

Experiencias celulares cercanas a la muerte, ¿qué es la anastasis?

Resumen

La apoptosis es una forma de muerte celular programada llevada a cabo por enzimas proteolíticas llamadas caspasas. La actividad de estas enzimas hacen que las células se contraigan, formen vesículas y se desintegren en cuerpos apoptóticos, lo que ha sido considerado como un punto sin retorno para las células apoptóticas. Sin embargo, un trabajo relativamente reciente ha demostrado que las células pueden sobrevivir a estímulos apoptóticos transitorios, incluso después de la activación de las caspasas. Este proceso se llama anastasis. En esta sección de preguntas y respuestas, respondemos a preguntas comunes que surgen con respecto a la anastasis, su definición, el origen del término, las posibles consecuencias fisiológicas, los mecanismos moleculares implicados y las preguntas que plantea este nuevo campo de estudio.

¿Qué es la anastasis?

La anastasis es la recuperación de células que estuvieron al borde de la muerte apoptótica. La anastasis, término utilizado por primera vez en 2012, es un proceso mediante el cual las células sobreviven a la activación de las caspasas después de la exposición transitoria a una dosis letal de algún estímulo apoptótico.

En un estudio previo, aplicamos toxinas a células de mamíferos para inducir la apoptosis y esperamos hasta que mostraron signos típicos de apoptosis (activación de la caspasa 3, el encogimiento celular y la formación de vesículas). Si dejábamos a las células en presencia de la toxinas, la gran mayoría morían. Sin embargo, si removíamos el estrés químico y reemplazábamos el medio de crecimiento la mayoría de las células recuperaban una morfología relativamente normal (Figura de portada y 1). Esta recuperación se llama anastasis, que es una palabra griega que significa "levantarse a la vida". La palabra apoptosis también deriva de raíces griegas y significa "caer a la muerte", tal como las hojas de los árboles y los pétalos de la

Traducción y adaptación
Pablo Adrián Otero

Este artículo es una traducción y adaptación del artículo:
Q&A: Cellular near death experiences—what is anastasis?.
Author: Gongping Sun and Denise J. Montell. Publicado en BMC Biology (2017) 15:92.

Figura de portada: una célula (izquierda) expuesta a un factor apoptótico muestra cambios en su morfología (centro) y luego se recupera al ser removido el factor estresante. Collage armado a partir de foto de Hogan Tang of the Denise Montell Lab, Johns Hopkins University School of Medicine.

Pablo A. Otero es biólogo (FCEN:UBA) y docente de biología.

