



Regulación de la autofagia celular por miembros de la familia BCL-2 en células apoptóticas

Tesis doctoral

RAQUEL VILLAMUERA DEL SORDO

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL
CÁNCER

CSIC-UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Salamanca, abril 2022



Dr. Felipe Xosé Pimentel Muiños, Científico Titular del Consejo de Investigaciones Científicas y miembro del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca),

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Regulación de la autofagia celular por miembros de la familia BCL-2 en células apoptóticas”** presentada por **Raquel Villamueva del Sordo**, ha sido realizada bajo su dirección en el IBMCC, y reúne, a su juicio, la originalidad y los contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado:

Salamanca a 28 de abril de 2022

La financiación para la realización de este trabajo de tesis doctoral procede de proyectos concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2014-53320-R y SAF2017-88390-R), Broad Medical Foundation (IBD-0369), Junta de Castilla y León (FIC016U14, SA042P17), Asociación Española Contra el Cáncer (Ideas Semilla, IDEAS18093PIME) y Fundación Solórzano (FS17/2016). La doctoranda Dña. Raquel Villamueva del Sordo ha recibido financiación de la Junta de Castilla y León (Consejería de Educación, Programa de Ayudas para la Contratación de Personal Investigador cofinanciadas por el Fondo Social Europeo, Orden del 10 de noviembre de 2016, 07/2017-06/2021).

Agradecimientos

Este trabajo de tesis realizado en el Centro de Investigación del Cáncer no hubiese sido posible sin la financiación proporcionada por la Junta de Castilla y León. Sin embargo, para llevar a cabo una tesis doctoral no solo se necesita soporte económico sino también apoyo profesional y emocional. Por ello quiero aprovechar este espacio para mostrar mi agradecimiento a todas las personas que han fomentado este trabajo.

En primer lugar, gracias a mi director de tesis por darme la oportunidad de participar en este y otros proyectos y transmitirme la ilusión por sacar adelante este trabajo.

Gracias, a todos mis compañeros y amigos del CIC. Sois todos increíblemente trabajadores e inteligentes; espero que también la ciencia reconozca vuestras valiosas capacidades.

Gracias a Inma, que ha sido mi trébol de 4 hojas. Desde el principio hicimos un tándem perfecto y jamás dejaremos de serlo porque ahora no somos compañeras sino familia. Gracias también a tus padres por transmitirnos tanto apoyo y amor y a Jesús por respetar y entender la ciencia mejor que nosotras mismas, ¡Realmente admirable!

Gracias a Miguel, mi palentino favorito, por aportarme un punto de apoyo en Salamanca, dentro y fuera del CIC. Encontrarme contigo me hizo sentir como en casa. Agradezco infinitamente cada una de tus sonrisas y palabras.

Gracias a mis antiguos compañeros del L18-L411. A Álvaro, gracias a tus momentazos he tenido días realmente felices que han hecho esta etapa especial. A Elena, hemos coincidido poco tiempo, pero hemos aprendido juntas a lidiar con las frustraciones del día a día, gracias por seguir con “nuestro” proyecto, te deseo mucha suerte. A JL, mi único compañero post-doctoral, gracias por compartir conmigo conversaciones tan liberadoras para los dos. A mis chicas Claudia y Ángela, todos os hemos echado de menos cada día, llenabais el laboratorio de frescura, estoy muy orgullosa de vosotras, sin duda sois buenas científicas, pero sobre todo tenéis un corazón inmenso.

Gracias a Sara, ¡Qué importante eres para mí!, nuestros momentos de locura me han dado la mayor de las corduras. Gracias por ser incansable en el trabajo y proporcionarme siempre facilidades en el mío.

Gracias a Ana, quiero que sepas que siempre he querido ser como tú, incluso sin conocerte. Me llevo una amiga para siempre.

Gracias a Ángel, por aguantar mi inexperiencia y por horas y horas de amenas charlas. Después de tantas horas contigo podrías escribir estos agradecimientos en mi lugar.

Infinitas gracias a mi madre, amiga y compañera, por no soltarme de la mano ante las dificultades y ayudarme a mantener el equilibrio. Suerte es contar contigo, saber que tengo tu apoyo y cariño. Sin duda, tú eres mi referente y mi felicidad; lo único que verdaderamente deseo es seguir caminando juntas.

Gracias a Andrés, nos encontramos en un momento inesperado y sin saberlo éramos imprescindibles el uno para el otro, gracias a la confianza que tienes en mí, he ido creciendo día a día desde ese instante. Contigo tengo garantizada una vida con más sumas que restas, sin importarte mis incapacidades, invisibles para otros, pero tan presentes para nosotros en nuestro día a día. Gracias también a su familia por hacernos sentir, tanto a mi madre como a mí, parte de ellos y compartir con nosotras todo su cariño. En especial a Isabel por recordarme la trascendencia maravillosa de los abuelos. Esto me lleva a mencionar a los míos, con los que me hubiese gustado coincidir más en esta vida, aun así, gracias a mis padres, siento que les conozco a la perfección y sé que tengo en mí, un pedacito de cada uno de ellos.

Gracias a mis primas, que en tantas ocasiones han ejercido el papel de hermanas, ellas saben todo lo que significan para mí, sin duda no podría imaginar un solo día sin cada una de ellas.

Gracias también a mis amigos de “toda la vida” por seguir conmigo incluso cuando ni yo estaba para mí, por sostener mis malas rachas y por liberar mi esencia cada una de las veces que estoy a vuestro lado. #cañadassiempre #instagpatio.

Gracias a mis personas faro, Aitana, Belén, Cristina y Elena. Sois el corazón, la valentía, el talento y la belleza en persona.

Gracias a #VDL, especialmente a Pablo, por ser un amigo de los que sigue llamando para preguntar «¿Cómo estás?»

Gracias a mis fisioterapeutas, gracias a vuestra dedicación he recuperado la esperanza y la ilusión de ser mi “nueva” mejor versión.

A todas las personas que me han regalado su tiempo y afecto a lo largo de estos 6 años, este trabajo también os pertenece.

Y a ti, Salamanca, mil veces GRACIAS.

