

## EL SUICIDIO Y LA MUERTE CELULAR

M<sup>a</sup> ANTONIA LIZARBE IRACHETA \*

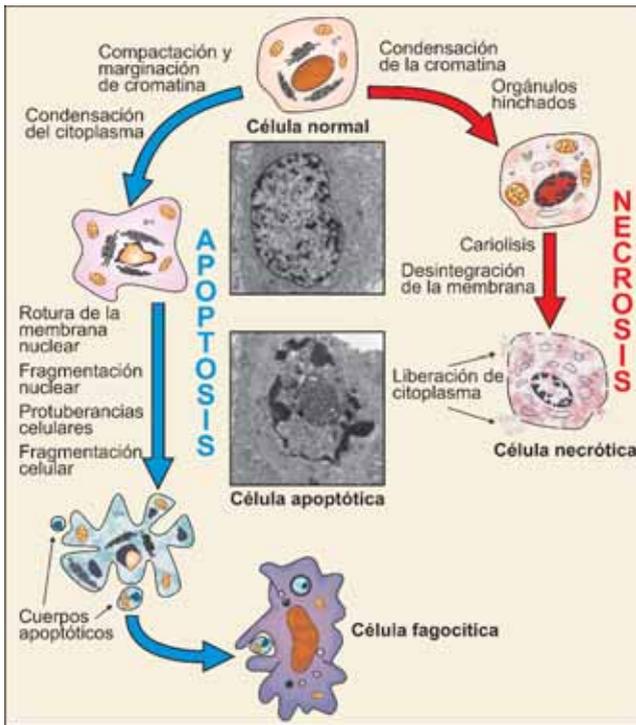
\* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (A. Correspondiente). Departamento de Bioquímica, Facultad de Químicas, Universidad Complutense. lizarbe@bbm1.ucm.es.

Las células de un organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. Hay células cuyo período de vida es largo, como las musculares o las neuronas, mientras que la vida de otras es efímera, como algunas células sanguíneas y epiteliales, que se renuevan a partir de sus células progenitoras. El número de células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se sustituyen por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. Se calcula que el cuerpo humano produce y erradica cada día miles de millones de células. El recambio celular en los tejidos de un organismo se fundamenta en el mantenimiento de un equilibrio (homeostasis) entre proliferación y muerte celular a fin de garantizar la población adecuada en cada momento.

El estado normal o fisiológico de un organismo se consigue con respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno y responder adecuadamente a estímulos. Para ello, una variedad de sistemas y procesos están implicados en el mantenimiento de la integridad celular, desde la membrana celular (procesos de endocitosis y exocitosis), a cambios metabólicos y de expresión génica, o a los mecanismos de defensa y a los sistemas de reparación. Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bio-

químicos irreversibles impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes. La muerte celular, según criterios clásicos se puede dividir en una muerte que transcurre por mecanismos regulados, como la apoptosis, y la no regulada (necrosis) [1].

La muerte celular se puede producir por **necrosis**, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental. La necrosis (del griego *nekrós* “muerte”) es la muerte patológica de las células o tejidos del organismo. Se origina por una lesión aguda, irreversible, derivada de una situación no fisiológica o condición patológica y que no puede ser reparada por mecanismos de adaptación y de resistencia. Ésta se produce debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas, como un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias químicas o tóxicos o, por ejemplo, por una infección o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Esta forma de muerte celular se califica como un proceso violento ya que las células se hinchan, se deterioran las estructuras celulares, y se paralizan funciones críticas para la vida. La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al



**Figura 1.** Esquema comparativo de las características morfológicas de la muerte celular por apoptosis y por necrosis. Los diagramas muestran los cambios morfológicos que se observan en las células apoptóticas y en las necróticas. En las micrografías obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica se compara el núcleo de una célula normal (parte superior) con el de una célula en la que se ha iniciado el proceso de apoptosis (parte inferior).

exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra. La liberación del contenido celular puede provocar a su vez reacciones inflamatorias. Los cambios morfológicos que se observan en una célula necrótica se recogen en la Figura 1.

Otros tipos de muerte celular conllevan la activación de mecanismos específicos que dictan que se produzca un **suicidio** o **muerte celular programada**: una serie de eventos que culminan en la muerte de la célula de forma genéticamente regulada. Estos mecanismos fisiológicos de muerte son empleados por los organismos multicelulares durante el desarrollo, la morfogénesis y en el mantenimiento de la homeostasis tisular en el organismo adulto, así como para controlar el número de células y eliminar células infectadas, mutadas o dañadas [1, 2]. Este tipo de muerte celular se realiza de una forma ordenada y silenciosa, y confiere ventajas al conjunto del organismo durante su

ciclo vital. Para definir a este último proceso, y como sinónimo de muerte celular programada, se acuñó el término **apoptosis**, neologismo tomado del griego clásico (*apo*: “fuera de” o “separación” y *ptosis*: “caída”) [3]. La muerte por apoptosis es más limpia que la necrosis; se detectan cambios morfológicos particulares y la membrana celular, que no se destruye, engloba a los cuerpos apoptóticos o material celular (Figura 1). No se produce inflamación ya que las células fagocitarias reconocen, captan y eliminan los cuerpos apoptóticos. La apoptosis se puede definir como “*el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en la célula y que determinan su muerte de una forma regulada en respuesta a una serie de acontecimientos fisiológicos o patológicos*”. En este caso, una serie de estímulos o señales hacen que la célula decida su propia muerte; es lo que se ha calificado como la muerte que permite vivir. Este tipo de muerte se ha conservado a lo largo de la escala evolutiva entre organismos tan diversos como los nemátodos y los mamíferos [4,5]. El programa de autodestrucción es complejo y se requiere una precisa coordinación entre la activación y la ejecución de varios subprogramas de la maquinaria de muerte. Las características generales de la muerte celular por apoptosis y necrosis se recogen en la Tabla I.

Estos dos tipos de muerte celular programada no dan cuenta de otros mecanismos que hoy se conocen. Existen procesos intermedios que difícilmente pueden ser clasificados en uno u otro grupo ya que pueden compartir algunas de las características de la apoptosis y de la necrosis; en otros casos, los mecanismos de muerte no se ajustan a ninguno de estos dos. Además de la apoptosis, se han descrito otros tipos de muerte celular programada, que se consideran en el último epígrafe, que pueden solapar en alguna característica o ser mutuamente exclusivos [1]. La autofagia se encuentra entre ellos, y se ha clasificado como una de esas formas alternativas de muerte celular programada [6-10]. En la ejecución de la apoptosis, como comentaremos posteriormente, participan un grupo de proteasas, las caspasas, por lo que esta vía de muerte celular programada es dependiente de su actuación. En varios organismos, incluyendo vertebrados, en algunos casos la muerte fisiológica transcurre a través de mecanismos que son independientes de la participación de las caspasas. A modo de ejemplo, los queratinocitos pierden su núcleo como parte de un programa

TABLA I: Características generales de la muerte por apoptosis y necrosis

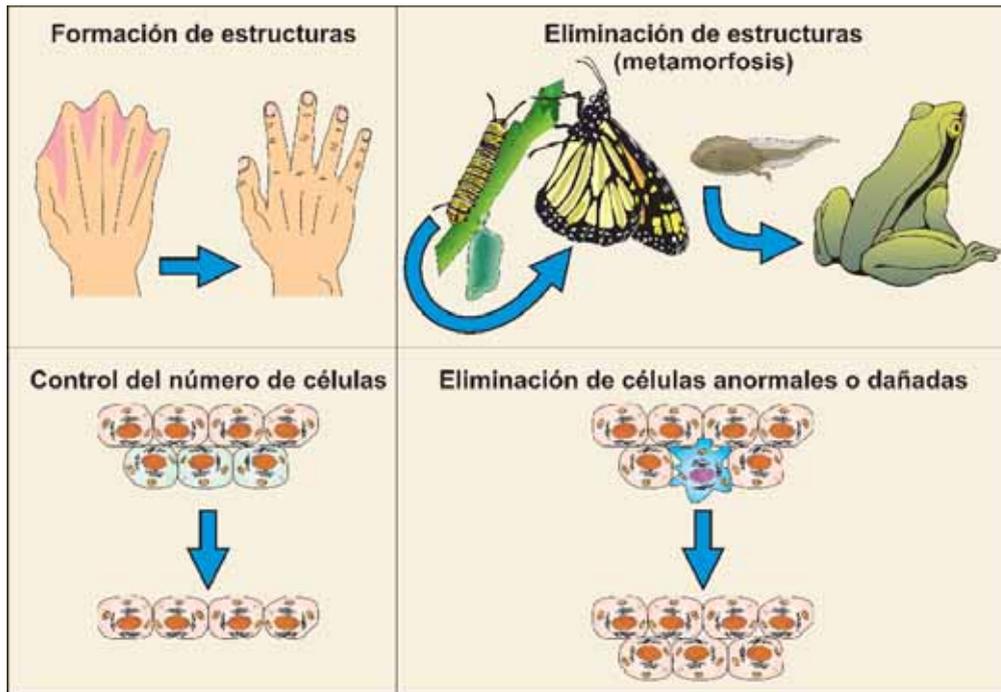
APOPTOSIS	NECROSIS
Muerte fisiológica. Proceso muy regulado y controlado.	Muerte no fisiológica; muerte accidental traumática. Proceso no regulado.
Se produce durante el desarrollo, mantiene la homeostasis tisular y elimina células dañadas.	No se produce durante el desarrollo
Inducida por estímulos intracelulares o extracelulares.	Inducida por un daño celular o tisular.
Proceso energéticamente activo y que requiere la biosíntesis de proteínas.	Proceso energéticamente pasivo.
Sigue un orden específico de eventos. Condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del DNA genómico. Mantenimiento estructural de orgánulos.	La célula se hincha, se lisan orgánulos subcelulares y se desintegra de forma desordenada.
Mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. El contenido celular queda englobado en los cuerpos apoptóticos. No se produce la liberación del contenido celular. No se produce inflamación.	La ruptura de la membrana conduce a la liberación del contenido celular al espacio extracelular; asociada con inflamación.
Participación activa de componentes celulares. Degradación mediada por caspasas.	Proceso pasivo.
Fagocitosis de cuerpos apoptóticos.	Lisis celular, y daño a las células vecinas.

normal de diferenciación y se desprenden de la piel, o los glóbulos rojos sobreviven 120 días después de la pérdida de su núcleo y, finalmente, son fagocitados [2].

## MUERTE CELULAR, DESARROLLO Y HOMEOSTASIS CELULAR

La muerte celular programada, como proceso de autodestrucción celular controlada, permite al organismo su correcta morfogénesis, así como la renovación y la eliminación de las células que amenacen su supervivencia. Organismos tan diferentes como los nemátodos y los humanos han conservado los genes que codifican para el núcleo de la maquinaria de la muerte celular [2, 4, 5]. En el desarrollo embrionario y fetal, y en algunos casos posteriormente, la apoptosis y la autofagia participan en la remodelación y eliminación de numerosas estructuras, en el control de la superproducción de células, en la eliminación de células defectuosas y en la formación de células diferenciales especiales (Figura 2) [7]. Todos estos procesos están regulados a través de una combinación de señales positivas y negativas que reciben las células.

En el desarrollo, a veces se forman estructuras que después es necesario eliminar, formaciones vestigiales que a lo largo de la evolución han perdido su utilidad, o aquellas que sólo se requieren en determinados estadios o puedan ser necesarias sólo para uno de dos sexos. Un ejemplo sencillo de la remodelación de distintas estructuras, que remarca las consecuencias del proceso de muerte celular y que pone de manifiesto que ésta es necesaria durante la ontogenia, es que los humanos tengamos cinco dedos individualizados en cada extremidad. La formación de los dedos se produce durante el desarrollo fetal por eliminación de las áreas interdigitales. Por el contrario, la muerte celular programada está reducida en las extremidades de los patos por lo que éstas mantienen su característica pata palmeada. La pérdida de estructuras, como la cola de los renacuajos durante la metamorfosis de los anfibios en respuesta al incremento en sangre de una hormona tiroidea, la pérdida de la cola de los embriones humanos en desarrollo, o la metamorfosis de insectos, son otros casos donde la importancia de la apoptosis queda patente. Entre otros ejemplos están los ductos de Müllerian, que forman el útero y los oviductos en las hembras de los mamíferos y que se eliminan por apoptosis en los machos; de



**Figura 2. Muerte celular en el desarrollo y homeostasis celular.** La muerte celular programada está implicada en numerosos procesos fisiológicos: remodelación de estructuras (como la formación de los dígitos de las extremidades), eliminación de estructuras que no se van a requerir en otro momento del desarrollo (metamorfosis de insectos y anfibios), control del número de células y eliminación de células anormales.

igual modo, en los machos la testosterona dirige la muerte de las células de las glándulas mamarias [7].

Un ejemplo reseñable en relación con la muerte celular, y sobre el que recayó un especial interés en el inicio del siglo XX, es el desarrollo del sistema nervioso. Durante el desarrollo se forman neuronas en exceso, controlándose la excesiva producción de las mismas con un reajuste de su número por muerte celular, lo que permite posteriormente un refinamiento de la inervación al morir aquellas neuronas menos capacitadas, las incapaces de establecer una conexión intersticial adecuada. Por otro lado, a la apoptosis se le ha asignado un papel en el control de eventos del sistema inmune, como la selección de linfocitos T y B, la muerte citotóxica de células diana o la inducción de apoptosis por citoquinas. Las células del sistema inmune tienen la capacidad de discriminar entre lo propio y lo extraño, de modo que reconocen a los agentes o moléculas ajenos a nuestro organismo y los eliminan. Aquellos clones de linfocitos que han desarrollado la capacidad para reconocer los tejidos propios se eliminan; se produce una selección negativa del repertorio de linfocitos que defienden al organismo

frente a todo aquello que es ajeno a él. En el timo las células autoreactivas se eliminan mediante apoptosis. Así, se establece la tolerancia que impide la respuesta frente a antígenos propios y, por tanto, no se desencadenan reacciones autoinmunes [11].

Dentro de los procesos de muerte celular programada también se incluyen otros tipos de muerte celular, como la asociada a la senescencia o envejecimiento. Este proceso se ha relacionado con una acumulación de daños en su material genético y se ha descrito una reducción de los telómeros del DNA celular a lo largo de la vida de las células. Esto se traduce en una pérdida de la estabilidad de la cromatina que ocasiona en último término la muerte de la célula [12]. También el proceso de diferenciación terminal es otro de los ejemplos. En diferentes tejidos, como el epitelio intestinal, las células proliferan y se diferencian; las células diferenciadas no proliferan, alcanzando un estado en el que la célula no responde a factores de crecimiento. La diferenciación terminal está finalmente asociada al proceso de apoptosis y extrusión de las células al lumen intestinal.

Las células defectuosas o anormales en las que se ha producido un daño en el DNA también se eliminan por apoptosis, siendo éstas sustituidas por nuevas células. Una señal que puede desencadenar la apoptosis de una célula es la pérdida de la adhesión a la matriz extracelular que la rodea. Este caso de apoptosis se conoce como “anoikis”.

La apoptosis también es un mecanismo de eliminación de células infectadas por virus, una defensa frente a la infección viral. Las células eucariotas han desarrollado varias rutas para minimizar el daño producido por una infección viral y eliminar al patógeno; la muerte celular es una de ellas. Sin embargo, algunos virus han desarrollado un programa de defensa frente a esta eliminación que les otorga la capacidad de controlar la supervivencia y muerte de la célula que infectan. En estos casos, para asegurarse una propagación eficiente, en el genoma viral se encuentran codificadas moléculas que inhiben la apoptosis. De esta forma, si la célula prolonga su vida, el virus dispone de más tiempo para multiplicarse. Además, se inhiben las capas y se evita la generación de citoquinas inflamatorias lo que influye en la respuesta inmune [13].

## CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA APOPTOSIS

Las primeras descripciones de la muerte celular programada se realizaron observando por microscopía los cambios morfológicos que se producían en las células y, posteriormente, las alteraciones a nivel ultraestructural se describieron por microscopía electrónica. Esta última técnica permite visualizar el hinchamiento celular, la formación de vesículas en la membrana celular, los cambios en el tamaño de las mitocondrias, la dilatación de retículo endoplásmico, el número de lisosomas o el estado de la cromatina. Sin embargo, dada la importancia de la apoptosis por su relación con ciertas patologías, las técnicas para evaluar este proceso han proliferado y evolucionado [14]. Así, hoy en día, a la identificación del tipo de muerte celular por métodos morfológicos se suman una serie de ensayos específicos que se pueden considerar como funcionales o bioquímicos, los cuales se comentarán posteriormente.