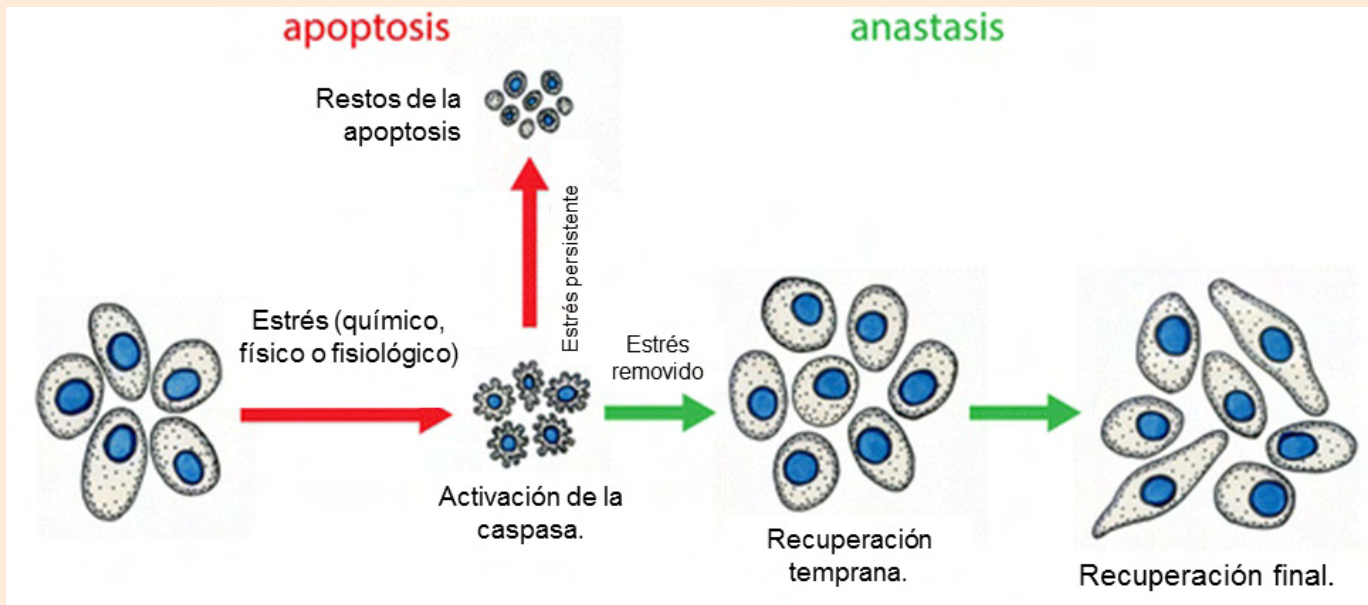


Figura 1: Apoptosis y anastasis. Cuando las células experimentan una dosis potencialmente letal de estrés químico, activan simultáneamente una respuesta de supervivencia al estrés e inician el proceso apoptótico, activando la caspasa 3. Se preparan para la recuperación sintetizando algunos ARNm que codifican proteínas de supervivencia. Si el estrés persiste, el proceso apoptótico domina y las células se disocian en cuerpos apoptóticos. Si se alivia el estrés, las células experimentan una recuperación en dos etapas. La recuperación temprana implica el inicio de la transcripción y el reingreso al ciclo celular. La recuperación tardía implica la reorganización del citoesqueleto y la migración celular. Adaptado de [9].

flores [2].

¿Es la anastasis realmente un nuevo descubrimiento?

El descubrimiento de la anastasis muestra que la activación de las caspasas no es "un punto de no retorno" en la apoptosis, lo cual sí es un concepto nuevo. La apoptosis es un proceso de suicidio celular que produce una serie de cambios morfológicos que resultan en la fragmentación celular en cuerpos apoptóticos y su posterior eliminación por fagocitosis [2]. Después de décadas de investigaciones los mecanismos moleculares centrales que regulan la apoptosis están bien establecidos. Si bien son variados los estímulos que pueden iniciar este proceso, en última instancia todos ellos activan las enzimas caspasas. En células HeLa tratadas con inductores de apoptosis la actividad de las caspasas alcanza su máximo nivel a los 20 minutos posteriores al inicio de la activación [4,5,6]. Las caspasas activadas producen proteólisis irreversible de numerosos objetivos, lo que conduce al desmantelamiento de la célula [7]. Es por esto que la visión clásica era que, después de la activación de las caspasas, la muerte es inevitable.

Sin embargo, se pueden encontrar indicios de anastasis en la literatura científica. Por ejemplo, un estudio en *Caenorhabditis elegans* mostró que células que normalmente estaban destinadas a morir por apoptosis, pudieron vivir y diferenciarse en neuronas en animales con mutaciones en genes implicados en la fagocitosis [8]. Estas células, presumiblemente, se habrían recuperado de la activación de las caspasas, aunque esto no se ha demostrado directamente. La fracción de células que se recuperan aumenta de 3% a > 50%

Las Caspasas

Las caspasas (cisteinil-aspartato proteasas) son una familia de enzimas cistein-proteasas. Se llaman así dado que poseen un residuo de cisteína necesario para su actividad proteasa que ocurre a nivel de un residuo aspartato de la proteína sustrato.