«La ciencia nos enseña, en efecto, a someter nuestra razón a la verdad y a conocer y juzgar las cosas tal como son, es decir, como ellas mismas eligen ser y no como quisiéramos que fueran».

Miguel de Unamuno

A mi madre,

A mi padre,

A mi hermana.

Índice

Abreviaturas	17
--------------------	----

Introducción

1.Introducción a la muerte celular	29
2.Maquinaria apoptótica: procesos moleculares básicos	31
2.1 Familia Bcl-2:.....	31
2.2 Receptores de muerte y sus ligandos:	34
2.3 Procesos moleculares:	35
2.4 Apaf-1, apoptosoma y su relación con la activación de la caspasa 9:.....	38
2.5 Otros factores:.....	39
3. Señalización apoptótica	42
3.1 Intrínseca mitocondrial:	42
3.2 Intrínseca reticular:.....	44
3.3 Extrínseca o vía receptor de muerte:	45
4. Apoptosis en cáncer	47
5. Introducción a la autofagia	49
6. Maquinaria autofágica, ATGs: ATG16L1. Dominio WD estructura y función	51
7. Mitofagia	56
8. Conexión entre apoptosis y autofagia	57
8.1 Regulación de la apoptosis por proteínas específicas de autofagia y viceversa:	58
8.2 Activación de caspasas en la membrana del autofagosoma:.....	60
8.3 Regulación de la apoptosis por degradación autofágica:	61
9. Muerte celular inmunogénica (ICD)	61
9.1 Introducción a ICD:.....	61
9.2 ICD, cáncer e inmunoterapia:	66

Referencias bibliográficas.....	73
---------------------------------	----

Figuras

Figura 1. Estructura en dominios de los miembros de la familia BCL-2.....	34
--	----

Figura 2. Esquema simplificado sobre la implicación de la activación BAK y BAX.....	43
Figura 3. Sinopsis gráfica de la unión del receptor FAS a su ligando.....	46
Figura 4. Esquema general de los miembros que conforman la maquinaria molecular autofágica.....	53
Figura 5. Imagen representativa del mecanismo de acción de las terapias anticancerígenas con anticuerpos monoclonales anti-PD1.....	68

Abreviaturas

µg: microgram, microgramo

µl: microliters, microlitros

µM: micromolar

µm: micrometer, micrómetro

A

aa: amino acid, aminoácido

AATs: tumor associated antigens, antígenos asociados a tumores

Ab: antibody, anticuerpo

AIF: apoptosis inducing factor, factor inductor de apoptosis

AKT1: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase 1, serina/treonina proteína quinasa 1

AMP: adenosine monophosphate, adenosín monofosfato

ANXA1: Annexin A, Anexina A1

Apaf-1: apoptotic protease activating factor 1, factor activador de proteasas apoptóticas

APP: amyloid precursor protein, proteína precursora amiloide

APS: ammonium persulfate, persulfato amónico

ASK1: apoptosis signal-regulating kinase-1, quinasa 1 reguladora de la señal apoptótica

ATF6: activating transcription factor 6, factor 6 de activación transcripcional

ATGX: autophagy-related gene X, gen relacionado con autofagia X

ATP: adenosine triphosphate, adenosina trifosfato

B

BAD: BCL-2-associated death promoter, Inductor de muerte asociado a BCL-2

Baf: bafilomycin A1, bafilomicina A1

BAK: BCL-2 homologous antagonist killer, asesino antagonista homólogo de BCL-2

BAX: BCL-2-associated X protein, proteína X asociada a BCL-2

BCL-2: B-cell lymphoma 2, linfoma 2 de células B

BCL-W: B-cell lymphoma-W, linfoma W de células B

BCL-X_L: B-cell lymphoma-extra large, proteína de linfoma de células B extra-grande

BFL1-A1: BCL-2-related protein A1, proteína A1 relacionada con BCL-2

BH: BCL-2 homology, dominio de homología de las proteínas de la familia de BCL-2

BID: BH3-interacting domain death agonist, agonista letal que interacciona mediante dominios BH3

BIM: BCL-2-like protein 11, BCL-2L11

BOK: BCL-2-related Ovarian Killer, asesino ovárico relacionado con la familia de BCL-2

BSA: bovine serum albumin, seroalbúmina bovina

C

CARD: caspase recruitment domain, dominio de reclutamiento de caspasas

Cas9: CRISPR associated protein 9, proteína 9 asociada a CRISPR

c-FLIP: cellular FLICE inhibitory protein, inhibidor celular proteico de FLICE

CIP: calf-intestinal alkaline phosphatase, fosfatasa intestinal alcalina de ternero

cm: centimeter, centímetro

CMA: chaperone-mediated autophagy, autofagia mediada por chaperonas

co-IP: co-immunoprecipitation, co-inmunoprecipitación

CrmA: cytokine response modifier A, modificador de respuesta de citoquinas A

CRT: calreticulin, calreticulina

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4, antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos

D

dADP: deoxyadenosine diphosphate, desoxiadenosina difosfato

DAMPs: damage-associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a daño

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-diamidino-2 fenilindol

dATP: deoxyadenosine triphosphate, desoxiadenosina trifosfato

DD: death domain, dominio de muerte

DED: dead effector domain, dominio efector de muerte

DFCP1: double FYVE-containing protein 1, proteína 1 que contiene un doble dominio FYVE

DISC: death-inducing signaling complex, complejo de señalización que induce la muerte

DKO: double knockout, doble mutante nulo

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium, medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimethyl sulfoxide, dimetilsulfóxido

DN: dominant negative, dominante negativo

DNA/cDNA: deoxyribonucleic acid/complementary DNA, ácido desoxirribonucleico/DNA complementario

DR-X: death receptor-X, receptor de muerte X

E

EAs: adverse effects, efectos adversos

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilendiaminotetraacético

EF1 α : human elongation factor-1 α , factor 1 α de elongación humano

E-GFP: enhanced green fluorescent protein, proteína verde fluorescente mejorada

eIF5: eukaryotic translation initiation factor, factor iniciador de la traducción eucariota

ER: endoplasmic reticulum, retículo endoplásmico

ERLIN: endoplasmic reticulum lipid raft protein, proteína de balsas lipídica asociada a retículo endoplasmático