La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos que definen el proceso (Figura 1). La

adhesión celular y los contactos intercelulares disminuyen y se produce una pérdida de estructuras especializadas de la superficie celular (por ejemplo, los microvilli). En la membrana plasmática, que inicialmente se mantiene íntegra, se producen cambios en la distribución de los fosfolípidos y se forman protuberancias, proceso conocido como el burbujeo. El volumen celular disminuye y el citoplasma se condensa. El núcleo se reduce y la cromatina se compacta, adquiriendo una distribución marginal alrededor de la envoltura nuclear, con agregación de los poros nucleares y disolución focal de la lámina nuclear. Las proteínas del citoesqueleto se desensamblan y la función mitocondrial se reduce. Finalmente, la célula colapsa, produciéndose una escisión en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma y orgánulos rodeados de membrana plasmática. Todo este proceso ocurre sin liberación del contenido citoplasmático u orgánulos subcelulares al medio exterior ya que, a diferencia de la muerte celular por necrosis, no se produce rotura de la membrana plasmática. En el ámbito fisiológico, los cuerpos apoptóticos o picnóticos son retirados del espacio extracelular por células fagocitarias y, por tanto, no cursa ningún proceso de respuesta a daño celular o inflamación [15].

### *Eliminación de los cuerpos apoptóticos*

La muerte por apoptosis es efectiva si los restos celulares (los cuerpos apoptóticos) se eliminan a través de un proceso complejo y muy regulado. La limpieza de estos restos celulares se puede realizar por los macrófagos “profesionales” o por células vecinas, fagocitos “semi-profesionales” que manifiestan su primitivo potencial fagocitario [14]. En *C. elegans* se ha descrito la participación de los productos de varios genes (nuc-1, ced-1, -2, -5, -6, -7, -10 y -12) en el aclaramiento de las células apoptóticas y, al carecer de fagocitos especializados, esta función la realizan células vecinas [7, 16, 17]. Se ha propuesto que si la apoptosis se produce en tejidos con un índice bajo de apoptosis, la fagocitosis puede correr a cargo de células vecinas, pero en aquellos tejidos con una elevada tasa de apoptosis son las células fagocíticas, generalmente macrófagos, quienes realizan esta función.

¿Cómo se reconoce a los cuerpos apoptóticos para que se proceda a su eliminación? Las células fagoci-

tarias claramente reconocen y discriminan entre una célula apoptótica y una célula viable. La eliminación específica y efectiva se basa en la existencia de sistemas de reconocimiento (receptores) localizados en la membrana plasmática de los fagocitos y en las señales denominadas “cómeme” que portan las células apoptóticas, moléculas indicadoras de su estado [15]. En las primeras etapas de la apoptosis la célula que se ha preparado para morir libera una serie de factores o señales (“encuéntreme”) que facilitan el reclutamiento de fagocitos. Entre estas señales, para que se localice la célula apoptótica, se encuentra la lisofosfatidilcolina, lípido que se secreta, aunque se desconoce el tipo de receptor del fagocito que lo reconoce [18].

Un mecanismo de reconocimiento se fundamenta en uno de los eventos tempranos que se produce en la célula apoptótica, que sirve como marcador particular de los cuerpos apoptóticos, y que está relacionado con la asimetría de la membrana plasmática. La distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática, bicapa lipídica de composición y orientación precisa de fosfolípidos, es asimétrica, aunque existe un dinamismo o intercambio entre los fosfolípidos de ambas caras. En el mantenimiento de la asimetría están implicadas varias actividades enzimáticas. La externalización de la fosfatidilserina (fosfolípido normalmente confinado a la cara interna de la membrana plasmática) es el resultado de un balance, regulado por los niveles de calcio intracelulares, entre la actividad de la aminofosfolípido translocasa y la escramblasa. En las células apoptóticas se inhibe la aminofosfolípido translocasa y se activa la escramblasa produciéndose una pérdida de la asimetría de la membrana plasmática. Esto provoca la exposición en la cara externa de la membrana de moléculas de fosfatidilserina asociadas en forma de parches: una de las señales “cómeme”. La fosfatidilserina es reconocida por un receptor especializado del macrófago.

El reconocimiento de los cuerpos apoptóticos también se ha relacionado con otros cambios que se producen en las células apoptóticas. Uno de ellos afecta a los hidratos de carbono de proteínas y lípidos de la superficie celular. Se ha descrito la pérdida de residuos terminales de ácido siálico exponiéndose regiones normalmente enmascaradas que, en este caso, pueden ser reconocidas por las lectinas de la superficie de macrófagos. Además, hay otros elementos candidatos

a funcionar como señales; son sitios a los que pueden unirse moléculas del fluido extracelular (como el componente C1q del complemento o la trombospondina, entre otras moléculas) que, tras la unión posiblemente a la fosfatidilserina, marcarían a la célula apoptótica. Por último, en el fagocito, un repertorio de receptores reconocería el conjunto de señales. Además de las lectinas, algunas integrinas de las subfamilias  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_5$ , receptores de limpieza (*scavenger*), el receptor C1q y el receptor CD14, parecen estar implicados en el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos [15,18].

Cabe mencionar que Santiago Ramón y Cajal, en 1911 relata las reacciones degenerativas precoces de las células de Purkinje tras un traumatismo. Haciendo referencia a las células necrosadas indica: “*El traumatismo mortifica rápidamente las células de Purkinje próximas a la herida. A las doce horas de la operación faltan, a menudo, en los bordes de la lesión series de seis, ocho y más corpúsculos de este género. Y lo curioso es que no es dable reconocer ni aun sus reliquias. Un movimiento activo de autolisis y reabsorción parece haber consumido hasta los restos del protoplasma*” [19]. La lectura de este párrafo con una perspectiva actual relaciona la observación de Ramón y Cajal con la eliminación limpia de los restos de una célula apoptótica.

## APOPTOSIS: ALGUNOS ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los estudios sobre la muerte celular programada son recientes y es a mediados del siglo XX cuando principalmente se despierta la atención a este proceso. Se resuelven cuestiones clave que hacen que muchos grupos de investigación se interesen por este tema. En los antecedentes históricos también se incluyen hechos anteriores, como la observación en 1665 de Robert Hooke de que el corcho y otras materias vegetales están constituidos por pequeñas cavidades poliédricas o celdillas. Acuñó el término **célula**, aunque en realidad lo que observó eran los nichos de los cadáveres de las células que habían muerto fisiológicamente. En este contexto también se deberían señalar los estudios realizados en el siglo XIX por, entre otros, Johannes Evangelista Purkinje, Johannes Müller, o los de Theodor Schwann, Matthias Schleiden y Rudolf Virchow, que permitieron edificar durante la primera

TABLA II: La muerte celular programada, una historia reciente

SIGLO XIX	
1842	Carl Vogt, estudiando la evolución de la notocorda para el desarrollo del cartilago durante la metamorfosis de anfibios, observa que las células se "reabsorben", por lo que postula que debe existir una muerte celular fisiológica [20].
1864	August Weismann describe una muerte celular masiva en las pupas de los insectos. Introduce el término "histolisis" y define el aspecto citológico de las células que mueren [21].
1872	Ludwig Stieda observa la muerte de los condrocitos en la osificación endocondral; el cartilago se reemplaza por tejido óseo que forman los osteoblastos, que no derivan de condrocitos ya que las células del cartilago mueren [22].
1883	Elie Metschnikoff (Ilya Ilych Mechnikov), que junto a Paul Ehrlich recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 1908 en reconocimiento a sus trabajos en inmunidad, analiza la muerte celular por histolisis en los músculos durante la metamorfosis de anfibios, que es causada por la acumulación de fagocitos en músculos en regresión [23].
1885	Walther Flemming (creador de los términos cromatina y mitosis), trabajando con folículo ovárico de conejos, establece que la muerte celular (a la que llamó "cromatolisis") no se produce por una rotura mecánica sino que es un evento fisiológico [24].
1886	Franz Nissen, utilizando la solución de fijación de Flemming y la tinción nuclear con hematoxilina, documenta la cromatolisis en glándula mamaria lactante de perros, conejos y gatos [25].
1889	W. Felix analiza la muerte de miocitos y miofibras en músculos de mamíferos. Observa que la morfología de las fibras musculares inervadas es diferente de las que carecen de inervación que son las que mueren. Interpreta que la inervación proporciona una "energía para crecer" que favorece la supervivencia [26].
1889	John Beard observa la pérdida programada de una población de neuronas sensoriales en embriones de peces; las células se encogen, se hacen más vidriosas, perdiendo trozos del núcleo y nucleolo, y desaparecen [27].
1890	G. Arnheim describe la marginación de la cromatina [28].
SIGLO XX	
1906	R. Collin analiza la muerte de muchas neuronas motoras y sensoriales en embriones de pollos. Describe la morfología de las neuronas que mueren [29].
1910	Friedrich D. von Recklinghausen propone el término "oncosis" para la muerte celular que se produce por isquemia o agentes tóxicos, caracterizada por un hinchamiento y un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática [30].
1914	Ludwing Gräper concluye que la eliminación fisiológica de las células que ocurre por cromatolisis debe existir en todos los órganos en los que las células deben ser eliminadas. Apunta que los restos celulares se eliminan por células vecinas [31].
1934	Viktor Hamburger propone que "agentes" [uno de ellos se identificaría posteriormente como el NFG ( <i>Nerve Growth Factor</i> )] controlan el desarrollo de centros nerviosos de forma cuantitativa regulando el número de neuronas [32].
1949	Viktor Hamburger y Rita Levi-Montalcini, que junto a Stanley Cohen recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 1986 por el descubrimiento de factores de crecimiento, observaron que la muerte celular de las neuronas es un fenómeno que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, incluyendo el sistema nervioso central [33].
1951	Alfred Glücksmann revisa la muerte celular durante la ontogenia en vertebrados estableciendo que es un componente normal del desarrollo animal [34].

La muerte celular programada, una historia reciente	
1959	Christian de Duve, que junto a Albert Claude y George E. Palade recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 1974 por sus descubrimientos relacionados con la organización funcional y estructural de la células, propone que las células pueden morir desde dentro por estallido de los lisosomas que actuarían como bolsas suicidas [35].
1961	Ruth Bellairs determina las características ultraestructurales del proceso de muerte celular durante el desarrollo de embriones de pollo [36].
1965	Richard A. Lockshin y Carroll M. Williams introducen el concepto de <b>muerte celular programada</b> para describir la muerte celular que observan durante el proceso de la metamorfosis de insectos [37].
1966	John W. Saunders indica que durante la embriogénesis la muerte es “un suicidio, no un asesinato” [38].
1966	Jamshed R. Tata observa que inhibidores de la síntesis de RNA y de proteínas bloquean la muerte durante la metamorfosis de los anfibios, indicando que es un proceso activo [39].
1972	John F. Kerr, Andrew H. Wyllie y Alistair R. Currie acuñan el término <b>apoptosis</b> , para diferenciar esta muerte celular de la necrosis, como un fenómeno biológico con amplias implicaciones en las cinéticas tisulares [3].
1973	Jörn-Uwe Schweichel y Hans-Joachim Merker definen tres tipos de muerte celular fisiológica (heterofagia, autofagia y muerte no lisosomal) basándose en estudios morfológicos sobre el desarrollo de vertebrados [6].
1976	Miroslav Skalka, Jitka Matyášová y Milena Cejková describen la obtención de fragmentos regulares de DNA de la cromatina de tejidos irradiados [40].
1979	Emmanuel Farber y Murray M. Fisher identifican otro mecanismo de suicidio celular en células hepáticas inducido por la liberación intracelular de radicales libres [41].
1984	Andrew H. Wyllie y colaboradores analizan la ruptura de la cromatina en la apoptosis y la asocian con la condensación de la cromatina y la dependencia con la síntesis de macromoléculas [42].
El nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> y la muerte celular programada.	
1974	Sydney Brenner publica su primer artículo sobre el nuevo modelo experimental del nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> [43] y, con John E. Sulston, otro referente al DNA de dicho nemátodo [44]. A estos trabajos les siguen los relacionados con diferentes linajes celulares y mutantes. Se inician los estudios moleculares sobre el proceso de muerte celular programada durante el desarrollo de <i>C. elegans</i> .
1976	John E. Sulston describe el primer gen de muerte, <i>nuc-1</i> ( <i>nucleasa abnormal</i> ) que controla la actividad de una endonucleasa de DNA; los mutantes son defectuosos en la degradación de DNA en células que mueren [45].
1982	H. Robert Horvitz, Hilary M. Ellis y Paul W. Sternberg, en su trabajo sobre la muerte celular programada en el desarrollo del nemátodo, describen una ruta genética implicada en la muerte celular [46].
1983	Edward M. Hedgecock, John E. Sulston y J. Nichal Thomson establecen por primera vez mutantes de <i>C. Elegans</i> ( <i>ced-1</i> , <i>ced-2</i> ; <i>cell death abnormal</i> ) en los que el proceso de muerte celular está alterado. Estos genes son necesarios para la eliminación por fagocitosis de los cuerpos celulares que resultan de la muerte de las células [17].
1986	Hilary M. Ellis y H. Robert Horvitz describen los mutantes <i>ced-3</i> y <i>ced-4</i> , los primeros genes asesinos requeridos en la muerte celular programada. La reducción o pérdida de la función de éstos hace que cambie el destino de las células, las que normalmente mueren sobreviven [47].
1992	Michael O. Hengartner, Ron E. Ellis y H. Robert Horvitz identifican el gen <i>ced-9</i> cuyo producto tiene efectos opuestos a los de <i>ced-3</i> y <i>ced-4</i> . La función del gen <i>ced-9</i> es regular negativamente las actividades de los requeridos para la muerte celular programada. Mutaciones que activan a <i>ced-9</i> evitan la muerte celular y mutaciones que lo inactivan causan la muerte en células que normalmente viven, con resultados letales [48].

La muerte celular programada, una historia reciente	
1992	David L. Vaux, Irving L. Weissman y Stuart K. Kim muestran que la proteína humana Bcl-2 puede inhibir la muerte celular programada en <i>C. elegans</i> [4].
1993	Junying Yuan y colaboradores describen que el transcrito ced-3 es más abundante durante la embriogénesis, etapa durante la cual ocurre más muerte celular programada. La proteína CED-3 tiene similitudes con la proteína humana ICE ( <i>interleukin-1 beta-converting enzyme</i> ) [49].
1994	Michael O. Hengartner y H. Robert Horvitz publican la secuencia de la proteína CED-9 y su homología con la de Bcl-2; sugieren que los mecanismos moleculares de la muerte celular programada se han conservado desde los nemátodos a los mamíferos [5].
1998	Luis del Peso, Victor M. González y Gabriel Núñez describen la proteína reguladora EGL-1 que se une e inhibe a CED-9; el efecto protector de CED-9 se antagoniza por EGL-1. Ésta bloquea la interacción de CED-9 con CED-4 produciendo la activación de CED-3 [50].
2002	Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston reciben el premio Nobe de Fisiología y Medicina por sus descubrimientos sobre "la regulación genética del desarrollo de órganos y la muerte celular programada".

mitad de dicho siglo la teoría celular. La elaboración del concepto de muerte tiene raíces anteriores, desde Hipócrates (470-377 a. C), que relata la destrucción de los tejidos por gangrena, al siglo II en el que Galeno (129-201) empieza a elaborar el concepto de necrosis, y a R. Virchow que define dicho concepto en 1858. Éste último describe dos tipos de muerte celular, la necrobiosis (término ambiguo referente a la muerte natural opuesta a la muerte violenta o mortificación) y la necrosis (degeneración tisular, sinónimo de gangrena).

Un resumen sobre algunos estudios clave sobre el conocimiento de la muerte celular programada se recoge en la Tabla II [20-50] y se pueden ampliar en varias revisiones bibliográficas [51-54]. Dada la copiosidad de publicaciones, se ha seleccionado un número limitado de los hitos iniciales (siglo XIX) y algunos del siglo XX, sobre todo los centrados entre los años 1950 y finales de los años noventa. Como mención especial se presentan algunos de los trabajos realizados en *Caenorhabditis elegans* sobre la muerte celular programada, ya que éstos culminaron en la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina a Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston por sus descubrimientos sobre "la regulación genética del desarrollo de órganos y la muerte celular programada" (Figura 3).

