 1999; 199: 125-137.
10. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
11. Cohen GM. ICE-like proteases (caspases): the executioners of apoptosis. *Biochemical J* 1997; 326: 1-16.
12. Núñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17: 3237-3245.
13. Salvesen GY, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 10964-10967.
14. Zhou Q, Salvesen GS. Activation of pro-caspase-9 by serine proteases includes a non-canonical specificity. *Biochem J* 1997; 324: 361-364.
15. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases -2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase -9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144: 281-292.
16. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem* 1997; 22: 199-306.
17. Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 2926-2930.
18. Chou JJ, Matsuo H, Duan H, Wagner G. Solution structure of the RIADD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell* 1998; 94: 171-180.
19. Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X et al. Pro-caspase-3 is a major physiological target of caspase-8. *J Biol Chem* 1998; 273: 27084-27090.
20. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413.
21. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Auto-activation of procaspase-9 by Apaf-1 mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998; 1: 949-957.
22. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-489.
23. Kroemer G, Dellaporta B, Resch-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-642.
24. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
25. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157.
26. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275: 1132-1136.
27. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase-9. *Cell* 1998; 94: 325-327.
28. Yoshida H, Kong Y-Y, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R et al. Apaf-1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 1998; 94: 739-750.
29. Hengartner MO. Death cycle and swiss army knives. *Nature* 1998; 391: 441-442.
30. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GH, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-304.



31. Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vauls DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4974-4978.
32. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1132-1136.
33. Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XI, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 5841-5845.
34. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Núñez G. Bcl-XI interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1 dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4386-4391.
35. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815.
36. Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94: 491-501.
37. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144: 891-901.
38. Stroh C, Schulze-Osthoff K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 1998; 5: 997-1000.
39. Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenaebelle P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1117-1124.
40. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 1997; 278: 1966-1968.
41. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathway. *EMBO J* 1998; 17: 1675-1687.
42. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 1999; 283: 543-546.
43. De Valck D, Jin DY, Heyninck K, Van de Craen M, Contreras R, Fiers W et al. The zinc finger protein A20 interacts with a novel antiapoptotic protein which is cleaved by specific caspases. *Oncogene* 1999; 18: 4182-4190.
44. Wang C, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappa B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP 1 and c-IAP 2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998; 281: 1680-1683.
45. Vercammen D, Vandenaebelle P, Beyaert R, Declercq W, Fiers W. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. *Cytokine* 1997; 9: 801-808.
46. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 482-491.
47. McEwen BS, Davis PG, Parsons B, Pfaff DW. The brain as a target for steroid hormone action. *Annu Rev Neurosci* 1979; 2: 65-112.
48. Ahlbom E, Grandison L, Zhivotovsky B, Ceccatelli S. Termination of lactation induces apoptosis and alters the expression of the Bcl-2 family members in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 1998; 139: 2465-2471.
49. Goluboff LG, Ezrin C. Effect of pregnancy on the somatotrophs and the prolactin cell of the human adenohypophysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1969; 29: 1533-1538.
50. García-Segura LM, Cardona-Gómez P, Naftolin F, Chowen JA. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroendocrinology* 1998; 9: 593-597.
51. García-Segura LM, Cardona-Gómez GP, Chowen JA, Azcoitia I. Insulin-like growth factor-I receptor and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J Neurocytol* 2000; 29: 425-437.
52. Cheng HL, Feldman EL. Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by Insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* 1998; 273: 14560-14565.
53. Cheng N, Dong L, Schachner M. Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J Neurobiol* 1999; 38: 428-439.
54. Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 733-736.
55. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000; 22: 423-430.
56. Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 225: 105-115.
57. Dirami G, Ravindranath N, Kleinman HK, Dym M. Evidence that basement membrane prevents apoptosis of Sertoli cells *in vitro* in the absence of known regulators of sertoli cell function. *Endocrinology* 1995; 136: 4439-4447.
58. Sinowatz F, Amselgruber W, Plendl J, Kolle S, Neumuller C, Boos G. Effects of hormones on the prostate in adult and aging men and animals. *Microsc Res Tech* 1995; 30: 282-292.
59. Amsterdam A, Dantes A, Selvaraj N, Aharoni D. Apoptosis in steroidogenic cells: structure-function analysis. *Steroids* 1997; 62: 207-211.
60. Reynaud K, Driancourt MA. Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 1001-108.
61. Westfall SD, Hendry IR, Obholz KL, Rueda BR, Davis JS. Putative role of the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway in the survival of granulosa cells. *Endocrine* 2000; 12: 315-321.
62. Tomei LD, Cope FO, editores. *Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease*. Current Communications in Cell and Molecular Biology 8. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
63. Atwood CS, Ikeda M, Vonderhaar BK. Involvement of mouse mammary glands in whole organ culture: a model for studying programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207: 860-867.
64. Slayden OD, Hirst JJ, Brenner RM. Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogesterone treatment. *Endocrinology* 1993; 132: 1845-1856.
65. Akkali KC, Khan SA, Moulton BC. Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology* 1996; 137: 3123-3131.
66. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islet differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50: 521-533.
67. Mandrup-Poulsen T.  $\beta$ -Cell Apoptosis. *Diabetes* 2001; 50: S58-S63.
68. Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Aabenhus Andersen N, Serup P, Dragsbaek Madsen O et al. The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2000; 49: 1468-1476.
69. Gurlo T, Kawamura K, Von Grafenstein H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8<sup>+</sup> T cells. Involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J Immunol* 1999; 163: 5770-5780.
70. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 1005-1029.
71. Cailleau C, Dju-Hercend A, Ruuth E, Westwood R, Carnaud C. Treatment with neutralizing antibodies specific for IL-1 beta prevents cyclophosphamide-induced diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 1997; 46: 937-940.
72. Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C et al. High glucose Causes apoptosis in cultured human pancreas islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 2001; 50: 1290-1301.
73. Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. Protection against lipoprotein-induced apoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9558-9561.
74. Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S et al. Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells: a process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* 1998; 273: 33501-33507.
75. Saafi EL, Konarkowska B, Zhang S, Kistler J, Cooper GJ. Ultrastructural evidence that apoptosis is the mechanism by which human amylin evokes death in RINm5F pancreatic islet beta-cells. *Cell Biol Int* 2001; 25: 339-350.
76. Andrikoula M, Tsatsoulis A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 561-568.
77. Mitsiades N, Poulaki V, Mastorakos G, Tselenis-Balafouta S, Kotoula V, Koutras DA. Fas ligand expression in thyroid carcinomas: a potential mechanism of immune evasion. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2924-2932.
78. Feldkamp J, Pascher E, Perniok A, Scherbaum VA. Fas-mediated apoptosis is inhibited by TSH and iodine in moderate concentrations in primary human thyrocytes in vitro. *Horm Metab Res* 1999; 31: 355-358.