F

FADD: Fas-associated protein with death domain, proteína asociada a Fas con dominio de muerte

Fas/APO/CD95/DR2: tumor necrosis factor receptor superfamily member 6, miembro 6 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral

FasL: Fas ligand, ligando de FAS

FDA: Food and Drug Administration, Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FIP200: focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD, proteína de 200 kDa que interactúa con la familia de quinasas de adhesión focal

FL: full length, longitud complete

G

GDP: guanosine diphosphate, guanosín difosfato

GFP: green fluorescent protein, proteína verde fluorescente

GSDMD: Gasdermin D, Gasdermina D

GSDME: Gasdermin E, Gasdermina E

GSH: glutathione, glutatión

GST: glutathione S transferase, glutatión S-transferasa

GTP: guanosine triphosphate, guanosín trifosfato

H

HCT116: human colon cancer cell 116, células de carcinoma de colon humano 116

HEBS: HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) - buffered saline, buffer salino HEPES- (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-(1)] etanosulfónico)

HEK-293T: human embryonic kidney 293 cells transformed with large T antigen (SV40, simian virus 40), células 293 embrionarias de riñón humano transformadas con el antígeno T del virus SV40 (virus 40 del simio)

HeLa: Henrietta Lacks cells, células de Henrietta Lacks

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacínil-(1)] etanosulfónico

HMGB-1: high-mobility group box-1, proteínas de alta movilidad del grupo 1

HRP: horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano

HSP: heat-shock proteins, proteínas de choque térmico

HtrA2/Omi: HtrA Serine Peptidase 2, serina peptidasa HtrA2 mitocondrial o Omi

I

IκB: NF-kappa-B inhibitor, inhibidor de NF- kappa-B

IAPs: inhibitors of apoptosis proteins, proteínas inhibidoras de la apoptosis

ICD: immunogenic cell death; muerte celular inmunogénica

IF: immunofluorescence, inmunofluorescencia

IFN: interferon, interferón

IGF-I: insulin-like growth factor 1, factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-X: interleukin-X, interleuquina-X

IL-XR: interleukin-X receptor, receptor de interleuquina-X

IMM: inner mitochondrial membrane, membrana mitocondrial interna

IP3: inositol-1,4,5-triphosphate, inositol-1,4,5-trifosfato

IP3R: inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, receptor inositol-1,4,5-trifosfato

IRE1 α : inositol-requiring protein, proteína que requiere inositol

IRES: internal ribosome entry site, sitio interno de entrada al ribosoma



JNK1: c-Jun N-terminal kinase 1, quinasa c-Jun N-terminal



kb: kilobase, kilobase

kDa: kilodalton

KO: knockout, mutante nulo



LB: Luria Bertani

LC3: microtubule-associated protein light chain 3, proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos

LTR: long terminal repeat, repeticiones terminales largas



M: molar, molar

MAMs: mitochondria associated membranes, membranas asociadas a la mitocondria

MAPK: mitogen-activated protein kinase, proteína quinasa activada por mitógenos

MCL-1: myeloid cell leukemia 1, leucemia de células mieloides 1

MDM2: murine double minute 2, doble minuto murino 2, oncoproteína reguladora de p53

ME: electron microscope, microscopia electrónica

MEF: mouse embryonic fibroblasts, fibroblastos embrionarios de ratón

MEKK1: MEK kinase1, quinasa 1 de las MEKs

mg: milligrams, miligramos

MHC: major histocompatibility complex; complejo mayor de histocompatibilidad

min: minute, minuto

ml: milliliters, mililitros

mm: millimeter, milímetro

mM: millimolar, milimolar

MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization, poro en la membrana externa mitocondrial

mRFP: monomeric red fluorescent protein, proteína fluorescente roja monomérica

mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1, diana mecanicista del complejo de rapamicina 1

MTX: mitoxantrone, mitoxantrona



NCCD: Nomenclature Committee on Cell Death, Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular

NES: nuclear export sequence, secuencia de exportación nuclear

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NIX/BNIP3: BCL-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like, proteína 3 que interactúa con BCL-2

NK cells: natural killer cells, células asesinas naturales

nm: nanometer, nanómetro

nmol: nanomole, nanomol

nM: nanomolar, nanomolar

NPC: nuclear pore complex, complejo de poro nuclear

NSF: N-ethylmaleimide-sensitive factor, factor sensible a la N-etilmaleimida



Omi/HtrA2: HtrA Serine Peptidase 2, serina peptidasa HtrA2 mitocondrial o Omi

OMM: outer mitochondrial membrane, membrana mitocondrial externa

ON: overnight, durante la noche



P2RX7: P2X purinoceptor 7, receptor purigénico 7 de la familia de receptores P2X

p35: apoptosis-preventing 35 kDa protein, proteína de anti-apoptótica de 35 kDa

p53: cellular tumor antigen p53, antígeno p53 de tumor celular

p62: sequestosome 1 or ubiquitin-binding protein p62, proteína de unión a ubiquitina p62

PANX1: pannexin-1, panexina.1

pb: base pair, par de bases

PBS: phosphate buffered saline, tampón fosfato salino

PCD: programmed cell death, muerte celular programada

PCR: polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa

PD1: programmed death ligand receptor, receptor del ligando de muerte programada

PDK1: pyruvate dehydrogenase kinase isoform 1, piruvato deshidrogenasa quinasa 1

PDL1: programmed death ligand, ligando de muerte programada

PE: phosphatidylethanolamine, fosfatidiletanolamina

PERK: protein kinase RNA like endoplasmic reticulum kinase, Proteína quinasa dependiente de RNA regulada por estrés en el retículo endoplásmico

Pfu: pyrococcus furiosus polymerase, polimerasa de Pyrococcus furiosus

pH: potential of hydrogen, potencial de hidrógeno

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, fosfoinositol-3-quinasa o fosfatidilinositol 3-quinasa

PI3P: phosphatidylinositol 3-phosphate, fosfatidilinositol-3-fosfato

PINK: PTEN-induced kinase 1, quinasa inducida por PTEN 1

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, phenylmethylsulfonyl fluoride