Los primeros datos, el preludeo sobre la muerte de las células como un proceso fisiológico y crítico, se obtienen a mediados del siglo XIX de los estudios

sobre el desarrollo de los organismos. Uno de los trabajos pioneros es el realizado por Carl Vogt [20], interesado en la metamorfosis de anfibios; sustenta que la muerte de las células de la notocorda va seguida de la neoformación del cartílago por células nuevas. Aunque no utiliza el término muerte celular, si hace referencia a la "reabsorción", destrucción o desaparición de células. En esta época, en la que se analiza la regresión de los tejidos en la metamorfosis de anfibios e insectos, la utilización de los primeros y primitivos microscopios y microtomos, así como el desarrollo de métodos de fijación de tejidos y de diferentes tinciones histológicas, permite visualizar lo que sucede en

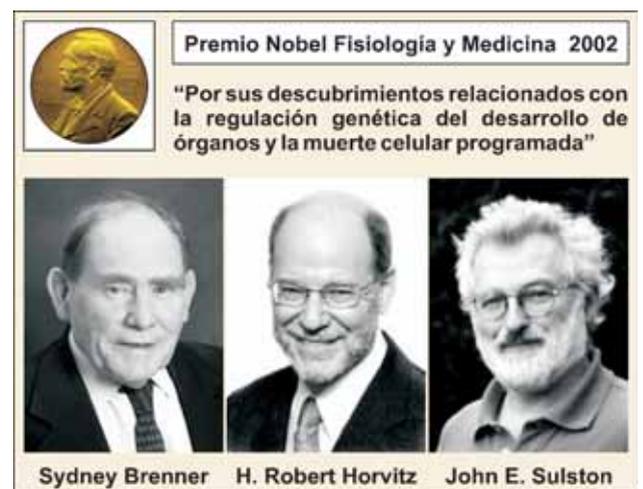


Figura 3. Galardonados con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2002.

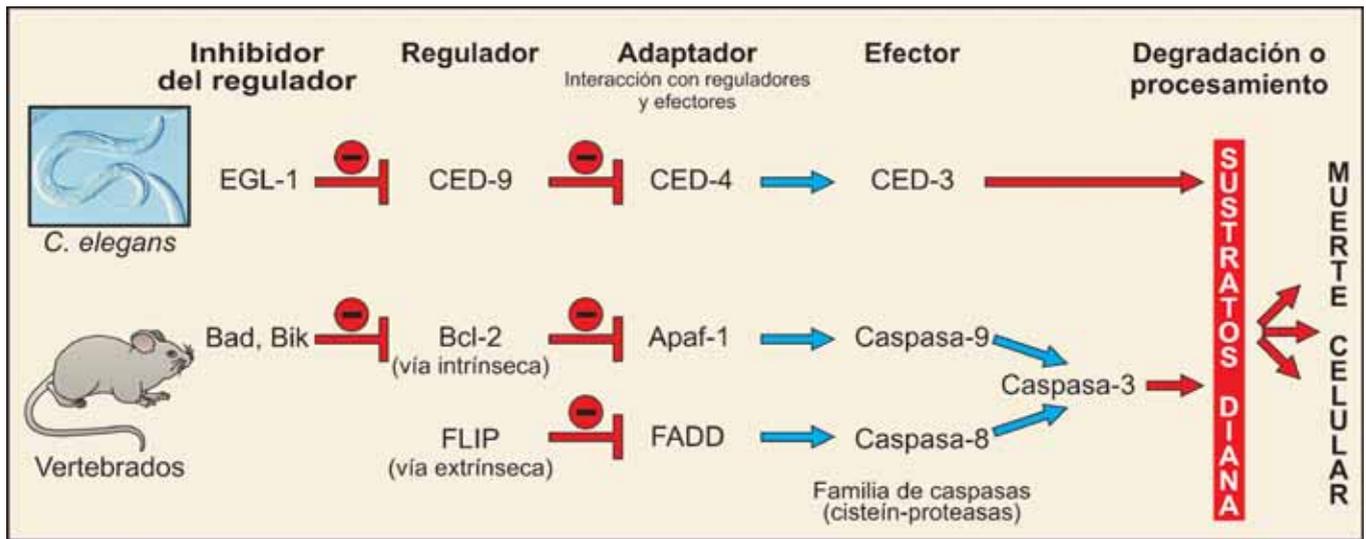
células individuales. De este modo, las descripciones detalladas de las células muertas realizadas por Walther Flemming [24] se obtienen de preparaciones realizadas con un fijador de su invención, muy utilizado posteriormente, que estaba compuesto por ácido acético, óxido de cromo y tetróxido de osmio. W. Flemming utiliza el término “cromatolisis” para hacer referencia a la muerte celular, proceso que coincidiría con lo que hoy se define como apoptosis.

En el siglo XX, además de varios trabajos puntuales previos, se puede destacar el realizado por Alfred Glücksmann [34] en relación con la ontogenia en vertebrados, estableciendo que la muerte celular es un componente normal del desarrollo animal. En 1964 se introduce el concepto de **muerte celular programada** por Richard A. Lockshin y Carroll Williams [37]. Éstos, en un tiempo en el que la investigación sobre el tema era escasa, describieron que durante el desarrollo de un organismo la muerte celular se produce en lugares y momentos determinados a través de una serie de eventos programados. John W. Saunders [38], un año después, en relación a la muerte en los sistemas embrionarios indica: “...una muerte celular abundante, a menudo con una fuerza cataclísmica, es parte del desarrollo temprano en muchos animales; es el método habitual para eliminar órganos y tejidos que son funcionales sólo durante la vida embrionaria o larvaria....” y concluye que durante la embriogénesis, la muerte es un “suicidio, no un asesinato”

El término **apoptosis**, del griego caída de las hojas de los árboles o los pétalos de las flores, se acuña en 1972 por John F. Kerr, Andrew H. Wyllie y Alistair R. Currie [3] para diferenciar la muerte que ocurre de forma natural o fisiológica durante el desarrollo de la muerte patológica por necrosis generada por un daño agudo. A partir de evidencias morfológicas obtenidas por microscopía electrónica de tejido hepático expuesto a toxinas y linfocitos tratados con hormonas, establecieron las diferencias entre dos tipos de muerte celular. También describen los cambios estructurales característicos de la apoptosis en las células que van a morir en tejidos particulares para mantener el balance entre proliferación celular y muerte. Proponen que la muerte por apoptosis responde a un programa de muerte intracelular que puede ser activado o inhibido por estímulos tanto fisiológicos como patológicos.

El primer componente descrito del mecanismo molecular de la muerte celular en mamíferos fue la proteína Bcl-2 [4], pero la primera evidencia de la existencia de un programa genético que subyace a la muerte celular fisiológica se obtuvo de los estudios realizados sobre el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* [46,47]. Los modelos experimentales seleccionados en diversas áreas de investigación son muy útiles si son aplicables o generalizables a otros sistemas y si proporcionan de forma rápida numerosa información. Una de las características que éstos deben tener es ser fácilmente propagados en el laboratorio y poder ser manipulados genéticamente para elucidar el papel de genes implicados en el proceso seleccionado para el estudio. Dentro de estos modelos se utilizan en muchos campos a las bacterias, entre otras razones, por su rápido crecimiento y variedad de mecanismos reguladores en respuesta a diferentes condiciones experimentales, el pequeño tamaño de su genoma y la facilidad para obtener mutantes. Las levaduras unicelulares tienen la ventaja adicional de que su organización celular es similar a la de la célula eucariota, con núcleo y orgánulos subcelulares y, por tanto, con funciones metabólicas y procesos compartimentalizados. Otros modelos experimentales, aunque más complejos, también han sido utilizados con éxito en numerosas áreas de investigación, como por ejemplo la planta *Arabidopsis thaliana*, la *Drosophila melanogaster* o mosca de la fruta, el pez cebra o los ratones, así como sistemas de propagación *in vitro* de numerosas líneas celulares.

El “gusano” *C. elegans* ha sido un excelente modelo experimental y, en relación a la apoptosis, hizo posible la identificación de los mecanismos que la regulan. Además, cabe resaltar la homología que existe no sólo entre los genes implicados en la apoptosis en *C. elegans* y en organismos superiores, sino también entre otros implicados en diversos procesos, lo que ha permitido extrapolar los datos obtenidos en el gusano a otros sistemas. *C. elegans* es un gusano transparente (lo que permite seguir el destino de cada célula individualmente) de aproximadamente 1mm de longitud, de piel lisa y cuerpo alargado, con un ciclo de vida de tres días y medio, del que fácilmente pueden obtenerse diferentes linajes y con un genoma compuesto por 17800 genes que se han secuenciado. Se mantiene y propaga en el laboratorio en placas de agar con bacterias, de las que se alimenta. Éste fue seleccionado



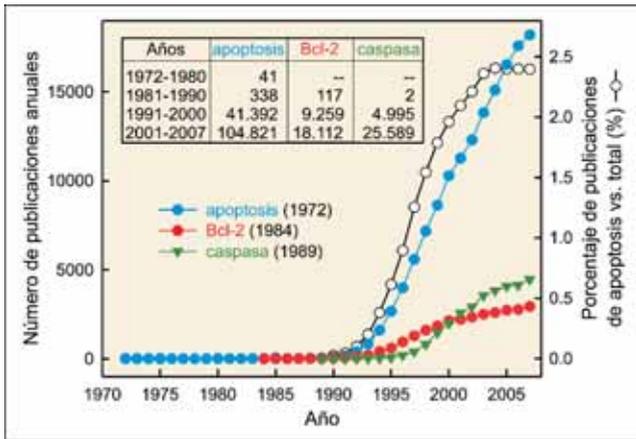
**Figura 4. Vía apoptótica de muerte celular programada en *C. elegans* y en vertebrados.** En la muerte celular programada, en la que los genes se conservan a lo largo de la evolución, se requieren: a) proteínas que regulan (estimulan o suprimen) la apoptosis, b) proteínas adaptadoras que interactúan con los reguladores y los efectores y c) las proteínas efectoras (cistein-proteasas) cuya activación conduce a la degradación de sustratos intracelulares provocando la muerte celular. Todas las proteínas descritas en *C. elegans* implicadas en la ejecución de la apoptosis tienen múltiples homólogos en mamíferos; algunos de ellos se muestran en la figura.

como un nuevo modelo experimental en los años 60 por Sydney Brenner para estudiar cómo los genes dirigen la división celular, la diferenciación y el desarrollo del sistema nervioso, estudios que condujeron al análisis del destino de las células. De hecho, la observación de que para generar un gusano adulto se producen, por sucesivas divisiones, siempre 1090 células, pero que el gusano adulto tiene 959 células, abrió las puertas a la investigación sobre la base genética de la muerte celular programada. Las 131 células producidas en exceso (12% del total de células) se eliminan durante su desarrollo de una forma controlada.

Hoy en día *C. elegans* continúa siendo un modelo experimental muy utilizado; desde los años 60 hasta ahora se han publicado más de 13.000 artículos científicos empleando este modelo. John E. Sulston se incorpora en 1969 al grupo de S. Brenner y se centra en el estudio del control de los linajes celulares y el suicidio celular, demostrando en los años 70 que *C. elegans* sigue unas pautas rígidas. En la misma línea, el conocimiento de las bases moleculares y genéticas del proceso de apoptosis se inicia en 1982 con los estudios del grupo de H. Robert Horvitz [46], que describen genes implicados en el control y ejecución de la apoptosis en *C. elegans* demostrando que básicamente son los mismos en todos los animales [55]. Una

recopilación de los estudios realizados están recogidos en el discurso de aceptación del Premio Nobel que H. R. Horvitz tituló “Gusanos, vida y muerte” (Diciembre, 2002).

En 1986, el grupo de H. R. Horvitz inicia el estudio de los genes que aparecían alterados en mutantes; a estos genes les denominaron *ced* (*cell death abnormal*). Se identificaron los genes *ced-3* y *ced-4*, que activaban el proceso de muerte celular, y el gen *ced-9*, que lo inhibía. Por tanto, estos genes son responsables de que una célula viva o muera y constituyen el complejo ejecutor (Figura 4). Si una célula expresa los tres genes sobrevive, pero si no expresa el gen inhibidor de la muerte *ced-9*, se suicida por apoptosis. El conocimiento sobre la actuación de estos genes ha permitido establecer el dogma “central de la apoptosis”. La proteína EGL-1 (que sólo contiene un dominio BH3) se induce en las células que están destinadas a morir e interacciona con la proteína reguladora CED-9. Esta interacción desplaza a la proteína adaptadora CED-4, factor activador de una proteasa, que promueve la activación de CED-3. Ésta última tiene actividad proteásica y es una de las efectoras y ejecutoras de la apoptosis, que degradan a sus sustratos diana, desmantelando la compleja estructura celular y desencadenando la muerte. En vertebrados se ha descrito una ruta similar, con moléculas homólogas a



**Figura 5. Evolución del número de publicaciones sobre apoptosis y moléculas implicadas en este proceso.** En la gráfica se representa la evolución anual del número de publicaciones en las que se hace referencia a los términos "apoptosis", "Bcl-2", y "caspasa". La base de datos utilizada ha sido el servidor PubMed de la U.S. National Library of Medicine y del National Institute of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Asimismo, se indica el año en el que se cita por primera vez cada término y, en el inserto, se agrupa el número total de publicaciones a lo largo de varios años.

las descritas en *C. elegans* (Figura 4). Sin embargo, el escenario es mucho más complejo, el número de moléculas reguladoras y efectoras es superior y, además, existen mecanismos reguladores adicionales [56].

Otro de los problemas planteados, al que dio respuesta J. E. Sulston, es el referente al destino de los cadáveres de las células muertas, que además explica por qué no se detectó antes la apoptosis a pesar del elevado número de células que pueden morir a diario en un organismo. Las células se suicidan de forma discreta y sus restos son eliminados limpiamente sin que queden vestigios de la muerte, confirmando que el proceso de aclaramiento de células apoptóticas es muy eficaz. J. E. Sulston caracterizó otros mutantes *ced* en los que las células morían pero se producía una acumulación de los cadáveres. A partir de ese momento se empezó a identificar a los genes implicados en este proceso.

La capacidad de *Bcl-2*, el homólogo del gen anti-apoptótico *ced-9*, para prevenir la muerte celular programada en *C. elegans* [4,5], y la existencia de otros genes que controlan la apoptosis equivalentes en mamíferos y *C. elegans* [49], pone de manifiesto que este proceso está altamente conservado a lo largo de la

evolución, que es básico y universal. Todas las células expresan los componentes moleculares que les permiten "suicidarse" en función de las señales procedentes del entorno celular o de su interior.

Desde el principio de los años 90, la investigación sobre el proceso de apoptosis se ha incrementado año a año de forma vertiginosa y fascinante. Como se puede observar en la Figura 5, las publicaciones sobre apoptosis han aumentado de forma exponencial; en los siete años de este siglo se contabilizan más de 100.000 artículos científicos. Aquellas que hacen referencia a la proteína Bcl-2 o a miembros de su familia, al igual que las de caspasas, engrosarían aun más los números. El porcentaje de publicaciones sobre apoptosis, del total de artículos científicos en el área de la salud, supera ya el 2%.

Además de su importancia como fenómeno biológico, la apoptosis se ha relacionado con varias enfer-



**Figura 6. Patologías asociadas con alteraciones en el proceso de apoptosis.** En la tabla se enumeran algunas de las patologías en las cuales se ha observado una relación directa con alteraciones en el equilibrio entre los procesos de muerte celular programada y de proliferación celular, bien por incremento o por inhibición de la apoptosis.

medades en las que se produce un desequilibrio entre el balance de proliferación y muerte celular (Figura 6). Así, la patogénesis de varias enfermedades humanas revela que el componente apoptótico puede contribuir tanto a la progresión de la enfermedad como incluso dar cuenta de ella. Un exceso de apoptosis causa patologías asociadas a pérdida de células (procesos degenerativos), mientras que una disminución provoca un incremento descontrolado del número de células, modificando el recambio celular. Además, alteraciones en la eliminación de los cuerpos apoptóticos también pueden contribuir a un desequilibrio en la homeostasis celular [57]. Por ejemplo, en las enfermedades crónicas neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, se ha descrito una muerte celular a través de una ruta endógena suicida [58]. Otro de los aspectos a considerar es la respuesta de los tumores a diferentes terapias como la hormonal, la quimioterapia, la radioterapia o el tratamiento con agentes biológicamente activos, que dependerá, al menos en parte, de la capacidad de desencadenar la apoptosis u otros tipos

de muerte celular. La adquisición de resistencia de las células tumorales, no respondiendo a la terapia, puede residir en una desregulación de algunas de las etapas de la apoptosis [59]. Es de desear, y parece un futuro prometedor, que los conocimientos básicos sobre la apoptosis, vías que gobiernan su ejecución y la eliminación de los cuerpos apoptóticos, puedan ser aplicados al diseño de fármacos que activen o inhiban selectivamente la muerte de las células. En la página web de la red española de apoptosis (<http://apored.bq.uam.es>) se puede encontrar información tanto divulgativa como sobre diferentes líneas de investigación relacionadas con apoptosis.

### MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE APOPTOSIS: EFECTORES INTRACELULARES

Varias familias de moléculas están implicadas en la muerte celular programada. La fecha de identificación

**TABLA III: Identificación de algunas moléculas implicadas en la muerte programada**

1988	David L. Vaux, Suzane Cory y Jerry M. Adams describen el papel antiapoptótico y tumorigénico de la proteína humana producto del gen <i>Bcl-2</i> [60].
1992	Dos grupos independientes (de compañías farmacéuticas) identifican en células humanas y purifican la proteína ICE ( <i>Interleukin-1-beta-converting enzyme</i> ), una cisteín-proteasa [61,62].
1989/1992	La obtención por varios grupos [63,64] de anticuerpos monoclonales que inducen apoptosis posibilita y conduce a la identificación y clonación del receptor de muerte Fas/APO-1/CD95 [65].
1992	La observación de que en la superficie de las células apoptóticas se expone fosfatidilserina proporciona un marcador de apoptosis y permite determinar cómo son reconocidas las células muertas antes de ser fagocitadas [66].
1993	Junying Yuan y colaboradores identifican ICE como la proteína equivalente a CED-3 [49].
1991/1994	Se propone un papel para la proteína p53 en la inducción de apoptosis [67], viéndose posteriormente que p53 causa apoptosis a través de un mecanismo que puede ser bloqueado por Bcl-2 [68].
1993	El grupo de Shigekazu Nagata identifica los primeros ligandos del receptor Fas [69,70].
1993	El producto del gen <i>p35</i> , que se describió en baculovirus, es el primer inhibidor de la apoptosis (IAP) identificado [71,72].
1996	Se acuña el término <b>caspasa</b> para agrupar el conjunto de proteasas que se activan durante la apoptosis [73].
1996/1997	Se interrelaciona la liberación de citocromo c de la mitocondria con el proceso de apoptosis a través de la activación de ciertas caspasas [74].
1997	Hou Zou y colaboradores identifican una proteína similar a CED-4 a la que nombran como Apaf-1 ( <i>Apoptotic protease activating factor</i> ) [75].

TABLA IV: Relación de acrónimos. Definición y función en relación con la apoptosis

Acrónimo / Definición	Función
AIF <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>	Oxidorreductasa mitocondrial que induce apoptosis. Se transloca al núcleo y activa a desoxinucleasas.
ANT <i>Adenine Nucleotide Tanslocator</i>	Transportador de nucleótidos de adenina componente del poro de transición de permeabilidad mitocondrial.
Apaf-1 <i>Apoptotic protease activating factor</i>	Proteína citosólica que interacciona con el citocromo c, dATP y procaspasa-9 formando el apoptosoma, complejo que activa a las caspasas ejecutoras.
ATG <i>Autophagy-related</i>	Genes implicados en la supervivencia y muerte celular por autofagia.
ATM <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	Proteína quinasa que se activa en respuesta a daños en el DNA; es una de las quinasas que fosforila a p53.
Bcl-2 <i>B-cell lymphoma-2</i>	Proteína anti-apoptótica. Término genérico que designa a la familia de proteínas, cuyos miembros pueden bloquear o activar la apoptosis, que regulan la muerte celular por la vía intrínseca mitocondrial.
BH <i>Bcl-2 Homology</i>	Dominios homólogos de las proteínas de la familia Bcl-2.
CARD <i>Caspase-Recruitment Domains</i>	Dominio de reclutamiento de caspasas localizado en el prodominio de éstas y responsable de establecer interacciones con otras proteínas que contengan el mismo dominio.
CARP <i>Cell-cycle Apoptosis Regulatory Protein</i>	Proteína que inhibe a las caspasas 8 y 10 bloqueando la vía de los receptores de muerte.
caspasa <i>cystein-dependent aspartate-directed proteases (caspase)</i>	Término que agrupa a los miembros de la familia de las proteasas ICE/CED3 implicadas en las fases efectora y ejecutora de la apoptosis.
ced <i>cell death abnormal</i>	Genes implicados en la regulación de la muerte celular programada en <i>C. elegans</i> .
CrmA <i>Cytokine response modifier A</i>	Inhibidor de caspasas de origen viral que se une al centro catalítico de las caspasas.
DD <i>Death Domain</i>	Dominio de muerte que contiene los receptores de muerte de la vía extrínseca. Región responsable de la interacción con los mismos dominios de las proteínas adaptadoras.
DED <i>Death-Effector Domain</i>	Dominio efector de muerte localizado en el prodominio de las caspasas; implicado en la interacción con proteínas que contengan los mismos dominios.
DISC <i>Death-Inducing Signaling Complex</i>	Complejo de señalización de muerte mediada por receptores de muerte formado por la proteína FADD y las caspasas 8 o 10.
DNA-PK <i>DNA-protein kinase</i>	Proteína quinasa dependiente de DNA que se activa en respuesta a daños en el DNA y es una de las dianas de las caspasas.
FADD <i>Fas Associated Death Domain</i>	Proteína adaptadora que interacciona a través de su dominio de muerte con receptores de la vía extrínseca. Posee un dominio de muerte de interacción con caspasas 8 y 10.

FLIP <i>Flice-like Inhibitory Protein</i>	Proteína que tiene un dominio efector de muerte que interacciona con caspasas regulando la actividad de las mismas. Bloquea la apoptosis mediada por receptores de muerte.
IAP <i>Inhibitor-of-Apoptosis Protein</i>	Miembro o familia de proteínas de mamíferos que inhiben a las caspasas.
ICAD/DFF45 <i>Inhibitor of Caspase Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45</i>	Proteína que mantiene inhibida a la desoxinucleasa responsable de la degradación del DNA durante la apoptosis. Es una de las dianas de las caspasas.
ICE <i>Interleukin-1<math>\beta</math>-Converting Enzyme</i>	Primera cistein-proteasa descrita implicada en apoptosis. Posteriormente se denominó caspasa-1; está implicada en inflamación.
MAPK <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>	Familia de proteínas quinasas que fosforilan a residuos de serina/treonina y que responden a estímulos extracelulares. Regulan varios procesos celulares como la proliferación, supervivencia y apoptosis.
Mdm-2 <i>Murine double minute-2</i>	Proteína con actividad de ubiquitina ligasa, una de las que controla la degradación de la proteína p53. Interacciona con p53 bloqueando su actividad transcripcional; es un regulador negativo.
Omi/Htr A2 <i>Oocyte Maturation Inhibitor/High temperature requirement protein A2</i>	Proteína mitocondrial que se libera al citoplasma y bloquea a inhibidores proteicos de las caspasas.
PARP <i>Poly-(ADP) Ribose Polymerase</i>	Poli-(ADP-ribosa) polimerasa implicada en la reparación del DNA; es una de las dianas de las caspasas.
PI3K <i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>	Fosfatidilinositol-3-quinasa que se activa por una variedad de receptores de factores de crecimiento. La ruta de señalización PI3K/Akt regula la proliferación celular, la apoptosis y a factores transcripcionales.
RING <i>Really Interesting New Gene</i>	Nombre trivial del dominio, o motivo estructural de dedo de zinc Cys <sub>3</sub> HisCys <sub>4</sub> , que contienen los inhibidores proteicos de las caspasas. Implicado en la degradación por ubiquitinización de las caspasas.
Smac/DIABLO <i>Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point)</i>	Proteína pro-apoptótica mitocondrial que se libera al citoplasma durante la apoptosis. Bloquea a proteínas inhibitoras endógenas de las caspasas.
ROS <i>Reactive Oxygen Species</i>	El término colectivo especies reactivas de oxígeno incluye a radicales de oxígeno (superóxido e hidroxilo) y a algunos derivados no radicales de oxígeno molecular como el peróxido de hidrógeno. En las células de mamífero se producen como productos del metabolismo normal y por activación de sistemas enzimáticos unidos a membrana como el complejo NADH oxidasa, en respuesta a estímulos exógenos.
TNF <i>Tumor Necrosis Factor</i>	Factor de necrosis tumoral: citoquina que participa en la inflamación y es un ligando de uno de los receptores de muerte de la vía extrínseca de inducción de apoptosis.
TNFR <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>	Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y, en relación con la apoptosis, es un receptor de muerte celular de la señal por la vía extrínseca.
VDAC <i>Voltage-Dependent Anion Chanel</i>	Componente del poro de transición de permeabilidad mitocondrial localizado en la membrana externa con el que interaccionan proteínas de la familia Bcl-2.

de algunas de las primeras moléculas fundadoras de dichas familias, o de alguna proteína clave en dicho proceso, se recoge en la Tabla III [60-75]. Los acrónimos por los que se reconocen a algunas de las moléculas que participan en la apoptosis, se detallan en la Tabla IV.

### *Familia de proteínas Bcl-2*

Existen al menos una veintena de miembros de esta familia de proteínas en mamíferos [76,77]. La primera que se describió, estructura prototipo y que da nombre a esta familia, es la proteína Bcl-2 (**B-cell lymphoma-2**) [60]. En *C. elegans*, una de las proteínas encargadas de llevar a cabo el programa de apoptosis, CED-9, muestra una gran similitud tanto estructural como funcional con Bcl-2, impidiendo la activación por CED-4 de la proteína CED-3 efectora de la apoptosis (Figura 4).

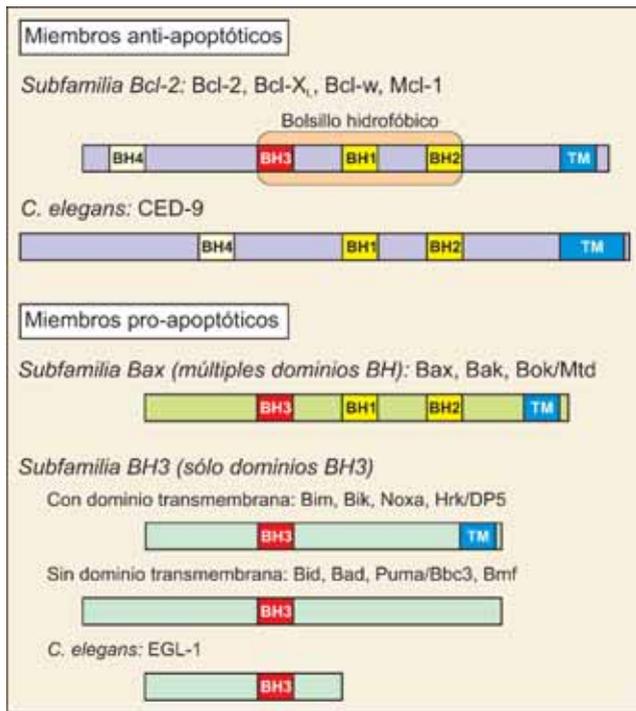
Los miembros de esta familia tienen actividades opuestas que median la muerte celular y también están implicados en otros procesos como tumorigénesis y respuesta celular a la terapia antitumoral. Las proteínas se pueden clasificar en subfamilias atendiendo a diferencias estructurales y funcionales. En dependencia de cómo afectan al proceso de muerte celular se describen dos tipos de proteínas: anti-apoptóticas, si lo bloquean (por ejemplo Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, Bcl-b y Mcl-1), y las pro-apoptóticas (por ejemplo Bax y Bak), entre las que también se incluyen aquellas que contienen sólo un dominio BH3 [1,78]. En la Figura 7 se comparan los dominios estructurales de las proteínas de la familia Bcl-2 y también se incluyen, en los correspondientes grupos, las proteínas homólogas en *C. elegans*, CED-9 y EGL-1.

Una característica estructural común de los miembros de esta familia es la presencia de regiones homólogas a Bcl-2 denominadas BH (**Bcl-2 Homology**; BH1-BH4). Los dominios BH carecen de actividad enzimática y están implicados en los procesos de asociación de cadenas polipeptídicas; determinan la capacidad de estas proteínas para interactuar entre ellas, formando homo y heterodímeros, o con otras proteínas no relacionadas. Sin embargo, el efecto ejercido sobre el proceso de apop-

tosis parece no correlacionarse con el número y tipo de heterodímeros que forman los miembros de esta familia, sino con los niveles libres de Bcl-2 y Bax [79]. Los dominios BH1 y BH2 se encuentran en todas estas proteínas y la secuencia del dominio BH3 es diferente en las proteínas pro- y anti-apoptóticas [77,80,81]. Además, BH4 está presente exclusivamente en la subfamilia anti-apoptótica y es el dominio responsable de interactuar con componentes del megacanal mitocondrial impidiendo que se produzcan alteraciones en dichos orgánulos asociadas con la apoptosis. De hecho, las caspasas pueden actuar sobre las proteínas anti-apoptóticas eliminando el dominio BH4 de su estructura.

Dentro de los miembros pro-apoptóticos se encuentran las proteínas que sólo tienen el dominio BH3 (Bad, Bid, Bik y Bim); algunas de ellas poseen un dominio transmembrana (Figura 7). Excepto por el dominio BH3, no muestran homología con Bcl-2 y forman una subfamilia o grupo estructuralmente diverso. Se ha descrito que, para regular el inicio de la apoptosis, varias de estas proteínas se pueden activar por diferentes vías, como por ruptura proteolítica, fosforilación y miristoilación. Estas proteínas se pueden unir e inhibir a las anti-apoptóticas y, por tanto, promover la apoptosis. En último término, actúan sobre la mitocondria induciendo la liberación de citocromo c y otros factores apoptogénicos, promoviendo finalmente la apoptosis [78].

Bcl-2 posee los cuatro dominios BH; es una proteína anti-apoptótica que está localizada en la membrana mitocondrial externa y mantiene la integridad de la mitocondria. Además, ejerce su actividad interactuando, y por tanto inhibiendo a proteínas pro-apoptóticas. Por otro lado, Bax es uno de los miembros pro-apoptóticos más significativos de esta familia. Posee los dominios BH1, BH2 y BH3, aunque BH1 y BH2 son los que guardan homología con Bcl-2. Bax está ampliamente expresada en distintos tejidos y su sobreexpresión acelera la muerte en respuesta a distintas señales. Los efectos de prevención de apoptosis ejercidos por Bcl-2 y de promoción por Bax son dependientes de su interacción con membranas. Por ello, la mayor parte de estas proteínas poseen un dominio carboxilo terminal transmembrana (excepto algunas proteínas de la subfamilia BH3 como Bid y Bad). Éste facilita su inserción en membranas



**Figura 7.** Regiones homólogas de algunos miembros de la familia Bcl-2 y de las correspondientes proteínas en *C. elegans*. En la figura se representan de forma esquemática las proteínas de la familia Bcl-2, y sus análogos en *C. elegans* CED-9 y EGL-1, agrupados por subfamilias en función de su actividad anti-pro-apoptótica. Además, se indican las regiones BH y las regiones transmembrana (TM). En la proteína Bcl-2 se ha descrito la existencia de un bolsillo hidrofóbico (que engloba a las regiones BH3, BH1 y BH2) responsable de la interacción de Bcl-2 con los dominios BH3 de las proteínas pro-apoptóticas.