Estas enzimas cumplen un rol fundamental en la apoptosis y procesos morfogenéticos del desarrollo embrionario. En el caso de enfermedades autoinmunes, Alzheimer y el desarrollo de algunos tumores están involucrados fallos en los procesos mediados por caspasas.

La caspase 3 es una enzima de esta amplia familia que cumple un rol fundamental en etapa final (desencadena la muerte) del proceso de apoptosis. En la célula la caspasa 3 se encuentra como una pro-enzima que luego de ser activada conforma un dímero que es la enzima activa).

cuando está mutado un alelo del gen que codifica la caspasa en esos mismos animales con fagocitosis defectuosa, lo que muestra que este proceso es sensible a los niveles de caspasa y sugiere que existe un nivel mínimo necesario de expresión para completar la apoptosis.

¿Qué tipo de estímulos apoptóticos permiten la anastasis?

Se ha observado recuperación de la activación de la caspasa después de la exposición a múltiples tipos de estímulos: inductores químicos de la apoptosis como etanol, DMSO, estaurosporina, jasplakinolida y cucurbitacina [1, 9]; el ligando inductor de muerte TNF [9];

inductores físicos tales como choque frío [10] y estrés fisiológico. Se necesitan más estudios para descubrir la diversidad de inductores apoptóticos a partir de los cuales las células pueden recuperarse.

¿Qué tipo de células pueden sufrir anastasis?

In vitro, se ha observado anastasis en múltiples líneas celulares cancerosas, incluida la línea celular de cáncer cervical HeLa y la línea celular de glioma H4. También se ha observado anastasis en líneas celulares inmortalizadas no cancerosas como NIH3T3 y en células primarias aisladas de hígado y corazón [1,9,11]. In vivo, existe evidencia de anastasis en tejidos epiteliales en *Drosophila*, miocitos y neuronas cardíacas de mamíferos y células neuronales de *C. elegans*. A pesar del hecho de que la anastasis se ha descubierto recientemente, la variedad de tipos de células y animales en los que se ha observado sugiere que puede ser un proceso general para muchos y tal vez para todos los tipos de células.

¿Cuándo y dónde ocurre la anastasis in vivo?

Para determinar dónde y cuándo las células in vivo sobreviven a la activación de caspasa, desarrollamos un sensor codificado genéticamente en *Drosophila* que convierte la activación transitoria de esta enzima en la expresión permanente de una proteína fluorescente. Por lo tanto, todas las células que sobreviven a la activación de la caspasa, así como su progenie, están etiquetadas y se pueden rastrear. Empleando esta herramienta, encontramos que muchas células sobreviven a la activación durante el desarrollo larvario y pupal, así como en el adulto, en ausencia de estrés externo [12]. En cambio, pocas o ninguna de las células del embrión sobreviven a la activación de esta proteasa, lo que sugiere que la capacidad de sufrir anastasis cambia durante el desarrollo.

Varios ejemplos publicados también pueden cumplir con la definición de anastasis in vivo, por ejemplo, los miocitos cardíacos en ratones y conejos expuestos a isquemia transitoria [13]. Las neuronas del ratón que sobreexpresan la proteína Tau sobreviven a la activación de la caspasa-3, aunque no está claro si en este caso se inició la apoptosis [14]. El descubrimiento de la anastasis en mamíferos y moscas sugiere que se trata de un proceso celular antiguo y evolutivamente conservado.

¿Qué es la anastasis del desarrollo?