PRR: pattern recognition receptors, receptores de reconocimiento de patrones

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis, modulador de la apoptosis regulada por incremento de p53

PVDF: polyvinylidene fluoride, polifluoruro de vinilideno

R

Ran: Ras-related nuclear protein, proteína nuclear relacionada con Ras

RCD: regulated cell death, muerte celular regulada

RE: endoplasmic reticulum, retículo endoplásmico

RNA/mRNA: ribonucleic acid/messenger RNA, ácido ribonucleico/RNA mensajero

ROS: reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno

rpm: revolutions per minute, revoluciones por minuto

RSB: reducing sample buffer, buffer reductor para muestra

RT: room temperature, temperatura ambiente

S

SB: sample buffer, buffer para muestra

SCF: stem cell factor, factor de células madre

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SERCA: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase, sarco/retículo endoplásmico Ca^{2+} -ATPase

SFB: fetal bovine serum, suero fetal bovino

sgRNA: single guide RNA, RNA de guía única

SLP2: stomatin like protein 2, proteína 2 similar a estomatina

SMAC/DIABLO: second mitochondria-derived activator of caspase, segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria

SNARE: soluble NSF attachment protein receptor, receptor de proteínas de unión de NSF soluble

STOM: stomatin, Estomatina

SV40: simian virus 40, virus del simio 40

T

TAE: tris acetate-EDTA buffer, buffer tris acetato-EDTA

tBID: truncated form of BID, forma truncada de BID

TBS: tris-buffered saline, solución salina tamponada con tris

TBS-t: tris-buffered saline 0.1% Tween® 20 setergent, solución salina tamponada con tris al 0,1% de detergente Tween®

TE: buffer tris-EDTA, tampón tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TLRX: Toll-like receptor X, receptor de tipo Toll X

TM: transmembrane, transmembrana

TNF: tumour necrosis factor, factor de necrosis tumoral

TNFR: tumour necrosis factor receptor, receptor del factor de necrosis tumoral

TNF- α : tumor necrosis factor α , factor de necrosis tumoral α

TRADD: tumor necrosis factor receptor associated death domain protein, proteínas asociadas al dominio de muerte del receptor de factor de necrosis tumoral

TRAF2: TNF receptor-associated factor 2, factor 2 asociado al receptor de TNF

TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral

TRAILR-X: TRAIL receptor, receptor de TRAIL

Tris: (HOCH₂)₃CNH₂, trisaminometano

U

U: units, unidades

UBD: ubiquitin binding domain, dominio de unión a ubiquitina

ULK1: Unc-51 like autophagy activating kinase 1, quinasa 1 activadora de la autofagia similar a Unc-51

UPR: unfolded protein response, respuesta a proteínas desplegadas

UP: unfolding protein, proteína mal plegada

UPS: ubiquitin/proteasome system, sistema ubiquitina/proteosoma

UV: ultraviolet, ultravioleta



V: volt, voltio

VDAC: voltage-dependent anion channel, canal aniónico dependiente de voltaje

VPS34: vesicle-mediated vacuolar protein sorting 34, clasificación 34 de proteínas vacuolares mediadas por vesículas



WB: Western-blot

WDD: WD40 domain, dominio WD40

WIPI: WD-repeat protein interacting with phosphoinositides, proteína con repeticiones WD que interacciona con fosfoinositol

WT: Wild-Type, silvestre

Introducción



1. Introducción a la muerte celular

El desarrollo y homeostasis de los organismos depende de un balance entre la supervivencia y la muerte celular. En estado fisiológico, una célula tiende a desarrollar respuestas de adaptación y supervivencia, pero ante la presencia de determinados factores la célula entra en daño celular irreversible. Es en ese momento cuando se produce la muerte celular. Fue en 1842 cuando Carl Vogt sugirió por primera vez la existencia de eventos, tales como la reabsorción, la destrucción o la desaparición celular¹. Sin duda, estos conceptos fueron el preludio sobre lo que hoy en día se conoce como muerte celular.

La muerte celular se revela con alteraciones morfológicas. Estos morfotipos, junto con los mecanismos mediante los cuales se eliminan las células muertas y sus fragmentos, han sido históricamente empleados para clasificar los distintos tipos de muerte celular.

En años más recientes, la clasificación en función a cambios morfológicos se ha modificado y extendido tomando en cuenta factores adicionales como el estímulo que induce el proceso de muerte y la maquinaria de señalización involucrada. Considerando esto, en 2018 el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) propuso una nueva clasificación basada en aspectos moleculares². Concretamente, en la actualidad se reconoce que la muerte celular puede ser accidental o regulada.

Por definición, la muerte celular accidental (*Accidental Cell Death*, ACD) es una muerte instantánea de las células expuestas a graves agresiones físicas (altas presiones, temperaturas o fuerzas osmóticas), químicas (variaciones extremas de pH) o mecánicas³. Estos efectos se identifican con el proceso de necrosis. La muerte celular necrótica es un proceso pasivo que no requiere síntesis de proteínas y emplea una cantidad mínima de energía. Se caracteriza por el aumento del calcio intracelular (Ca^{2+}), la disfunción

mitocondrial, el aumento en las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y la proteólisis inducida por calpaínas y catepsinas⁴.

No obstante, el proceso de ACD de una o varias células, puede dar lugar a procesos de muerte celular regulada en células vecinas⁵.

En contraste, la muerte celular regulada (*Regulated Cell Death*, RCD) se define como un proceso activo que se inicia por señales moleculares precisas que llevan a la célula a su muerte. La apoptosis es el tipo de muerte celular regulada más estudiada. Constituye un programa genético de suicidio celular que opera como un mecanismo fisiológico programado para el desarrollo o la renovación de tejidos⁶. Se trata de un proceso necesario para eliminar las células disfuncionales y excedentes celulares normales. Esto es, en condiciones fisiológicas la apoptosis es crucial para la embriogénesis, la homeostasis tisular, en el sistema hematopoyético, en la defensa contra patógenos y en la eliminación de linfocitos autorreactivos. Su desregulación puede provocar patologías como cáncer, enfermedades autoinmunes y degenerativas⁷. Estas formas completamente fisiológicas de RCD son generalmente conocidas como muerte celular programada (PCD)².