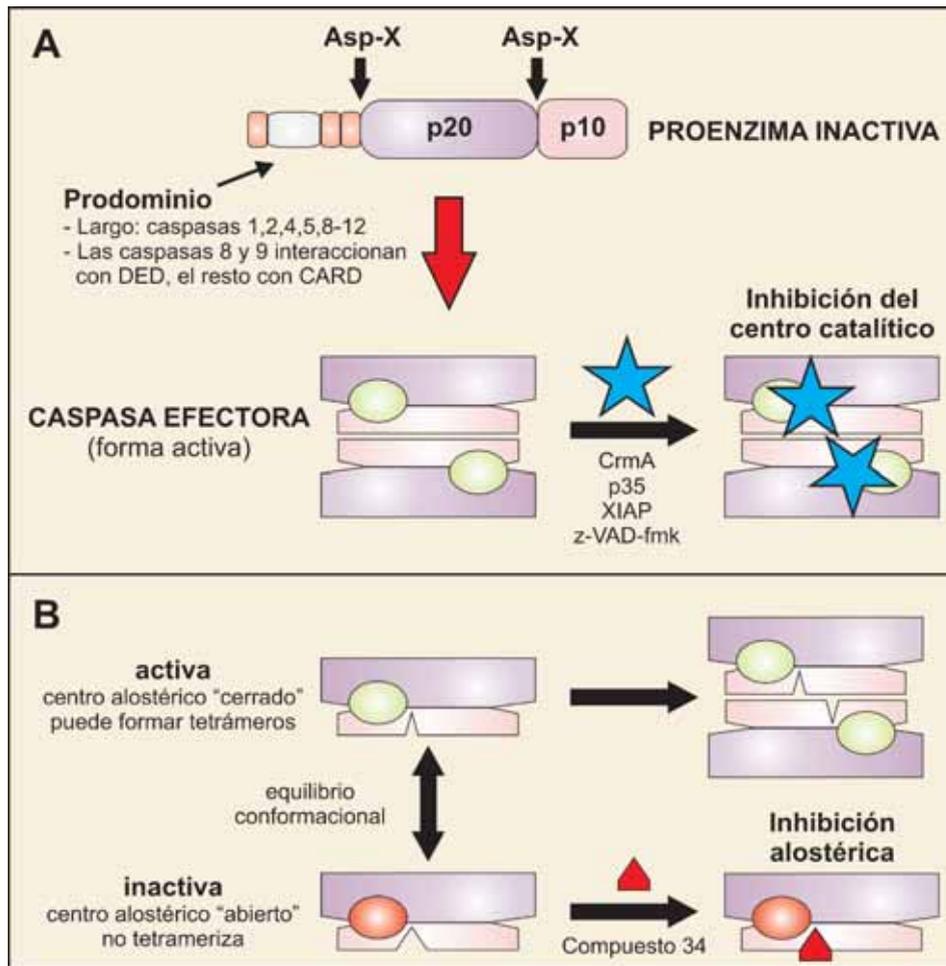
intracelulares (la cara externa de la membrana mitocondrial, el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear). La similitud estructural de Bcl-X<sub>L</sub> con los dominios de formación de poros de la toxina de la difteria y de las colicinas A y E1 sugirió que Bcl-X<sub>L</sub>, y otros miembros de la familia, podrían regular la apoptosis a través de la formación de poros [82]. En este sentido, se ha descrito que Bcl-2 puede regular el flujo de protones para mantener el potencial de membrana mitocondrial en presencia de estímulos que provocan una disminución del mismo [83]. La inducción de apoptosis implica que la proteína Bax citoplasmática migre y se una a la membrana mitocondrial. Bax y Bak pueden actuar interaccionando con componentes del megacanal mitocondrial o bien pueden formar un canal oligomérico que conduce a un daño mitocondrial [84,85]. La formación de poros incrementa la permeabilidad mitocondrial y permite la liberación de los factores apoptogénicos [AIF (*Apoptosis-Inducing*

*Factor*), citocromo c, calcio, especies reactivas de oxígeno (ROS; *Reactive Oxygen Species*), etc.]. El mecanismo que media el efecto de Bcl-2 parte probablemente de su localización en la membrana mitocondrial externa donde se unirá a Bax impidiendo la formación de poros en dicha membrana y, por tanto, la liberación de factores que desencadenarían el proceso apoptótico [85,86].

### La familia de las caspasas

La maquinaria de transmisión de las señales apoptóticas es compleja. Se puede iniciar a través de distintas vías dependiendo del estímulo recibido por la célula. Una vez iniciada la señal, ésta se transmite a través de distintas proteínas adaptadoras. Sin embargo, todas las señales convergen al final en la activación de una familia de cisteín-proteasas, denominadas caspasas, que cortan a la proteína diana detrás de un residuo de aspártico, de ahí el nombre que reciben (*cystein-dependent aspartate-directed proteases*). El término caspasa se introduce como nombre trivial en 1996 [73] para designar a los miembros de la familia de las proteasas ICE/CED3 y homogeneizar la nomenclatura. Las caspasas son las encargadas, en último término, de ejecutar el proceso de muerte celular y activan a otras enzimas que degradan múltiples proteínas, con el consiguiente desmantelamiento de la arquitectura celular. La implicación de estas proteasas en los procesos de apoptosis está ampliamente documentada [73, 77].

Hasta el momento, en humanos se conocen 11 miembros de esta familia de proteínas [1]. La primera proteasa descrita en mamíferos se denominó ICE (*Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme*) o caspasa-1. Ésta es precisamente uno de miembros de la familia al que no se le ha relacionado con el proceso de la apoptosis sino con el de la inflamación, ya que es responsable de la ruptura y activación de la interleuquina 1 $\beta$ , una citoquina proinflamatoria. El análisis filogenético revela que existen dos subfamilias de caspasas [87]. La subfamilia de la caspasa-1 (caspasas 1, 4, 5 y 11-14), que se han implicado en el control de la inflamación, y la subfamilia de la caspasa-3 (caspasas 3 y 6-10), que están especializadas en desencadenar y ejecutar la muerte por apoptosis. La caspasa-2 es estructuralmente similar a la subfamilia de la caspasa-1 pero su función la ubica en la subfamilia de la caspasa-3.



**Figura 8. Mecanismos de activación e inhibición de caspasas.** (A) Las caspasas se sintetizan bajo la forma de proenzima inactiva que, en general, requiere una activación proteolítica por eliminación del prodominio y separación de las subunidades pesada (p20) y ligera (p10). Esta rotura se produce siempre detrás de residuos de ácido aspártico. Tras la digestión proteolítica, las caspasas efectoras (p.e. caspasa-3) forman un heterotetrámero activo, compuesto por dos subunidades pesadas y dos ligeras, con dos centros catalíticos por tetrámero. Las caspasas efectoras pueden inhibirse de forma competitiva por unión a los centros activos de inhibidores virales (CrmA o p35), proteínas inhibitoras de la apoptosis como XIAP, o péptidos sintéticos inhibitoras como el z-VAD-fmk. (B) Tras la activación proteolítica, los dímeros de cadenas pesadas y ligeras se encuentran en equilibrio conformacional y sólo una de las conformaciones es capaz de formar el tetrámero activo. Algunos inhibidores sintéticos, como el "compuesto 34", pueden ejercer una inhibición alostérica al unirse a un residuo de cisteína en la interfase, estabilizando la conformación inactiva e impidiendo la formación del tetrámero.

Las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos (proenzimas inactivas o pro-caspasas). Se activan por proteólisis limitada y asociación de subunidades [88], adquiriendo su capacidad catalítica para degradar a su vez a sus sustratos diana. En la estructura de las pro-caspasas se pueden distinguir tres dominios: el prodominio amino terminal, la subunidad grande (de aproximadamente 20 kDa) y la subunidad pequeña (de 10 kDa). La longitud del prodominio es muy variable y

éste está implicado en la regulación de la activación. En esta región se localiza un dominio de reclutamiento de caspasa (CARD; *Caspase-Recruitment Domain*) o el dominio efector de muerte (DED; *Death-Effector Domain*), que típicamente facilitan la interacción con proteínas que contengan dominios iguales. Aquellas caspasas que poseen un prodominio largo parecen estar implicadas en la iniciación del proceso de apoptosis y se denominan **caspasas iniciadoras** o acti-

vadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10; se autoactivan e inician el proceso proteolítico sobre otras caspasas). El predominio de la caspasa-9 está implicado en la formación del complejo multimérico denominado apoptosoma. Las caspasas con un predominio corto se activan por las caspasas iniciadoras para ejecutar el programa de apoptosis y se las conoce como **caspasas efectoras** (caspasas 3, 6 y 7). Éstas son, en último término, las que degradan una amplia gama de sustratos durante la apoptosis [87].

Las caspasas se activan una vez iniciadas las distintas vías de señalización del programa de apoptosis. La activación de cada caspasa requiere un mínimo de dos roturas proteolíticas: una, en la que se separa el predominio del resto de la molécula, y otra, que da lugar a las subunidades grande y pequeña (Figura 8A). Estos cortes, en los que están implicados residuos de aspártico, ocurren de un modo ordenado y van seguidos de la asociación de dos de cada una de estas subunidades para formar una estructura tetramérica. Esta asociación puede ser homo- o heterodimérica, generando una enzima con dos centros activos y una especificidad absoluta de corte detrás de un residuo de aspártico. Todo ello implica que estas enzimas puedan ser activadas bien autocatalíticamente o bien en cascada por otras enzimas con especificidad similar. En células sanas las caspasas iniciadoras existen en forma monomérica mientras que las efectoras aparecen como dímeros preformados [77]. Además, también se ha descrito que algunas caspasas se pueden activar por cambios conformacionales.

### *Las caspasas y la ejecución bioquímica*

¿Cómo ejecutan las caspasas el programa de apoptosis? Las caspasas, aunque son extraordinariamente selectivas como proteasas, ejercen su actividad proteolítica sobre un amplio número de sustratos. En éstos rompen el enlace peptídico detrás de un residuo de aspártico, pero lo que reconocen son diferentes motivos tetrapeptídicos (-DEVD-, -LETD-, -LEHD- son reconocidos por las caspasas 3, 8 y 9, respectivamente), confiriéndoles cierta especificidad de sustrato. A su vez, las caspasas inactivas pueden ser sustrato de las activas, desencadenándose una cascada de manera que unas caspasas activan a otras siguiendo un orden jerárquico [89].

La proteólisis de muchos de los sustratos de caspasas es la responsable de los numerosos cambios metabólicos y estructurales que se desencadenan durante el proceso de apoptosis. Actúan sobre un gran número de proteínas, tanto citoplasmáticas como nucleares, con actividades y participación en procesos celulares tan diversos como: metabolismo y reparación del DNA, fosforilación de proteínas, transducción de señales, regulación del ciclo celular y proliferación. Además, están relacionadas con proteínas responsables de enfermedades genéticas humanas y proteínas que participan directamente en apoptosis [86]. Entre las dianas de las caspasas se puede destacar a ICAD/DFP45 (*Inhibitor of Caspase Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45*; molécula que mantiene inhibida a la desoxinucleasa activada por caspasa responsable de la degradación del DNA durante la apoptosis), las relacionadas con la reparación del DNA y con los procesos de replicación y transcripción del DNA (DNA-PK), la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP: *Poly-(ADP) Ribose Polymerase*) y proteínas estructurales como las laminas nucleares y la citoqueratina 18.

### *Inhibidores de caspasas*

Debido a los efectos letales provocados por las caspasas no es de extrañar que su actividad esté sometida a un estricto control ejercido a distintos niveles. Así, además de la compartimentalización subcelular, se puede producir una regulación transcripcional a través de distintos agentes, como el interferón  $\gamma$ , que afectan a la expresión génica de diferentes caspasas [90]. Por otro lado, se han descrito distintos tipos de modificaciones post-traduccionales (nitrosilación, fosforilación, etc.) que pueden modular la actividad de estas proteasas [87]. Además, existen mecanismos específicos de regulación como la actuación de inhibidores de las caspasas [91].

Los primeros inhibidores descritos son de origen viral (Figura 8A). El inhibidor CrmA (*Cytokine response modifier A*), producto de un gen de virus *Cowpox*, inhibe a las caspasas 1 y 8, y a la caspasa-10 humana. De esta forma, previene la activación de la apoptosis bloqueando al receptor de TNF (*Tumor Necrosis Factor*; de la vía de los receptores de muerte). El segundo inhibidor, producto de un baculovirus que no infecta a células humanas, es p35, que

tiene un amplio espectro de actuación: inhibe a las caspasas 1, 3, 6, 7, 8 y 10. Se ha propuesto un mecanismo de actuación de inhibidores como CrmA, p35 y otras moléculas sintéticas; se unen como pseudosustratos al centro catalítico de las caspasas diana inhibiendo su actividad catalítica. Por el contrario, otros inhibidores, como el compuesto 34 (inhibidor sintético), se unen a un centro alostérico de la estructura dimerica inactivando a la caspasa (Figura 8B) [92]. Por otro lado, se ha descrito una familia de proteínas de mamíferos denominada IAP (*Inhibitor-of-Apoptosis Protein*) que son capaces de unirse e inactivar a distintas caspasas (3, 7 y 9). Se conocen varios miembros de esta familia en mamíferos (cIAP-1, cIAP-2, XIAP, ILP-2, NAIP y la survivina), aunque excepto XIAP1, los demás parece que no inhiben a las caspasas a concentraciones fisiológicas [93]. Además de estos inhibidores directos se han descrito otras moléculas, como las proteínas CARP1 y CARP2 (CARP: *Cell-cycle Apoptosis Regulatory Protein*), que se asocian a las caspasas 8 y 10 e inhiben la señal de la vía de los receptores de muerte. Por los dominios estructurales que tienen los inhibidores proteicos se ha propuesto que un mecanismo de actuación sería evitar la dimerización de las caspasas, o unirse a las procaspasas, por ejemplo a la procaspasa-9, impidiendo su activación. Sin embargo, otro mecanismo se basa en que uno de los dominios, denominado RING (*Really Interesting New Gene; RING-finger*; motivo estructural de dedo de zinc), puede reclutar a enzimas conjugadas con ubiquitina ligasa E2, que catalizarían la transferencia de ubiquitina a diferentes sustratos, entre ellos la caspasa-3. Éstos quedarían marcados como dianas para su degradación por el proteasoma [94]. A este repertorio de inhibidores, y con vistas a tratamientos terapéuticos, hay que sumar el desarrollo de los inhibidores sintéticos de diversa naturaleza. Se han descrito, entre otros, péptidos unidos a diferentes grupos que incrementan su estabilidad y eficacia que están basados en la secuencia de los sustratos de caspasas (por ejemplo z-VAD-fmk) y que actúan como pseudosustratos (Figura 8A y B) [91].

## RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DEL PROCESO DE APOPTOSIS

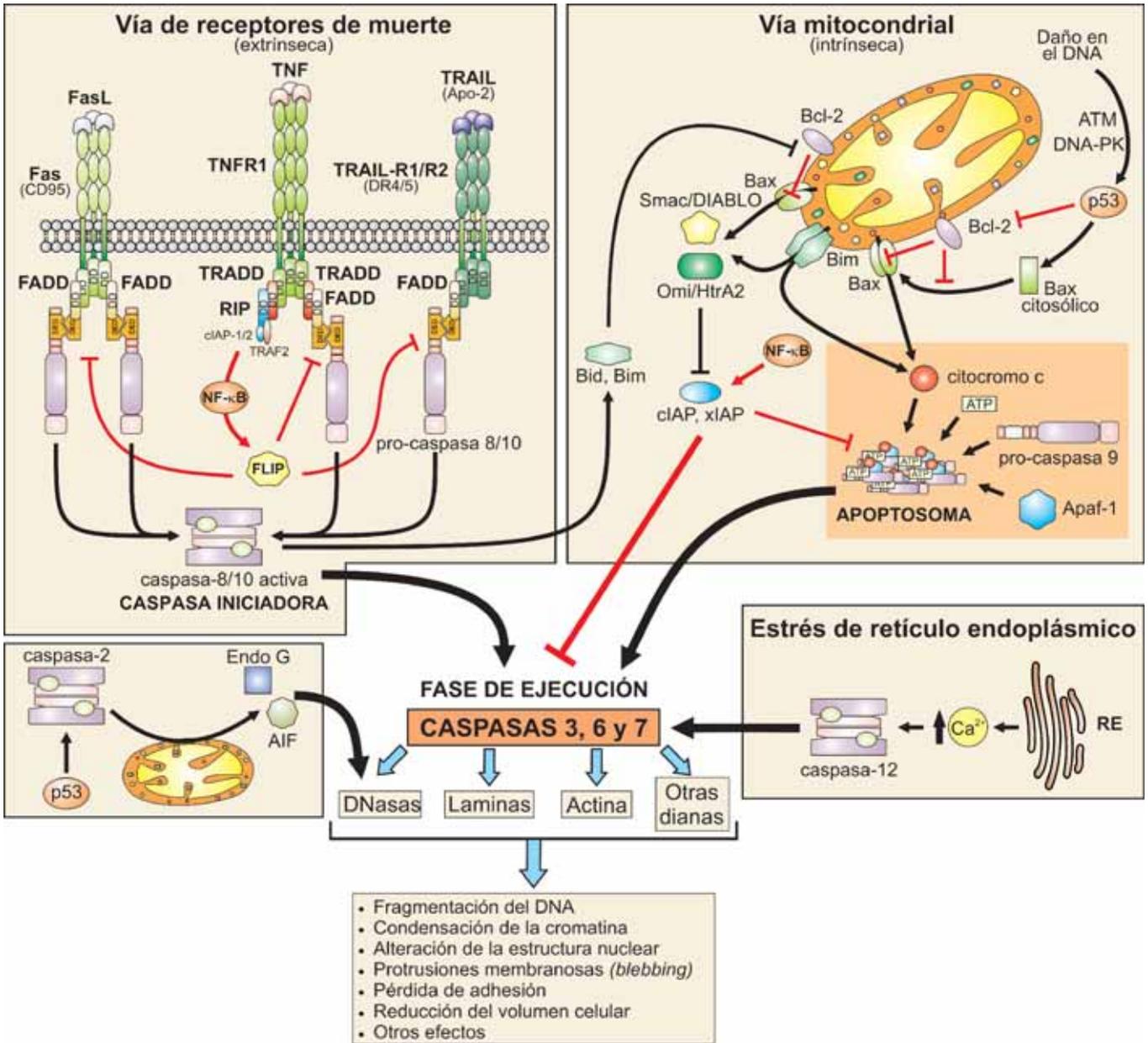
La apoptosis, como proceso activo dependiente de energía, se puede iniciar por una gran variedad de estí-

mulos, intracelulares o extracelulares, participando las células en su propia muerte de una forma organizada y eficiente. Un conjunto variado de moléculas que pueden sobreexpresarse o activarse, o que pueden reprimirse o inhibirse, están implicadas en la apoptosis. La estimulación de moléculas pro-apotóticas o la inhibición de factores anti-apotóticos dependen del tipo celular y del insulto. Se ha descrito una redundancia asociada a una especialización funcional de las moléculas que constituyen las diferentes familias implicadas en el desarrollo del programa apoptótico. La multiplicación de los reguladores de la muerte celular permite que los miembros de una familia puedan realizar su función según su localización subcelular o, por ejemplo, dependiendo de las interacciones proteína-proteína que puedan establecer. Esta división de labores permite a los organismos multicelulares detectar y responder diferencialmente a distintos estímulos. Así, en humanos, en la muerte inducida a través de receptores de muerte y por estrés de retículo endoplásmico o genotóxico, participan las caspasas 8, 4 y 2, respectivamente.