En *Drosophila*, nos sorprendió encontrar células que sobreviven a la activación de la caspasa-3 en los discos imaginales larvales y los lóbulos ópticos del cerebro larvario, donde las caspasas son prescindibles para el desarrollo del tejido. En dichos tejidos, donde la supervivencia celular luego de la activación ocurrió esporádicamente

(tanto en el espacio como en el tiempo), proponemos que las células se han sometido a "anastasis del desarrollo" [12]. Dado que se observa principalmente en tejidos con rápida proliferación, suponemos que en estos tejidos algunas células pueden experimentar al azar situaciones estresantes, como la escasez de factores de crecimiento o la compresión mecánica, lo que lleva a la activación de la caspasa. Algunas de estas células mueren, pero otras sobreviven a través de la anastasis. De acuerdo con esta interpretación, el hacinamiento de células causa la activación de la caspasa durante el desarrollo en *Drosophila*. Muchas de las células positivas para caspasa mueren por apoptosis, mientras que otras muestran una activación transitoria y aún así sobreviven [15]. Este parece ser un ejemplo particularmente claro de lo que puede ser un fenómeno general. Es decir, durante el desarrollo, las células compiten entre sí por recursos que incluyen espacio, nutrientes y factores de crecimiento. Las células que carecen de recursos suficientes inician la vía apoptótica. Sin embargo, la muerte de algunas células en realidad puede aliviar el estrés en las otras, liberando recursos y permitiendo que se recuperen.

¿Cuál es la diferencia entre anastasis y la activación de caspasa no apoptótica?

Sabemos desde hace algún tiempo que algunas células activan las caspasas como parte de un desarrollo normal y sin que esto produzca la muerte celular (revisado recientemente en [16]). En algunos casos, la actividad de estas enzimas se localiza en compartimentos particulares y da como resultado una destrucción celular parcial. Ejemplos de esto ocurren en la maduración de los espermatozoides, la remodelación de dendritas y la destrucción nuclear en las células del cristalino y en los glóbulos rojos. Lo que estos ejemplos tienen en común con la anastasis es la activación subletal de las caspasas y la posterior supervivencia de la célula. Lo que difiere es que estas células nunca estuvieron en riesgo de morir. En la anastasis, las células experimentan un estrés (que de persistir es capaz de matarlas, mientras que en las células en las que la actividad de la caspasa desempeña una función normal, el nivel de actividad y/o la localización están restringidos para evitar la muerte, aún no comprendemos del todo los mecanismos que restringen la actividad de la caspasa.

Una característica común de la activación de caspasa no apoptótica es que ocurre en una etapa específica del desarrollo y en cada célula del mismo tipo en el tejido. En contraste, la anastasis del desarrollo ocurre en una fracción aleatoria de células, esporádicamente a lo largo del tiempo, en tejidos con apoptosis esporádica [12].

¿Es la anastasis simplemente la detención del proceso apoptótico?

No, el perfil del transcriptoma de las células HeLa expuestas a etanol demostró que la anastasis es un proceso activo compuesto de dos etapas distinguibles. La primera etapa implica la transcripción de muchos factores de transcripción, reingreso al ciclo celular y proliferación. Mientras que en la etapa tardía sufren un reordenamiento del citoesqueleto y un cambio morfológico y se vuelven más migratorias [9].

¿Existen otros ejemplos de células que sobreviven a la actividad de la caspasa 3?

En 2015, Liu y colaboradores informaron de células expuestas a irradiación pudieron sobrevivir con la caspasa 3 activada. El mismo grupo informó que algunas células pueden escapar de la muerte celular inducida por la sobreexpresión de Myc a pesar de que la caspasa 3 estaba activada [18]. En estos estudios demostraron que aunque se activó esta proteasa no hubo otros signos de apoptosis, por lo que no está claro si siquiera se inició el proceso apoptótico. Por el contrario, en experimentos diseñados para detectar anastasis, observamos signos de apoptosis como contracción celular, formación de vesículas en la membrana en la mayoría de las células tratadas con el inductor apoptótico y una posterior recuperación [1,9]. Aunque la mayoría del trabajo en el campo de la apoptosis sugiere que la activación de caspasa es un evento de todo o nada [5,6,7], otros trabajos sugieren que existen diferentes umbrales para el nivel letal de la actividad de la caspasa 3 [20].