Por su parte, los cambios morfológicos, bioquímicos y energéticos juegan un papel fundamental en la apoptosis⁸. Luego, en este proceso, las características morfológicas están muy definidas y caracterizadas por lo que se pueden utilizar como indicadores de activación y cuantificación de muerte celular apoptótica^{9,10}. La célula modifica su forma habitual; su superficie se hace irregular y pierde el contacto con otras células que la rodean. El volumen citoplasmático disminuye por la pérdida de agua y la condensación de las proteínas y de la cromatina, así como de la fragmentación del DNA (por acción de endonucleasas endógenas, en fracciones denominados oligonucleosomas). Aparecen protuberancias irregulares en la membrana plasmática (causadas por el desacoplamiento o separación del citoesqueleto) y la célula termina desintegrándose en cuerpos apoptóticos, rápidamente fagocitados por células fagocíticas y degradados por lisosomas (proceso

conocido como eferocitosis) con el fin de prevenir la respuesta necrótica consecuente¹¹. Todo el proceso transcurre rápidamente, puede llegar a completarse en unas horas y ocurre sin pérdida de material intracelular, daño secundario a las células adyacentes o reacción inflamatoria en el tejido.

El proceso de apoptosis se regula por moléculas tanto anti-apoptóticas como pro-apoptóticas. Estas se tienen que encontrar en una situación de equilibrio, cuando no existe esta consonancia, la célula sufre o no apoptosis, dependiendo a favor de que factor se equilibre la balanza.

2. Maquinaria apoptótica: procesos moleculares básicos

2.1 Familia Bcl-2:

La familia BCL-2 (linfoma de células B2) de proteínas intracelulares es el regulador central de la apoptosis. Sus miembros son los encargados de arbitrar la inducción o la inhibición de la muerte celular apoptótica. En esta familia nos encontramos con dos grandes grupos: proteínas pro-supervivencia o anti-apoptóticas y las proteínas BCL-2 pro-apoptóticas (**Figura 1**).

-BCL-2 anti-apoptóticas: estructuralmente se caracterizan por tener 4 dominios homólogos o dominios de homología (BH1-4). Entre sus miembros se encuentran: BCL-2, BCL-W, BCL-X_L, MCL-1, BFL1-A1. Normalmente se encuentran insertados en la membrana mitocondrial externa (*Mitochondrial Outer Membrane*, OMM) o en la membrana del retículo endoplásmico (RE) a través de hélices hidrofóbicas. Ejercen su función anti-apoptótica inhibiendo a los miembros pro-apoptóticos de la familia mediante su unión directa. De esta manera se encargan de mantener la integridad de la OMM.

Además, su función pro-supervivencia está relacionada con:

1. Fomentar la regulación de la homeostasis del calcio: regulando la actividad de los canales de calcio. Existe evidencia de que las señales

de Ca^{2+} desencadenan la apoptosis en respuesta a una amplia variedad de agentes y condiciones. Por el contrario, las señales de Ca^{2+} también pueden mediar en la supervivencia celular; BCL-2 interacciona con los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R) ubicados en el RE y permite la salida de Ca^{2+} desde los depósitos de este orgánulo¹².

2. Intervenir en el metabolismo bioenergético.
3. Contribuir en la homeostasis de reducción-oxidación (REDOX).

El primer miembro de la familia que se identificó fue BCL-2, la oncoproteína activada a través de translocación cromosómica en algunas leucemias y en el linfoma de células B^{12,7}. Se le considera el enlace entre la apoptosis y el cáncer a través de la inhibición de la muerte celular tras su translocación del cromosoma 14 al cromosoma 18.

-BCL-2 pro-apoptóticas: A su vez se subdividen en dos grupos en función de los dominios BH que posean, así como de su función.

1. Multidominio o efectoras:

BOK, BAK y BAX son los únicos miembros de la familia BCL-2 en mamíferos capaces de formar poros a través de la OMM y posiblemente en otras membranas intracelulares, por lo que se les considera mediadores apoptóticos críticos. En concreto, el evento central que permite la iniciación de la apoptosis es la activación de BAK y BAX en la OMM. Poseen un dominio transmembrana conservado y tres dominios de homología. Se localizan tanto en las mitocondrias como en el RE (véase apartado 3.2 *Apoptosis vía Intrínseca Reticular en Introducción*)^{13,14}. Concretamente, en las membranas de estos orgánulos, anclándose a través de sus hélices hidrofóbicas en sus extremos C-terminal. También se ha documentado cierta translocación de estos miembros hacia el citosol¹⁵.

En cuanto a BOK, se ha propuesto que esta proteína BCL-2 contribuye a la regulación de la homeostasis del RE, como lo demuestra su localización prominente en la membrana de este¹⁶ y la respuesta apoptótica defectuosa

de las células BOK^{-/-} a algunos factores estresantes del RE¹⁷. En cambio, se ha determinado que las funciones fisiológicas de BOK pueden compensarse con BAK o BAX. Sin embargo, también se ha demostrado recientemente que BOK induce permeabilización de la membrana mitocondrial externa (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*, MOMP) en ausencia de BAK y BAX e independientemente de otros miembros de la familia BCL-2¹⁸. En particular, BOK parece ser constitutivamente activo y ser antagonizado por una vía de degradación asociada a RE más que por proteínas BCL-2 anti-apoptóticas¹⁹. Además, la proteína BOK también está regulada por un mecanismo que implica la unión a los IP3R, que al parecer limita su degradación proteosomal²⁰.

2. BH3-only o iniciadoras:

Estas a su vez se dividen en sensibilizadoras o activadoras directas. Las primeras interaccionan únicamente con las BCL-2 anti-apoptóticas e impiden que estas secuestren a las efectoras (BAK y BAX). Entre ellas nos encontramos con BAD y NOXA. En cambio, las BH3-only activadoras directas (BIM, BID y PUMA) pueden interaccionar tanto con las proteínas BCL-2 anti-apoptóticas como con las proteínas BCL-2 efectoras y promover así cambios conformacionales necesarios para inducir la oligomerización de BAK y BAX y con ello MOMP con la liberación de factores del espacio intermembrana.