El programa de apoptosis se desarrolla en varias etapas. En la primera, **etapa efectora o de determinación**, la célula reacciona ante un estímulo determinado o ante su ausencia (señales de desarrollo, estrés celular, alteración del ciclo celular, etc.) decidiendo iniciar el proceso de apoptosis. En la segunda, **etapa de ejecución o degradativa**, la célula sufre un conjunto de alteraciones moleculares que desencadenan la muerte celular. A éstas hay que añadir la fase de limpieza o eliminación de los cuerpos apoptóticos. Las diferentes rutas a través de las que se regula el proceso de apoptosis, así como las moléculas implicadas en su activación y ejecución, se muestran en la Figura 9 [77,78].

### Vía de los receptores de muerte

Una primera ruta de señalización del proceso de apoptosis tiene su origen en la membrana celular a través de lo que se conoce como vía extrínseca o de **receptores de muerte**. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor de TNF (TNFR) cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y una secuencia en su dominio citoplasmático para acoplar el



**Figura 9. Vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis.** Dependiendo del tipo de estímulo apoptótico, se pueden activar distintas rutas iniciadoras de la cascada de señales del programa de apoptosis. La **vía extrínseca**, mediada por los **receptores de muerte**, se inicia en la membrana plasmática tras la unión de distintos ligandos (por ejemplo, FasL, TNF o TRAIL) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1 o TRAILR1/R2, respectivamente). Este hecho provoca la homotrimerización del receptor que, a través de proteínas adaptadoras (como FADD), activa a la pro-caspasa 8. En la **vía mitocondrial o intrínseca**, la familia de proteínas Bcl-2 regula la liberación de calcio, ROS (especies reactivas de oxígeno) y proteínas apoptogénicas (citocromo c, Apaf-1 y AIF) que pueden activar a la pro-caspasa 9. A su vez, la expresión de los distintos miembros de la familia Bcl-2 puede estar regulada por estímulos pro-apoptóticos, como el daño en el DNA. En este caso, dicho daño induce a través de las quinasas ATM o DNA-PK, la activación de p53 que, a su vez, promueve la transcripción de los genes pro-apoptóticos de esta familia (p.e. Bax) y reprime las de los anti-apoptóticos como el propio Bcl-2. La activación de las pro-caspasas implica la liberación del prodominio y la separación proteolítica de las subunidades grande (morado) y pequeña (rosa), con la posterior asociación de dos subunidades grandes y dos pequeñas dando lugar a la especie activa con dos centros catalíticos (verde). Las **caspasas iniciadoras** activan a las **caspasas ejecutoras**, que son las desencadenantes de los diversos procesos celulares que conducen finalmente a la muerte celular por apoptosis. Existen otras vías de activación intrínseca del proceso de apoptosis, como la que produce la activación dependiente de p53 de la caspasa-2 que, a su vez, induce la liberación mitocondrial de la oxidoreductasa AIF y la endonucleasa mitocondrial EndoG, que se dirigen al núcleo y promueven la degradación de nucleosomal de la cromatina. El estrés de retículo endoplásmico es otra de las vías intrínsecas de inducción de apoptosis en la que se altera de la homeostasis de calcio; en esta ruta está implicada la caspasa-12.

receptor con el resto de la maquinaria apoptótica. Estos receptores también participan en el control de otros procesos como la respuesta inmune e inflamatoria, la homeostasis ósea y el desarrollo y diferenciación de estructuras epiteliales.

La señal se inicia tras la unión de los correspondientes ligandos (citoquinas pro-apoptóticas y pro-inflamatorias como FasL, TNF, etc.) a sus respectivos receptores de muerte (Fas, TNFR1, TRAILR1, etc.) [95,96]. La unión del ligando provoca la homotrimerización del receptor y, de este modo, el receptor de muerte es capaz de reclutar proteínas adaptadoras hacia la membrana celular. Este proceso implica la interacción homofílica entre los dominios de muerte DD (*Death Domain*) de los receptores con los de las moléculas adaptadoras (proteínas puente entre el receptor y la caspasa) como la proteína FADD (*Fas Associated Death Domain*). Las moléculas adaptadoras poseen los dominios efectores de muerte DEDs capaces de interactuar homofílicamente con algunos miembros de la familia de las caspasas provocando su activación. Así, se forma un complejo de señalización de muerte (DISC; *Death-Inducing Signaling Complex*) que contiene a la proteína FADD y las caspasas 8 o 10. La activación de la procaspasa-8 requiere su asociación con la molécula adaptadora FADD a través de los dominios DED, situándose la caspasa-8 en la vía apoptótica mediada por receptores de muerte [97,98]. La caspasa-8 se activa, dirigiendo de esta forma la ejecución de la apoptosis ya que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras. Además, la caspasa-3 puede eliminar un dominio de la proteína Bid amplificando la señal de muerte celular ya que causa un daño a la mitocondria.

Por otro lado, a través de la vía de señalización de los receptores de muerte, la activación de las caspasas puede ser regulada por la proteína FLIP (*Flice-like Inhibitory Protein*). Ésta contiene el dominio DED, lo que le permite unirse al prodominio de la procaspasa-8 bloqueando la interacción de dicha caspasa con los complejos receptor-proteína adaptadora e interfiriendo en el proceso apoptótico.

### Vía mitocondrial

El orgánulo mediador central de una segunda vía es la mitocondria, que también puede ser mediador de la

necrosis y de la autofagia. La importancia de estos orgánulos es manifiesta ya que defectos en la cadena de transporte electrónico pueden inducir la formación de ROS causando peroxidación lipídica y daños en la membrana [99]. En 1994 se propone a la mitocondria como una de las primeras dianas durante la apoptosis. Además de otros estudios previos puntuales que relacionaban la apoptosis y la mitocondria, en esa fecha se describen los cambios observados en las etapas iniciales de la apoptosis: el potencial de membrana mitocondrial disminuye asociado a un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y síntesis de ATP, y se reduce la traducción [100]. La permeabilidad de la membrana mitocondrial está controlada por un poro complejo conocido como el megacanal mitocondrial o el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que mantiene la homeostasis de la matriz mitocondrial. La apertura de este canal poliproteico conduce a un incremento en la permeabilidad de la membrana interna permitiendo la entrada o salida de diferentes moléculas, proceso que está estrictamente controlado. Como componentes mínimos de este poro se ha descrito a la proteína de la membrana interna ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*), a VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) de la membrana externa y la ciclofilina D de la matriz mitocondrial. Algunos miembros de la familia Bcl-2 regulan la actividad de canal de las proteínas ANT y VDAC [99,101].

Una gran parte de estímulos apoptóticos (estrés celular, drogas, radiaciones, agentes oxidantes, etc.) utilizan esta segunda ruta de señalización que se conoce como la **vía mitocondrial o intrínseca**, que está regulada por proteínas de la familia Bcl-2 (Figura 9) [102]. Los daños mitocondriales y la liberación de proteínas mitocondriales amplifican la señal apoptótica en células de mamífero; cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial causan la liberación al citoplasma de más de 40 moléculas implicadas en la apoptosis. Entre ellas se liberan de la mitocondria al citoplasma diversas proteínas apoptogénicas como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis AIF, la endonucleasa G, la proteína Smac/DIABLO (Smac: *Second mitochondria-derived activator of caspases*; DIABLO: *Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point*) y la serín-proteasa Omi/Htr A2 (**Oocyte Maturation Inhibitor/High temperature requirement protein A2**). Además, se genera un flujo de calcio y se liberan ROS.

La liberación del citocromo c es un evento crítico ya que éste interacciona con la proteína citosólica Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*). Esta última actúa como molécula adaptadora en esta vía, con dATP y, posteriormente con la pro-caspasa-9 [79,80]. Se forma el megacomplejo heptamérico conocido como **apoptosoma** que ejecuta el programa apoptótico [103]. La formación del complejo conduce a un cambio conformacional y activación de la pro-caspasa-9 que, a su vez, rompe el predominio de caspasas efectoras, como las caspasas 3, 6 y 7, activándolas. El proceso global requiere energía y que la maquinaria de la célula no esté muy dañada; si el daño alcanza ciertos niveles, la célula que ha iniciado las primeras fases de la apoptosis puede continuar su muerte vía necrosis.

Otra de las proteínas que se libera de la mitocondria es AIF (Figura 9), una oxidoreductasa mitocondrial que, a diferencia del citocromo c, una vez en el citoplasma se transloca al núcleo y activa a la PARP-I. Como resultado el DNA se fragmenta de forma independiente de la actividad de las caspasas. Cuando la proteína pro-apotótica Smac/DIABLO se libera al citoplasma, interacciona con inhibidores endógenos de las caspasas (IAP) [104] neutralizándolos y, por tanto, previniendo el bloqueo de la apoptosis.

Los daños mitocondriales se pueden originar por diversos mecanismos. Las proteínas pro-apoptóticas, como Bax y Bak, pueden interaccionan con VDAC [84]. Así, se ha descrito que en ausencia de señales apoptóticas esta proteína de la membrana externa interacciona con Bax controlando de esta forma los efectos letales que ejerce Bax. Sin embargo, si se recibe una señal de muerte, miembros de la familia Bcl-2 como Bid o Bad desplazan a VDAC. Bax y Bak se activan y la membrana mitocondrial se hace permeable, liberándose las proteínas mitocondriales apoptogénicas que activan esta ruta. Por otro lado, Bax puede cooperar con ANT formando un canal oligomérico letal en la membrana mitocondrial. Otros daños mitocondriales también pueden ser originados por la inducción de un influjo de potasio o por una interacción con la caspasa-2 (que ocurre independientemente de su actividad de caspasa).

La vía intrínseca está estrictamente controlada por miembros de la familia Bcl-2 y, principalmente, conduce a la activación de caspasa-9. Sin embargo, en

algunos tipos de células (p.e. hepatocitos), esta vía puede operar en ausencia de caspasa-9 o de su activador Apaf-1. En este caso la vía extrínseca queda interrelacionada con la intrínseca formándose un bucle de amplificación de la señal mediada por receptores de muerte. En este bucle interviene la proteína pro-apoptótica Bid que se procesa en dos fragmentos por la caspasa-8. Uno de ellos, el C-terminal (tBid), actúa sobre la mitocondria haciendo que se libere el citocromo c. Por tanto, Bid funciona como un puente de unión entre las dos vías amplificando la activación de las caspasas.

### *Otras vías de inducción de apoptosis*

La mitocondria, que juega un papel central en la vía intrínseca de la apoptosis, no es el único orgánulo subcelular implicado en la muerte celular. Los lisosomas y el retículo endoplásmico desempeñan una función importante en la liberación de otros factores de muerte como las catepsinas, calpaínas y otras proteasas. Así, el estrés de retículo endoplásmico (Figura 9) se considera como otra de las vías intrínsecas de inducción de apoptosis que se caracteriza por la alteración de la homeostasis de calcio y por la acumulación de proteínas incorrectamente plegadas. En este caso, se dispara una cascada específica de iniciación de la apoptosis con la activación de la caspasa-12 localizada en la cara citosólica del retículo endoplásmico [105,106]. La caspasa-12 activa provoca, a su vez, la activación de la caspasa-9 y ésta la de la caspasa-3, pero de una forma independiente de citocromo c por lo que esta vía no requiere la activación previa de la vía mitocondrial. Además, la liberación de calcio también induce la activación de calpaínas (proteasas neutras activadas por calcio) que normalmente están en su forma inactiva como zimógenos.

Otra vía de inducción del proceso de apoptosis se inicia cuando se produce un daño en el DNA. Las respuestas celulares a daños genéticos están mediadas por quinasas, de las que cabe destacar dos: ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y la proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PK) (Figura 9). Ambas dirigen una serie de respuestas, como la parada del ciclo celular para que se repare el DNA o, si el daño es excesivo, para que se induzca la apoptosis. El factor de transcripción p53 está implicado en este control;

regula la transcripción de distintos genes en respuesta a una gran variedad de señales de estrés (daño en el DNA, deficiencia de nutrientes, hipoxia, acortamiento de telómeros, activación de oncogenes, etc.) [107]. Cuando se produce estrés genotóxico (daño en el DNA), p53 controla procesos como la reparación del DNA, la parada del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis. La degradación de p53 se controla por interacción con diferentes proteínas, como la ubiquitina ligasa Mdm-2 (*Murine double minute-2*). La proteína p53 se regula por modificaciones post-traduccionales (acetilación, fosforilación, etc.). Una serie de quinasas, entre ellas la ATM, fosforilan a p53 en ciertos residuos o inhiben su ubiquitinización por Mdm-2; otras modificaciones posteriores como la acetilación por acetiltransferasas y la metilación por metiltransferasas estabilizan a p53 e incrementan su unión específica al DNA. Todos estos procesos incrementan la vida media de p53. El daño en el DNA induce la fosforilación de p53 y de Mdm-2 inhibiéndose la interacción de ambas proteínas, lo que conduce a una estabilización y activación de p53. Esta activación dirige la unión del tetrámero de p53 a los elementos de respuesta a p53 de los genes diana reclutando a diversos coactivadores y factores transcripcionales que, en conjunto, modularán la expresión de los genes controlados por p53. La expresión de ciertos genes implicados en diferentes procesos, como en la parada del ciclo celular por inducción del gen *p21* (un inhibidor de las proteínas quinasa dependientes de ciclina), en la reparación del DNA (gen *GADD45 $\alpha$* ), o implicados en apoptosis (inducción de *Bax* y represión de *Bcl-2*), desencadena mecanismos para que el DNA se repare o para que la célula entre en apoptosis [108]. Además, considerando la apoptosis, en algunos sistemas se ha descrito una relación entre la proteína p53 y la activación de la caspasa-2 en respuesta a un daño en el DNA lo que conduce a la muerte celular (Figura 9) [109].