¿Es la anastasis el único ejemplo de un proceso reversible de muerte celular?

No. Las células pueden recuperarse de una variedad de experiencias cercanas a la muerte. Recientemente se descubrió un proceso llamado resucitación, que se refiere a la recuperación de una muerte en proceso de necroptosis [21]. Incluso la dramática forma de muerte celular conocida como entosis, en la que una célula se traga otra viva, resulta ser reversible [22]: la célula internalizada puede emerger para vivir nuevamente.

¿La anastasis produce algún cambio permanente en las células?

En nuestro estudio anterior, encontramos una pequeña fracción de las células que sobrevivieron a la activación de la caspasa (después de la exponerlas a una dosis letal de etanol) las cuales mostraron aberraciones cromosómicas y transformaciones oncogénicas [1]. Sin embargo, no se sabe si la mayoría de las células que han sufrido anastasis conservan

alguna marca genética o epigenética de su experiencia cercana a la muerte.

¿Por qué podrían las células haber evolucionado la capacidad de sufrir anastasis?

El descubrimiento de la anastasis revela una nueva estrategia de supervivencia tanto en células normales como en células cancerosas. La apoptosis parece haber evolucionado como un mecanismo para eliminar células que son potencialmente dañinas (como las células T autorreactivas o las células con daño en el ADN). ¿Cuál es el beneficio de rescatar células del borde de la apoptosis cuando se corre el riesgo de estar preservando células dañadas? Una hipótesis de trabajo es que la anastasis evolucionó para limitar el daño tisular permanente que de lo contrario se produciría en respuesta a una lesión grave pero transitoria, la exposición a la radiación o el estrés químico.

¿Cuáles son las posibles implicaciones de la anastasis para el cáncer?

La radiación y muchos de los medicamentos de quimioterapia inducen la apoptosis (revisada en [23,24]) y se administran de forma transitoria debido a su toxicidad. Por lo tanto, si las células tumorales cooperan con el proceso de recuperación y, por lo tanto, escapan de la muerte celular inducida por la terapia, la anastasis podría ser la base de la recaída después del tratamiento. Se ha observado anastasis en líneas celulares cancerosas [1,9], y una fracción de las células cancerosas de cuello uterino, que han sufrido este proceso, muestran cambios en la morfología celular y se vuelven más migratorias [9]. Por lo tanto, al promover la supervivencia y la migración, la anastasis en las células tumorales podría contribuir a la metástasis. Por lo tanto, estudiar los mecanismos subyacentes de este proceso y encontrar métodos para mejorarla o inhibirla puede proporcionar nuevas estrategias de tratamiento para el cáncer.

¿Cuáles son las direcciones futuras para la investigación de la anastasis?

Hay muchas preguntas abiertas. ¿Cuáles son los eventos más tempranos en el proceso que permiten que las células se recuperen? ¿Hay cambios epigenéticos permanentes en las células que han sufrido anastasis? ¿Estas células son más o menos resistentes a las tensiones futuras? ¿Cuál es el verdadero punto de no retorno durante la apoptosis? ¿Podemos identificar potenciadores biológicos o inhibidores de la anastasis para usar en el tratamiento de ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares, cáncer y neurodegeneración? ¿Existe un mecanismo central y conservado en todos los tipos de células? Estas y muchas otras preguntas son objeto de investigaciones en curso y futuras en este nuevo y emocionante campo de estudio.

Referencias Bibliográficas

Nota: la bibliografía de la sección «Traducciones» es citada y reproducida tal cual figura en el artículo original.