Lo que se sabe actualmente es que BAK y BAX se activan en escenarios concretos, y forman homodímeros o heterodímeros. Esto resulta en la liberación de las proteínas BH3-only o iniciadoras y promueve dímero por dímero la oligomerización lo que conduce al ensamblaje de un poro que altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial y causa una profunda reestructuración y reorganización de la ultraestructura mitocondrial. En línea con este modelo, recientemente se ha observado que BAX puede conformar oligómeros lineales o con forma de anillos o arcos que perforan la OMM hasta la formación de MOMP. El número de poros formados en la membrana dependerá del número de dímeros de BAX reclutados. Sin

embargo, el mecanismo concreto por el cual BAX se transloca a la mitocondria y las proteínas pro-apoptóticas BCL-2 son activadas y liberadas de los miembros anti-apoptóticos de la misma familia sigue generando controversia, existiendo 3 modelos teóricos no excluyentes que tratan de explicarlo: modelo de activación directa, modelo de activación indirecta y modelo unificado.

Por otro lado, tanto las proteínas BCL-2 anti-apoptóticas como las pro-apoptóticas están sujetas a una estricta regulación transcripcional y postraduccional, que implica la degradación proteasómica, procesos de fosforilación y compartimentalización subcelular.

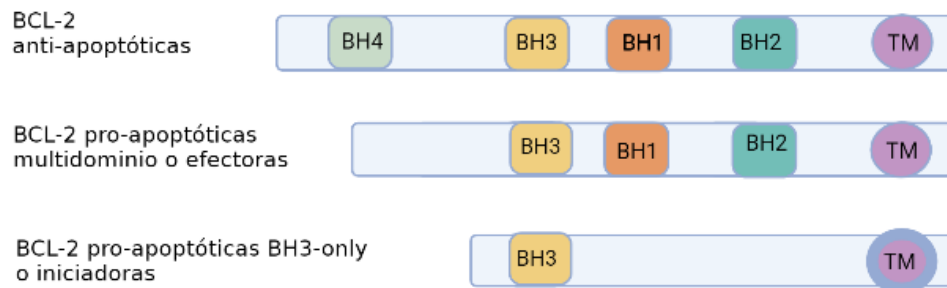


Figura 1. Estructura en dominios de los miembros de la familia BCL-2. Se esquematiza las diferencias estructurales entre los distintos tipos de proteínas BCL-2; familia establecida de acuerdo con su homología al compartir al menos uno de los cuatro dominios BH. Cabe mencionar que no todas las proteínas BH3-only poseen región transmembrana o TM.

2.2 Receptores de muerte y sus ligandos

La apoptosis puede inducirse mediante la activación de receptores de muerte. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Entre ellos se incluye Fas (CD95 o antígeno de apoptosis 1)²¹, TNFR1, DR4 (TRAILR1, del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand 1 Receptor*) y DR5 (TRAILR2). Los receptores de la familia de TNF se encuentran fisiológicamente localizados en la superficie celular como complejos oligoméricos pre-ensamblados y poseen dominios extracelulares ricos en cisteína. Estos dominios permiten el reconocimiento específico de los distintos ligandos²². Los receptores se activan por un grupo

de ligandos estructuralmente relacionados entre sí, y que pertenecen a la familia de ligandos de TNF. Estos inician de manera característica la señalización a través de la oligomerización del receptor que cuenta con un dominio de muerte (*Death Domain*, DD) en la parte intracelular (C-terminal), esencial para el reclutamiento de proteínas adaptadoras especializadas. Por lo tanto, se puede decir que el dominio DD es el responsable de la activación de la maquinaria apoptótica intracelular²³. Un ejemplo claro de este mecanismo de transactivación se puede ver en el receptor Fas, la unión de su ligando (*Fas-ligand*, FASL) induce su trimerización. Este homotrímero es el encargado de reclutar al resto de miembros de la cascada de señalización. En concreto a las proteínas adaptadoras FADD (del inglés, *Fas receptor-associated death domain*) que se unen a los dominios DD. Mediante este sistema complejo de interacciones proteína-proteína se transmite la señal apoptótica al interior de la célula (véase apartado 3.3 *Apoptosis Extrínseca o vía Recetor de muerte* en *Introducción*).

2.3 Procesos moleculares:

Desde el punto de vista bioquímico, la apoptosis es un proceso finamente regulado en el que participan una diversidad de moléculas y cascadas de señalización.

Entre esta gran diversidad de moléculas involucradas se encuentran numerosas enzimas como endonucleasas, hidrolasas y principalmente proteasas, concretamente caspasas, existiendo así pasos enzimáticos muy limitantes.

En el modelo establecido a partir de los estudios sobre la fragmentación de DNA en la apoptosis inducida en los linfocitos del timo durante su formación, el DNA es fragmentado por tres endonucleasas de nueva síntesis que actúan sucesivamente. La primera rompe el DNA en grandes fragmentos de 190000 a 240000 pares de bases (pb); la segunda rompe estos fragmentos en otros más pequeños de 30000 a 50000 pb; y la

tercera rompe el DNA por las zonas de unión entre los nucleosomas y origina los fragmentos apoptóticos más típicos, de 180-200 pb o múltiplos de este tamaño²⁴.

Otras enzimas como las caspasas (cisteín-aspartato-proteasas), juegan un papel muy relevante en este programa de muerte celular. Se tratan de una familia altamente específica de proteasas, con actividad proteolítica en cascada²⁵. Poseen un residuo de cisteína (C) en su sitio catalítico, que media la fragmentación de sus sustratos tras los residuos de aspartato (Asp) en su extremo C-terminal. Estas se regulan de manera postraducciona; se encuentran en forma de zimógenos (precursor enzimático inactivo) o dímeros inactivos²⁶.

Las caspasas típicamente tienen una estructura que consiste en 3 partes:

- Un prodominio en el extremo N-terminal: su longitud depende del tipo de caspasa y puede estar formado por uno o dos dominios efectores de muerte (*Dead Effector Domain*, DED) o un dominio de reclutamiento de caspasas o CARD que consta de 6 o 7 hélices alfa antiparalelas, un núcleo hidrofóbico y residuos cargados en la superficie. Del tipo de prodominio depende la clasificación y función de cada caspasa.