Las señales de supervivencia y muerte se pueden también transmitir por vías de señalización intracelular en la que están implicadas diferentes proteínas quinasas [110]. Una de ellas es la vía de la PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) con la consecuente activación de la proteína quinasa B (PKB o Akt). Ésta puede influir en la sensibilidad de las células para responder a señales inductoras de muerte celular controlando moléculas que regulan la apoptosis (por ejemplo la caspasa-9 y Bad) o regulando la actividad

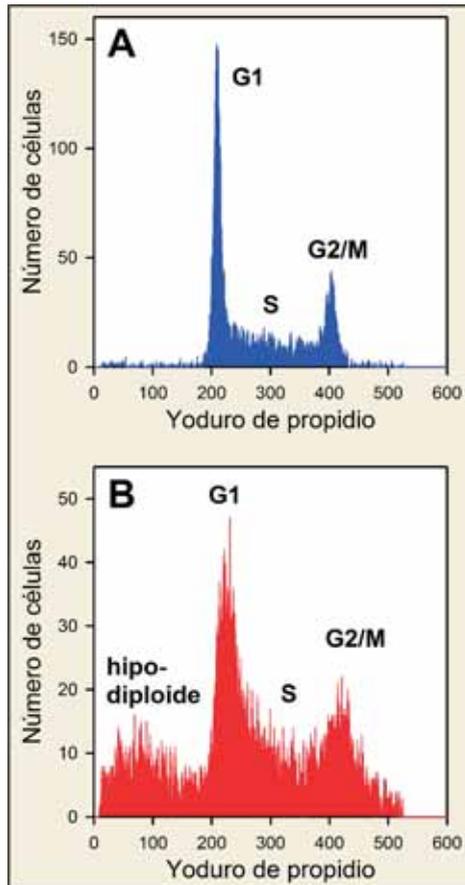
de factores transcripcionales [111]. La activación de Akt produce la fosforilación directa de Bad que se mantiene unida a la proteína 14-3-3. Por el contrario, Bad no fosforilada se une a Bcl-X<sub>L</sub> (o Bcl-2) impidiendo que ejerza su acción de supervivencia [112]. Por otro lado, la vía de las MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) está implicada en el control de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. En el punto final de la cascada, tres quinasas (JNK, ERK y p38) son capaces de responder a múltiples estímulos; la activación de éstas conduce a la fosforilación de diversas proteínas diana controlando así el estado activo o inactivo de dichas proteínas y, por tanto, su actividad biológica.

## TÉCNICAS PARA VALORAR EL PROCESO DE APOPTOSIS

Existe un conjunto variado de técnicas que permiten valorar diferentes aspectos del proceso de apoptosis, como los cambios en la membrana plasmática, la fragmentación de DNA, la activación de caspasas o la degradación de sustratos [14].

La membrana plasmática de las células que mueren es permeable a ciertos reactivos (colorantes o fluorocromos) y pueden ser teñidas con ellos. Sin embargo, las células vivas excluyen a los denominados “colorantes vitales”, que no penetran a través de la membrana plasmática. Una de estas moléculas es el yoduro de propidio (PI), que tras su unión al DNA incrementa mucho su fluorescencia bajo excitación con luz ultravioleta; el PI sólo tiñe células no viables. Sin embargo, este compuesto puede ser utilizado para detectar la cantidad de DNA en células viables mediante citometría de flujo si las células se permeabilizan, se fijan con etanol y se procesan adecuadamente de forma previa a la tinción. Así, las células no apoptóticas presentarán normalmente dos picos en citometría de flujo, que se corresponden con las fases del ciclo celular G0/G1 y G2/M, las células en fase S se localizan entre ambos picos (Figura 10A). Considerando que durante la apoptosis se produce la fragmentación del DNA, en las células apoptóticas se puede detectar un pico correspondiente a DNA hipodiploide (Figura 10B).

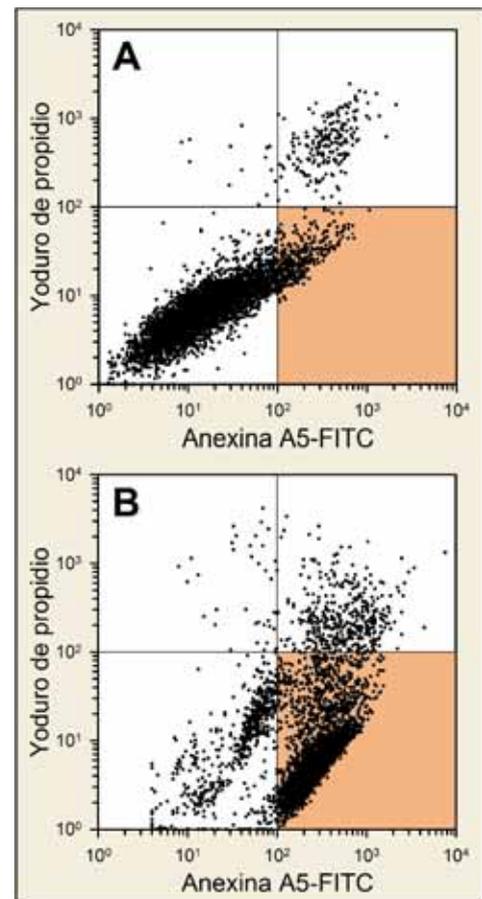
Dentro de los análisis bioquímicos, la detección temprana de apoptosis se fundamenta en la valoración



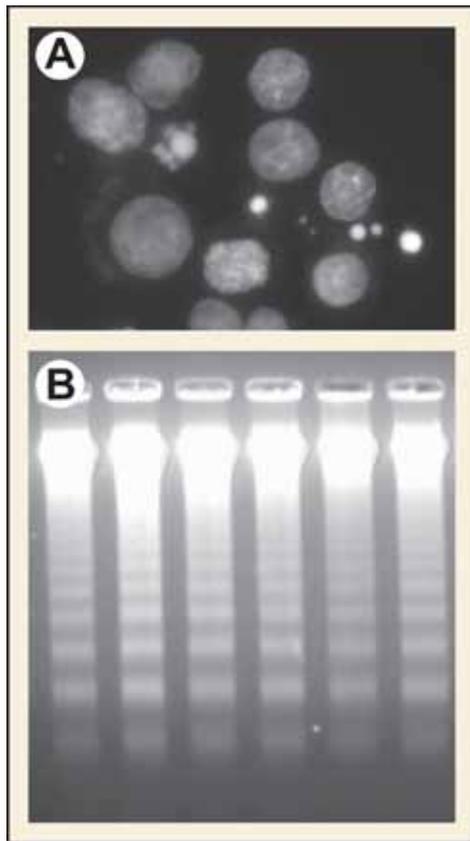
**Figura 10. Determinación de apoptosis de células en cultivo por evaluación de hipodiploidía.** La determinación de apoptosis de células en cultivo se puede realizar mediante citometría de flujo tras la permeabilización de las células y tinción del DNA con yoduro de propidio. En células normales (A), este método se puede emplear para determinar el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular: G1 (diploides), G2/M (tetraploides) y S (intermedio). En células apoptóticas (B), donde el DNA se fragmenta, es característica la presencia de un pico correspondiente a células hipodiploides.

de cambios en la localización de la fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática ya que, como se ha comentado, este fosfolípido está normalmente ubicado en la cara interna de la misma. En la apoptosis se pierde la asimetría de la membrana plasmática con la exposición de la PS en la cara externa, precediendo esta translocación a otros eventos apoptóticos [66]. Este proceso se puede cuantificar mediante citometría de flujo utilizando anexina-A5 conjugada con fluorocromos, ya que esta proteína tiene una elevada afinidad por este tipo de fosfolípido. La anexina-A5 también puede marcar a células necróticas, pero si se utiliza de forma conjunta con el PI, se puede distinguir entre células apoptóticas y necróticas (Figura 11).

La condensación de la cromatina y la presencia de cuerpos apoptóticos se puede evaluar mediante microscopía de fluorescencia tras tinción de las células con reactivos fluorescentes que sean incorporados por células viables como el naranja de acridina (NA), DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) o Hoechst 33342 (Figura 12A). Estos reactivos, utilizados junto al PI,



**Figura 11. Determinación de apoptosis por evaluación de la exposición de fosfatidilserina.** Una de las características de las células apoptóticas es la reversión de la asimetría de membrana con la consecuente exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática (sin que llegue a producir una permeabilización de la misma como ocurre en la necrosis). Esta exposición se puede cuantificar mediante citometría de flujo empleando anexina A5 marcada con FITC (esta anexina tiene elevada afinidad por este fosfolípido ácido) en conjunción con yoduro de propidio. Así, las células con fuerte marcaje con anexina A5-FITC y poca tinción con yoduro de propidio (cuadrante inferior derecho) estarían en las etapas tempranas de apoptosis mientras que las que se tiñen intensamente con ambos marcadores (cuadrante superior derecho) tendrían la membrana plasmática dañada como consecuencia de un proceso de necrosis, bien primario o bien consecuencia de la evolución letal del proceso de apoptosis. En la figura se puede observar la gran diferencia en los marcajes efectuados en células normales (A) o en células apoptóticas (B).



**Figura 12. Cuerpos apoptóticos y degradación en escalera del DNA cromosómico.** (A) En la micrografía obtenida de células apoptóticas teñidas con DAPI se pueden apreciar núcleos con un aspecto normal así como los cuerpos apoptóticos o residuos de células que han muerto por apoptosis. (B) La degradación del DNA cromosómico en las células apoptóticas tiene lugar preferentemente en las regiones internucleosomales, lo que genera fragmentos de DNA de aproximadamente 200 pares de bases o múltiplos de estos. Por este motivo, el análisis electroforético del DNA procedente de células apoptóticas suele presentar un bandeo en escalera característico y que es muy diferente de la degradación al azar que se observa en células necróticas.

permiten distinguir *in vitro* a una célula necrótica (que será positiva para PI), una en apoptosis temprana (positiva para NA, negativa para PI) o en apoptosis tardía (PI positiva pero con el núcleo fragmentado). La apoptosis tardía se conoce también como necrosis secundaria, y se detecta en los experimentos *in vitro* con células en cultivo ya que no está presente el sistema de eliminación de cuerpos apoptóticos.

La fragmentación nucleosomal del DNA genómico [42] se puede determinar por diferentes métodos, algunos de los cuales se apuntan a continuación. El análisis electroforético del DNA genómico mediante

electroforesis en geles de agarosa al 2% permite la obtención de los clásicos perfiles de “escalera de DNA” (*DNA ladder*), que corresponden a la fragmentación internucleosomal producida por endonucleasas a intervalos de 180-200 pares de bases (Figura 12B). El ensayo de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP Nick End Labeling*) es uno de los tests *in situ* basado en la unión específica de la desoxinucleotidil transferasa terminal a los extremos 3'OH de los fragmentos de DNA e incorporación a dicho extremo de dUTP marcado. También, mediante citometría de flujo se puede analizar la fragmentación del DNA utilizando anticuerpos que detectan las rupturas internucleosomales, o por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent assay*) valorar las histonas asociadas a los fragmentos de DNA.

La valoración de la activación de caspasas se puede llevar a cabo por métodos muy variados [113]. La aproximación más directa es la realización de ensayos de actividad con sustratos fluorescentes específicos para cada tipo de caspasa. De forma complementaria a estos ensayos, se puede determinar si se ha producido la activación de caspasas mediante *Western blot* analizando si ciertos sustratos específicos se han procesado proteolíticamente (por ejemplo, PARP-1, topoisomerasa I, citoqueratina-18 o laminas A y C). También se puede evaluar si las propias caspasas han sufrido este proceso de activación proteolítica requerido para la formación de las subunidades que conforman la enzima activa. La detección de la activación de algunas caspasas también se puede realizar mediante inmunofluorescencia o citometría de flujo empleando anticuerpos que reconocen exclusivamente la conformación activa de las mismas. Estos anticuerpos, al ser sensibles a conformación, no pueden ser empleados en *Western blot*. Por último, se pueden utilizar también marcajes de afinidad específicos para el centro activo de algunas caspasas. Estos análogos de sustrato contienen un grupo inhibitorio y otro que permite la detección (por ejemplo, biotina, fluoresceína o 2,4-dinitrofenol) bien en células (inmunofluorescencia o citometría de flujo) o tras transferencia a membranas.

Existen métodos adicionales para la detección de apoptosis que permiten la valoración de mediadores específicos en la membrana plasmática (como los distintos receptores de muerte o la ceramida), la disfunción mitocondrial asociada a una disminución en el

potencial de membrana (detectable mediante citometría de flujo con sondas fluorescentes específicas como la Rodamina-123), la permeabilización de la membrana mitocondrial con liberación de marcadores específicos (como el citocromo c, o la proteína mitocondrial Smac/DIABLO), o la detección de proteínas o factores pro- o anti-apoptóticos (como distintos miembros de la familia Bcl-2, AIF, Apaf-1, proteínas de choque térmico, etc.) empleando anticuerpos específicos para inmunohistoquímica o *Western blot*.

## TIPOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Numerosas evidencias experimentales ponen de manifiesto que la apoptosis no es el único mecanismo de suicidio celular. Dependiendo del tipo celular y del tipo de estímulo de muerte, cuando las células están preparadas para morir éstas pueden seleccionar entre distintas vías de muerte. En la Tabla V se recogen varias formas de estas vías, según han sido clasificadas por diferentes autores, y sólo se comentarán ciertos aspectos de alguna de ellas.

Estudios morfológicos sobre el desarrollo de vertebrados permitieron en 1973 definir tres tipos de muerte celular fisiológica: heterofagia, autofagia y muerte no lisosomal. Estos tres tipos pueden distinguirse en función de la localización y papel de los lisosomas [6,7]. La heterofagia corresponde a lo que hoy conocemos como apoptosis. En una publicación reciente [1], además de la apoptosis, como muerte celular programada también se considera la autofagia, la necrosis y la muerte mediada por PARP-1.

La autofagia, proceso catalítico conservado a lo largo de la evolución e implicado en la remodelación tisular durante el desarrollo, es una ruta de degradación celular implicada en la eliminación tanto de orgánulos subcelulares como de proteínas, dañados o superfluos. Este proceso también se utiliza como mecanismo de defensa frente a una invasión viral y bacteriana. La autofagia, como mecanismo de supervivencia, hace que los constituyentes celulares se reciclen proporcionando una fuente de energía alternativa durante períodos de estrés metabólico y participa, de esta forma, en el mantenimiento de la homeostasis y viabilidad celular [8]. Se ha observado

una excesiva degradación con signos de autofagia en células que mueren, por lo que la **autofagia** (“comerse a uno mismo”, del griego *auto* “actuar sobre si mismo” y *phagos* “comer”) se ha clasificado como una forma alternativa de muerte celular programada. Esto ocurre, por ejemplo, en algunos sistemas en condiciones de deficiencia en nutrientes por lo que grupos de células asociadas o tejidos mueren. A nivel molecular se ha propuesto que puede existir una maquinaria de respuesta con rutas comunes entre la apoptosis y la autofagia. Aunque la relación entre los dos procesos es compleja, la célula, en función de las señales que recibe, puede morir por cualquiera de estas dos vías o por una combinación de las mismas [10]. Es más, la autofagia podría asumir el papel de ruta suicida cuando algún componente de la apoptosis falle. De hecho, la inhibición de la apoptosis, bloqueando la actividad de las caspasas, conduce a una muerte celular por autofagia produciéndose una acumulación de ROS debido a la degradación de la catalasa, a peroxidación lipídica y a pérdida de la integridad de la membrana plasmática [10]. La autofagia se caracteriza por la presencia en el citoplasma de vesículas de doble membrana en las que se engloban los componentes celulares, llamadas autofagosomas, cuyo contenido es degradado por enzimas lisosomales una vez fusionados los autofagosomas con los lisosomas. La base molecular de este proceso no se conoce tan exhaustivamente como la de la apoptosis, pero los estudios sobre la pérdida de función de genes han permitido enclavarla tanto como un mecanismo de muerte celular como de supervivencia, y relacionarla con procesos patológicos (cáncer, neurodegeneración, envejecimiento e inmunidad) [114,115].

Una diferencia entre apoptosis y autofagia reside en la ejecución de dichos programas. La activación de caspasas y la condensación y fragmentación del DNA es característica de apoptosis, mientras que la autofagia transcurre por proteólisis asociada a la vía de la ubiquitina y el DNA no se fragmenta [7]. Sin embargo, las diferencias no son tan claras ya que en algunos sistemas se ha descrito que la degradación vía ubiquitina también es característica de la apoptosis, existiendo otras similitudes entre ambos procesos, como el efecto del inhibidor de caspasas p35 que también bloquea la autofagia. Aunque la maquinaria molecular sólo está parcialmente elucidada, se han descrito grupo de genes conocidos como *ATG* (*Autophagy-related*), conser-

TABLA V: Tipos de muerte celular	
Referencia	Tipo de muerte
Degtrev y Yuan [1] Clasificación en función de la regulación del proceso, de diferencias en inducción de la muerte celular y moléculas implicadas en su ejecución.	Muerte celular no regulada: NECROSIS  Muerte celular regulada: APOPTOSIS (Tipo I) AUTOFAGIA (Tipo II) NECROPTOSIS Muerte mediada por PARP-1
Bröker, Knuyt y Giaccone [90] Clasificación según la implicación de las caspasas.	Vía dependiente de caspasas: APOPTOSIS  Vías independientes de caspasas NECROSIS AUTOFAGIA PARAPTOSIS CATÁSTROFE MITÓTICA MUERTE LENTA
Bröker, Knuyt y Giaccone [90] Tipos de muerte celular en función de la morfología nuclear.	NECROSIS APOPTOSIS De tipo NECROSIS De tipo APOPTOSIS
Majno y Joris [51] Revisión del desarrollo del concepto de muerte celular.	NECROSIS (muerte accidental) APOPTOSIS ONCOSIS
Kroemer y colaboradores [118] Tipos de muerte celular basados en los mecanismos que conducen a distintas morfologías.	NECROSIS APOPTOSIS AUTOFAGIA CATÁSTROFE MITÓTICA ANOIKIS EXCITOTOXICIDAD DEGENERACIÓN WALLERIANA CORNIFICACIÓN

vados desde las levaduras a los humanos, implicados en la supervivencia y en la muerte. El producto de uno de estos genes, la beclina-1 tiene un dominio BH3 por el que interacciona con la proteína Bcl-2, lo que refleja una regulación convergente de apoptosis y autofagia [1].