- 1- Tang HL, Tang HM, Mak KH, Hu S, Wang SS, Wong KM, et al. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Mol Biol Cell.* 2012;23:2240–52. doi:10.1091/mbc.E11-11-0926.
- 2- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239–57.
- 3- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495–516. doi:10.1080/01926230701320337.
- 4- Rehm M, Dussmann H, Janicke RU, Tavaré JM, Kogel D, Prehn JHM. Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *J Biol Chem.* 2002;277:24506–14. doi:10.1074/jbc.M110789200.
- 5- Tyas L, Brophy VA, Pope A, Rivett AJ, Tavaré JM. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep.* 2000;1:266–70. doi:10.1093/embo-reports/kvd050.
- 6- Albeck JG, Burke JM, Aldridge BB, Zhang M, Lauffenburger DA, Sorger PK. Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells. *Mol Cell.* 2008;30:11–25. doi:10.1016/j.molcel.2008.02.012.
- 7- Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017;24:1380–9. doi:10.1038/cdd.2017.44.
- 8- Reddien PW, Cameron S, Horvitz HR. Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature.* 2001;412:198–202. doi:10.1038/35084096.
- 9- Sun G, Guzman E, Balasanyan V, Conner CM, Wong K, Zhou HR, et al. A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death. *J Cell Biol.* 2017. doi:10.1083/jcb.201706134.
- 10 -Tang HL, Tang HM, Fung MC, Hardwick JM. In vivo CaspaseTracker biosensor system for detecting anastasis and non-apoptotic caspase activity. *Sci Rep.* 2015;5:9015. doi:10.1038/srep09015.
- 11- Tang H, Tang H, Montell D. Stress induced mutagenesis, genetic diversification, and cell survival via anastasis, the reversal of late stage apoptosis. In: *Stress-induced mutagenesis.* New York, NY: Springer; 2013. p. 223–41. doi:10.1007/978-1-4614-6280-4_11.
- 12- Ding AX, Sun G, Argaw YG, Wong JO, Easwaran S, Montell DJ. CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development in vivo. *Elife.* 2016;5, e10936. doi:10.7554/eLife.10936.
- 13- Kenis H, Zandbergen HR, Hofstra L, Petrov AD, Dumont EA, Blankenberg FD, et al. Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging. *J Nucl Med.* 2010;51:259–67. doi:10.2967/jnumed.109.068429.
- 14- de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spires-Jones TL, et al. Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature.* 2010;464:1201–4. doi:10.1038/nature08890.
- 15- Levayer R, Dupont C, Moreno E. Tissue crowding induces caspase-dependent competition for space. *Curr Biol.* 2016;26:670–7. doi:10.1016/j.cub.2015.12.072.
- 16- Nakajima Y-I, Kuranaga E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death Differ.* 2017;24:1422–30. doi:10.1038/cdd.2017.36.
- 17- Liu X, He Y, Li F, Huang Q, Kato TA, Hall RP, et al. Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis. *Mol Cell.* 2015;58:284–96. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.003.
- 18- Cartwright IM, Liu X, Zhou M, Li F, Li C-Y. Essential roles of Caspase-3 in facilitating Myc-induced genetic instability and carcinogenesis. *Elife.* 2017;6, e26371. doi:10.7554/eLife.26371.
- 19- Ichim G, Lopez J, Ahmed SU, Muthalagu N, Giampazolias E, Delgado ME, et al. Limited mitochondrial permeabilization causes DNA damage and genomic instability in the absence of cell death. *Mol Cell.* 2015;57:860–72. doi:10.1016/j.molcel.2015.01.018.
- 20- Florentin A, Arama E. Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell. *J Cell Biol.* 2012;196:513–27. doi:10.1083/jcb.201107133.
- 21- Gong Y-N, Guy C, Olauson H, Becker JU, Yang M, Fitzgerald P, et al. ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell.* 2017;169:286–300.e16. doi:10.1016/j.cell.2017.03.020.
- 22- Overholtzer M, Brugge JS. The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:796–809. doi:10.1038/nrm2504.
- 23- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* 2000;256:42–9. doi:10.1006/excr.2000.4838.
- 24- Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012;9:193–9. doi:10.7150/ijms.3635.