- Una subunidad grande (p20), que contiene el centro activo con cisteína dentro de un motivo conservado QACXG.

- Una pequeña subunidad C-terminal (p10).

Las caspasas que participan en la apoptosis se ven involucradas en diferentes puntos de la transducción de señales apoptóticas y se dividen en dos categorías, con una homología estructural muy conservada; caspasas iniciadoras (8, 9 y 10) y caspasas efectoras o ejecutoras (3, 6 y 7, siendo la más importante la 3). El paso de ejecución final de la apoptosis parece depender únicamente de la caspasas efectoras. En particular la caspasa 3, al

fragmentar un inhibidor de la enzima endonucleasa, activa esta y fragmenta el DNA nucleosomal²⁷.

Las caspasas iniciadoras y ejecutoras se activan proteolíticamente. La digestión proteolítica es muy importante y hay que considerar que en algunos casos la activación no sólo se da por ruptura, como es el caso de la activación de la caspasa 7, sino también por dimerización²⁸. De hecho, uno de los métodos más utilizados para ver la activación por caspasas es el análisis por *Western-blot* para ver si se ha generado el fragmento proteolítico definido.

Por otro lado, las caspasas iniciadoras requieren de interacciones proteína-proteína, estas generalmente se van a asociar en unos complejos moleculares que reciben diferentes nombres. En el caso de la caspasa 8 forma una estructura denominada DISC (Complejo de Señalización que Induce Muerte) y en el caso de la caspasa 9 la estructura que se forma es el apoptosoma y requiere de otras moléculas como Apaf-1²⁹ (Factor 1 de activación de proteasas apoptóticas) (véase apartado 3.4 *Apaf 1-Apoptosoma y su relación con la activación de la caspasa 9 en Introducción*).

En definitiva, ambos tipos de caspasas activan la apoptosis actuando como proteasas sobre diferentes sustratos, moléculas susceptibles de ser procesadas por las caspasas. Entre ellas nos encontramos: otras caspasas, factores pro-apoptóticos (BID) y anti-apoptóticos (c-FLIP, inhibidor celular proteico de FLICE o caspasa 8, capaz de detener las señales de los receptores de muerte)³⁰, proteínas quinasas o proteínas estructurales (las caspasas pueden fragmentar el citoesqueleto y la matriz nuclear). También son objetivo de las caspasas las proteínas implicadas en la transcripción, replicación y reparación del DNA, los reguladores del ciclo celular (p21 y p27) y factores relacionados con enfermedad³¹ (ataxina-3 o la proteína precursora amiloidea APP), entre otros sustratos.

De manera similar a la caspasas, la apoptosis es también promovida por escisiones de las proteínas anti-apoptóticas (BCL-2) mediadas por

calpaínas. Las calpaínas constituyen una superfamilia de proteasas no lisosomales dependientes de Ca^{2+} con una cisteína en su sitio catalítico. Las calpaínas se encuentran en el citosol en forma inactiva. En respuesta a incrementos en los niveles de Ca^{2+} las calpaínas se translocan a membranas intracelulares y son activadas por un proceso de hidrólisis autocatalítico^{32,33}.

Además de enzimas, la apoptosis requiere la intervención de otras moléculas. Por ejemplo, el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por parte de los fagocitos parece deberse a que éstos reconocen moléculas de fosfatidil serina expuestas en la membrana de los cuerpos apoptóticos. Este reconocimiento también puede estar mediado por la interacción de glucoproteínas alteradas expuestas en la membrana de estos cuerpos a través de los receptores de tipo selectina de la membrana de las células fagocíticas. Otras veces las células fagocíticas segregan a la matriz extracelular trombospondina y vitronectina, que se unen a la membrana de los cuerpos apoptóticos y a ellas se unen, a su vez, receptores del tipo integrina, presentes en la superficie de las células fagocíticas²⁴.

2.4 Apaf-1, apoptosoma y su relación con la activación de la caspasa 9:

En el escenario apoptótico, cuando la mitocondria se daña se disipa el potencial de membrana mitocondrial y se produce la permeabilización total de la OMM. Esto conlleva a la liberación de proteínas desde la mitocondria al citosol, entre las que nos encontramos con el citocromo c, transportador electrónico fundamental para el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Este una vez en el citosol ejerce un papel como cofactor uniéndose a la proteína Apaf-1³⁴. Apaf-1 se estructura en tres dominios: un dominio N-terminal de unión a caspasa (*Caspase Recruiting Domain*, CARD), un dominio central de unión a nucleótidos y un dominio C-terminal que contiene de 12 a 13 motivos WD40³⁵. Antes de la liberación del citocromo c de la mitocondria, Apaf-1 permanece en forma inactiva o cerrada en la que el dominio WD40 bloquea al dominio CARD como mecanismo de

autorregulación negativa³⁶. Tras la llegada del citocromo c al citosol, este induce un cambio conformacional en Apaf-1 a una conformación abierta desenmascarando el dominio CARD y provocando la oligomerización de Apaf-1³⁷. De esta manera se forma un complejo llamado apoptosoma, encargado de activar la caspasa 9. La adenosina trifosfato (ATP) y la desoxiadenosina trifosfato (dATP) son requeridas para la formación de este complejo. La unión de citocromo c al Apaf-1 monomérico induce la hidrólisis de dATP hacia dADP, lo que aporta un cambio dinámico para el ensamblaje del apoptosoma. Esta hidrólisis puede ser regulada por otros factores celulares, como los factores intercambiadores de nucleótidos y/o proteínas activadoras de ATPasa²⁹.

Por su parte, el mecanismo de activación de la procaspasa 9 (pc9) es complejo pero el primer corte proteolítico que sufre pc9 se realiza autocatalíticamente en Asp315 para dar lugar a una subunidad mayor de 35 kDa y una menor de 12 kDa. Como caspasa activadora, la caspasa 9 activada tiene como sustrato la proteólisis del zimógeno de la caspasa 3 para dar lugar a la caspasa 3 activada³⁸⁻⁴⁰.

2.5 Otros factores:

También se han identificado otras proteínas, complejos de proteínas, citoquinas o interleuquinas y hormonas que intervienen en la regulación de la apoptosis, tanto induciendo como inhibiendo el proceso. Previniendo así, la activación accidental de este.