Además de la apoptosis y la autofagia, otro tipo de muerte es la **necroptosis**, que se desarrolla con las características morfológicas de la necrosis pero de una forma programada [1]. Se ha descrito que se produce cuando las caspasas están bloqueadas por inhibidores, o en el caso en que se hayan producido mutaciones en los genes de las caspasas o en los de otras proteínas implicadas en la apoptosis. Se puede inducir específi-

camente a través de señales desde la membrana, por la unión de un ligando a los receptores de muerte TNFR, y está regulada por mecanismos de señalización intracelular a través de una cascada de quinasas. Entre otros procesos, se activa una proteína adaptadora, RIP-1, que contiene dominios DD y tiene actividad de tirosina quinasa. Ésta se transloca a la mitocondria interfiriendo con ANT, componente del megacanal mitocondrial, lo que conlleva una disfunción mitocondrial, un incremento en la producción de ROS y una activación de la quinasa JNK. Aunque el orden de las etapas posteriores a la activación de RIP-1 no se conocen bien, se han descrito varias alteraciones como una activación de la fosfolipasa A2, de lipooxigenasas y de la esfingomielasa ácida. Otro tipo de muerte pro-

gramada es la **mediada por PARP-1** [1] como parte de la respuesta al daño producido en el DNA, por falta de nutrientes o energía, o en respuesta a una infección por patógenos. Esta vía puede desarrollar una función complementaria o reforzar a la apoptosis. La enzima PARP-1 participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica y se activa cuando se produce una rotura en una cadena de DNA. Para reparar dicha mella, esta enzima recluta a factores encargados de la reparación del DNA uniendo unidades de ADP-ribosa a proteínas asociadas a la cromatina. Aunque el mecanismo molecular no se conoce demasiado, si la reparación falla, los efectos finales que conducen a este tipo de muerte celular se pueden resumir en la activación de dos rutas: una produce un colapso energético y la otra, a través de RIP y JNK, a una disfunción mitocondrial y liberación del factor AIF.

En función de la participación de las caspasas, se han descrito otros modelos de muerte celular programada de los que, en algún caso, no se conoce demasiado [116]. La **paraptosis** se caracteriza por la presencia de vacuolas en el citoplasma que comienza con un hinchamiento de las mitocondrias y el retículo endoplásmico. Está mediada por MAPK, por algún miembro de los receptores de muerte y por el receptor del factor 1 de crecimiento de tipo insulina y se inhibe por moléculas que no inhiben a la apoptosis [117]. La **catástrofe mitótica** se produce por un fallo en la mitosis, causado por una falta de control de los puntos de restricción del ciclo celular. Se ha descrito que está asociada a una permeabilización de la membrana mitocondrial y la participación de las caspasas en este tipo de muerte está todavía en debate.

Los programas de muerte celular revisten una importancia esencial en el desarrollo y en la vida adulta de un organismo. La célula dispone de un amplio espectro de posibilidades para morir, con un complejo escenario de moléculas implicadas que colaboran en el proceso. Por ello, no es de extrañar que muchas veces los conceptos y la nomenclatura no se utilicen de forma correcta. Para unificar criterios, el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular [118] ha establecido una serie de criterios para definir los distintos tipos de muerte celular (Tabla V), considerando diferentes mecanismos y morfologías, para poder así utilizar una terminología correcta y generalizable.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Degterev A. y Yuan J. (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 378-390.
2. Vaux D.L. y Korsmeyer S.J. (1999) Cell death in development. *Cell.* 96, 245-254.
3. Kerr J.F., Wyllie A.H. y Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26, 239-257.
4. Vaux D.L., Weissman I.L. y Kim S.K. (1992) Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258, 1955-1957.
5. Hengartner M.O. y Horvitz H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 76, 665-676.
6. Schweichel J.U. y Merker H.J. (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266.
7. Baehrecke E.H. (2002) How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 779-787.
8. Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A. y Kroemer G. (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 741-752.
9. Yu L., Wan F., Dutta S., Welsh S., Liu Z., Freundt E., Baehrecke E.H. y Lenardo M. (2006) Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4952-4957.
10. Debnath J., Baehrecke E.H. y Kroemer G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1, 66-74.
11. Mackay I.R., Leskovsek N.V. y Rose N.R. (2008) Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun.* 30, 5-11.
12. Aubert G. y Lansdorp P.M. (2008) Telomeres and aging. *Physiol Rev.* 88, 557-579.
13. McLean J.E., Ruck A., Shirazian A., Pooyaei-Mehr F. y Zakeri Z.F. (2008) Viral manipulation of cell death. *Curr Pharm Des.* 14, 198-220.
14. Huerta S., Goulet E.J., Huerta-Yepez S. y Livingston E.H. (2007) Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 139, 143-156.
15. Savill J. y Fadok V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788.
16. Hedgecock E.M., Sulston J.E. y Thomson J.N. (1983) Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220, 1277-1279.
17. Ellis R.E., Jacobson D.M. y Horvitz H.R. (1991)

- Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129, 79-94.
18. Ravichandran K.S. y Lorenz U. (2007) Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol.* 7, 964-974.
  19. Cajal S.R. (1911) Los fenómenos precoces de la degeneración neuronal en el cerebelo. *Trabajos del Laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid, Tomo IX*, 1-38.
  20. Vogt C. (1842) *Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkroete (Alytes obstetricians)*. Solothurn: Jent und Gassman, pp 130.
  21. Weismann A. (1864) Die nachembryonale Entwicklung der Musciden nach Beobachtungen an *Musca vomitoria* und *Sarcophaga carnaria*. *Z Wiss Zool.* 14, 187-336.
  22. Stieda L. (1872) Die Bildung des Knochengewebes. *Festschrift des Naturforschervereins zu Riga zur Feier des fünfzigjährigen Bestehens der Gesellschaft practischer Aertze zu Riga*. Engelmann, Leipzig.
  23. Metschnikoff E. (1883) Untersuchungen über die mesodermalen Phagocyten einiger Wirbeltiere. *Biol Zentralb.* 3, 560-565.
  24. Flemming W. (1885) Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Arch Anat Physiol.* 221-244.
  25. Nissen F. (1886) Über das Verhalten der Kerne in den Milch-drüsen zellen beider Absonderung. *Arch Mikroskop Anat.* 26, 337-342.
  26. Felix W. (1889) Ueber Wachsthum der quergestreiften Muskulatur nach Beobachtungen am Menschen. *Z. Wiss Zool.* 48, 224-259.
  27. Beard J. (1889) On the early development of *Lepidosteus osseus*- preliminary notice. *Proc R Soc Lond.* 46, 108-118.
  28. Arnheim G. (1890) Coagulations nekrose und Kernschwund. *Virchows Arch Pathol Anat.* 120, 367-383.
  29. Collin R. (1906) Histolyse de certains neuroblastes au cours du développement du tube nerveux chez le poulet. *CR Soc Biol.* 60, 1080-1081.
  30. Recklinghausen F. von (1910) Untersuchungen über Rachitis und Osteomalacie. Jena, Verlag Gustav Fischer.
  31. Graper L. (1914) Eine neue Anschauung Oberphysiologische Zellausschaltung *Arch Zellforsch.* 12, 373-394.
  32. Hamburger V. (1934) The effects of wing bug extirpation in chick embryos on the development of the central nervous system. *J Exp Zool.* 68, 449-494.
  33. Hamburger V. y Levi-Montalcini R. (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool.* 111, 457-501.
  34. Glucksmann A. (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev.* 26, 59-86.
  35. De Duve C. y Beaufay H. (1959) Tissue fractionation studies. Influence of ischaemia on the state of some bound enzymes in rat liver. *Biochem J.* 73, 610-616.
  36. Bellairs R. (1961) Cell death in chick embryos as studied by electron microscopy. *J Anat.* 95, 54 -60.
  37. Lockshin R. y Williams C. (1965) Programmed cell death. II. Endocrine presentation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 11, 803-809.
  38. Saunders J.W. Jr. (1966) Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612.
  39. Tata J.R. (1966) Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol.* 13, 77-94.
  40. Skalka M., Matyasova J. y Cejkova M. (1976) DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades in vivo into regular fragments. *FEBS Lett.* 72, 271-274.
  41. Farber E. y Fisher M.M. (1979) *Toxic Injury of the Liver, part A*. New York, Marcel Dekker.
  42. Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L. y Dunlop D. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 142, 67-77.
  43. Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
  44. Sulston J.E. y Brenner S. (1974) The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 95-104.
  45. Sulston J.E. (1976) Post-embryonic development in the ventral cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc London Ser. B* 275, 287-298.
  46. Horvitz H.R., Ellis H.M. y Sternberg P.W. (1982) Programmed cell death in nematode development. *Neurosci Comment.* 1, 56 -65.
  47. Ellis H.M. y Horvitz H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.
  48. Hengartner M.O., Ellis R.E. y Horvitz H.R. (1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.
  49. Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M. y Horvitz H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
  50. del Peso L., González V.M. y Núñez G. (1998) *Caenorhabditis elegans* EGL-1 disrupts the interaction of CED-9 with CED-4 and promotes CED-3 activation. *J Biol Chem.* 273, 33495-33500.
  51. Majno G. y Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis, and

- necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146, 3-15.
52. Clarke P. G. H. y Clarke S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and Embryology.* 193, 81-99.
  53. Vaux D.L. (2002) Apoptosis timeline. *Cell Death Differ.* 9, 349-354.
  54. Hamburger V. (2004) History of the discovery of neuronal death in embryos. *Journal of Neurobiology.* 23, 1116 -1123.
  55. Metzstein M.M., Stanfield G.M. y Horvitz H.R. (1998) Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.* 14, 410-416.
  56. Putcha G.V. y Johnson E.M. Jr. (2004) Men are but worms: neuronal cell death in *C. elegans* and vertebrates. *Cell Death Differ.* 11, 38-48.
  57. Fadeel B. y Orrenius S. (2005) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 258, 479-517.
  58. Bredesen D.E., Rao R.V. y Mehlen P. (2006) Cell death in the nervous system. *Nature* 44, 796-802.
  59. Viktorsson K., Lewensohn R. y Zhivotovsky B. (2005). Apoptotic pathways and therapy resistance in human malignancies. *Adv Cancer Res.* 94, 143-196.
  60. Vaux D.L., Cory S. y Adams J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B-cells. *Nature* 335, 440-442.
  61. Cerretti D.P., Kozlosky C.J., Mosley B., Nelson N., y col. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 256, 97-100.
  62. Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T. y col. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
  63. Yonehara S., Ishii A. y Yonehara M. (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 169, 1747-1756.
  64. Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K.M. y Krammer P.H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
  65. Itoh N., Yonehara S., Ishi A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Sato Y. y Nagata S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66, 233-243.
  66. Faddok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.L., Bratton D.L. y Henson P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 148, 2207-2216.
  67. Yonish R.E., Resnitzky D., Loten J., Sachs L., Kimch A. y Oren M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 353, 345-347.
  68. Chiou S.K., Rao L. y White E. (1994) Bcl-2 blocks p53 dependent apoptosis. *Mol Cell Biol.* 14, 2556-2583.
  69. Suda T., Takahashi T., Golstein P. y Nagata S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
  70. Suda T. y Nagata S. (1994) Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med.* 179, 873-879.
  71. Clem R.J., Fechheimer M. y Miller L.K. (1991) Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.
  72. Crook N.E., Clem R.J. y Miller L.K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.* 67, 2168-2174.
  73. Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvensen G., Thornberry N.A., Wong W.W. y Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* 87, 171.
  74. Liu X.S., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. y Wang X.D. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts – requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
  75. Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. y Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.
  76. Cory S., Huang D.C. y Adams J.M. (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
  77. Taylor R.C., Cullen S.P. y Martin S.J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 231-241.
  78. Youle R.J. y Strasser A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 47-59.
  79. Motyl T. (1999) Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. *Reprod Nutr Dev.* 39, 49-59.
  80. Konopleva M., Zhao S., Xie Z., Segall H., Younes A., Claxton D.F., Estrov Z., Kornblau S.M. y Andreeff M. (1999) Apoptosis. *Molecules and mechanisms.* *Adv Exp Med Biol.* 457, 217-236.
  81. Hengartner M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407, 770-776.
  82. Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettlesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.L. y Fesik

- S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381, 335-341.
83. Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Funahashi Y., Mignon A., Lacronique V., Matsuda H. y Tsujimoto Y. (1998) Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 1455-1459.
84. Gogvadze V., Orrenius S. y Zhivotovsky B. (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1757, 639-647
85. Sharpe J.C., Arnoult D. y Youle R.J. (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*. 1644, 107-113.
86. Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H. y Tsujimoto Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 14681-14686.
87. Earnshaw W.C., Martins L.M. y Kaufmann S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 68, 383-424.
88. Stennicke H.R. y Salvesen G.S. (1998) Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*. 1387, 17-31.
89. Salvesen G.S. y Dixit V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91(4), 443-6.
90. Meister N., Shalaby T., von Bueren A.O., Rivera P., Patti R., Oehler C., Pruschy M. y Grotzer M.A. (2007) Interferon-gamma mediated up-regulation of caspase-8 sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy. *Eur J Cancer*. 43, 1833-1841.
91. Callus B.A. y Vaux D.L. (2007) Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ*. 14, 73-78.
92. Bröker L.E., Kruyt F.A. y Giaccone G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*. 11, 3155-3162.
93. Deveraux Q.L., Stennicke H.R., Salvesen G.S. y Reed J.C. (1999) Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol*. 19, 388-398.
94. Vaux D.L. y Silke J. (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(4), 287-97.
95. Ashkenazi A. y Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.
96. Danial N.N. y Korsmeyer S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
97. Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A. y col. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
98. Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Kramer P.H. y Peter M.E. (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J*. 16, 2794-2804.
99. Orrenius S. (2007) Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*. 39, 443-455.
100. Vayssiere J.L., Petit P.X., Risler Y. y Mignotte B. (1994) Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 11752-11756.
101. Bras M., Clément M.V., Pervaiz S. y Brenner C. (2005) Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*. 20, 205-219.
102. Bras M., Queenan B. y Susin S.A. (2005) Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 70, 231-239.
103. Riedl S.J. y Salvesen G.S. (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 405-413.
104. Anguiano-Hernandez Y.M., Chartier A. y Huerta S. (2007) Smac/DIABLO and colon cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 7, 467-473.
105. Shiraiishi H., Okamoto H., Yoshimura A. y Yoshida H. (2006) ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci*. 119, 3958-3966.
106. Morishima N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T. y Yasuhiko Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*. 277, 34287-34294
107. Riley T., Sontag E., Chen P. y Levine A. (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 402-412.
108. Kuribayashi K. y El-Deiry W.S. (2008) Regulation of programmed cell death by the p53 pathway. *Adv Exp Med Biol*. 615, 201-221.
109. Zhivotovsky B. y Orrenius S. (2005) Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 331, 859-867.
110. Yuan J. y Yankner B.A. (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-809.
111. Downward J. (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*. 15, 177-182.
112. Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. y Korsmeyer S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87(4), 619-628.
113. Kaufmann S.H., Lee S.H., Meng X.W., Loegering

- D.A., Kottke T.J., Henzing A.J., Ruchaud S., Samejima K. y Earnshaw W.C. (2008) Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods* 44, 262-272.
- 114.** Mathew R., Karantza-Wadsworth V. y White E. (2007) Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 7, 961-967.
- 115.** Uchiyama Y., Shibata M., Koike M., Yoshimura K. y Sasaki M. (2008) Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol.* 129, 407-420.
- 116.** Bröker L.E., Kruyt F.A. y Giaccone G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 11, 3155-3162.
- 117.** Sperandio S., Poksay K., de Belle I., Lafuente M.J., Liu B., Nasir J. y Bredesen D.E. (2004) Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ.* 11, 1066-1075.
- 118.** Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E. y col (2005) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2, 1463-1467.