Entre los factores de supervivencia nos encontramos la interleuquina 3 (IL-3)⁴¹, el SCF⁴² (de sus siglas en inglés, *Stem Cell Factor*) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1)⁴³. Estos se unen a su receptor y actúan por la vía de las quinasas de fosfatidil inositol trifosfato, PDK1 (piruvato deshidrogenasa quinasa 1) y quinasa B (AKT1). La función de esta última es doble: en primer lugar, fosforila e inactiva la proteína BAD suprimiendo la apoptosis; pues cuando BAD no está fosforilado es activo y promueve la apoptosis inhibiendo a la proteína anti-apoptótica BCL-2 al

unirse a ella. Esto es, la proteína BCL-2 de la membrana mitocondrial y algunos otros miembros de esta familia como BCL-X_L, inhiben la apoptosis al impedir la salida del citocromo c e inactivar el factor Apaf-1. Sin embargo, otros miembros de la misma familia, como BAD, BAK y BAX, promueven la apoptosis. Los dos últimos la promueven al estimular la liberación del citocromo c, y BAD porque inactiva los miembros de la familia que son inhibidores de la apoptosis. Y, en segundo lugar, AKT1 fosforila e inhibe proteínas reguladoras de la familia *Forkhead*, las cuales codifican genes cuyas proteínas promueven la apoptosis.

Igualmente, interviene la familia de inhibidores apoptóticos intracelulares, denominada IAP. Estos actúan inhibiendo procaspasas (para impedir su activación) o caspasas (para impedir su actividad) así como, promoviendo su eliminación a través de la vía proteosomal mediada por ubiquitinación. En mamíferos, las caspasa 3, 7 y 9 son objeto de inhibición por IAPs⁴⁴.

Otro regulador negativo de la maquinaria apoptótica es c-FLIP; encargado de inhibir la apoptosis inducida por la familia de receptores de muerte, incluyendo CD95, TRAILR1, TRAILR2 y TNFR1⁴⁵. El gen c-FLIP se encuentra en el cromosoma 2 en la región q33-34, en un grupo de 200 kb junto con la caspasa 8, lo que sugiere que c-FLIP proviene de un fenómeno de duplicación del gen de las caspasa 8⁴⁶. Esto podría explicar la similitud estructural entre ambos, con dos dominios DED en el extremo N-terminal.

Además, contribuyen como factores anti-apoptóticos los miembros de la familia de proteínas 14-3-3⁴⁷, considerados reguladores clave en distintas vías de transducción de señales. En este proceso, la participación de la familia de proteínas 14-3-3 da lugar a una interconexión entre la vía apoptótica y la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPK. De tal manera que, sin la intervención de 14-3-3, una vez activada la caspasa 3, esta escinde el dominio regulador N- terminal de MEKK1 (del inglés, *mitogen-activated protein kinase (MAPK) Extracellular signal-regulated*

Kinase Kinase) de su dominio catalítico y esto da lugar a la muerte celular. En cambio, la unión de 14-3-3 al dominio N-terminal de MEKK1 inhibe la proteólisis de este y por consiguiente la apoptosis. Por lo tanto, esta familia de proteínas es otro de los reguladores negativos del proceso de apoptosis⁴⁸.

Como factores activadores tenemos a Smac/DIABLO (del inglés, (*Second Mitochondrial Activator of Caspasas / Direct IAP Binding protein with Low isoelectric point*)) y la serina proteasa HtrA2 o Omi que promueven la apoptosis inhibiendo a los IAPs^{49,50}. Otro miembro de la maquinaria apoptótica es el factor inductor de apoptosis o AIF (del inglés, *Apoptosis Inducing Factor*), este se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria y tras la permeabilización de la membrana mitocondrial llega al citosol y al núcleo y estimula la apoptosis a nivel nuclear causando fragmentación del DNA y condensación de la cromatina, independientemente de las caspasas y por tanto de la endonucleasa G, sustrato de las caspasas.

Adicionalmente, el factor de transcripción p53 también juega un papel importante en la regulación de la apoptosis. La expresión de BAD, BAK y BAX puede ser promovida por la proteína p53, cuya producción aumenta como consecuencia del daño al DNA. Así, el p53, además de inhibir el ciclo celular, induce la apoptosis⁵¹.

De manera similar, las especies reactivas de oxígeno se consideran esenciales para la regulación de la muerte celular. Los desequilibrios en las reacciones redox celulares conllevan un aumento de los niveles de ROS que puede desencadenar estrés oxidativo. Esto, a su vez, provoca disminución del potencial de membrana mitocondrial, lo que provoca la liberación del citocromo c al citosol y la señalización apoptótica vía mitocondrial⁵².

3. Señalización apoptótica

Principalmente, se han identificado tres vías, notoriamente diferenciadas, que pueden conducir a apoptosis: vía intrínseca mitocondrial, vía intrínseca reticular y vía extrínseca²⁸.

3.1 Intrínseca mitocondrial:

Cuando la célula sufre estrés o daño por radiaciones, hipoxia, agentes víricos o exceso de glucocorticoides, entre otros estímulos, todos ellos independientes de receptor, la apoptosis puede activarse por una vía intracelular, la conocida vía intrínseca mitocondrial.

El evento clave para la apoptosis intrínseca mitocondrial es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa⁵³. De hecho, el NCCD propone definir la apoptosis intrínseca como una forma de RCD iniciada por perturbaciones del microambiente intracelular o extracelular, demarcado por MOMP y precipitado por caspasas⁵⁴.

Como se ha visto anteriormente, la desregulación del potencial de membrana mitocondrial a su vez induce la liberación de proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c. La salida de esta proteína al citosol y su unión a Apaf-1 transforma la procaspasa 9 a su forma activa (caspasa 9) que, a su vez, activa una cascada de caspasas que conducen a muerte celular.

Por su parte, MOMP está regulada por la familia de proteínas BCL-2; el punto de no retorno de la vía intrínseca mitocondrial comienza con la translocación de BAX citosólico a la membrana mitocondrial, donde se oligomeriza con BAK. El poro formado por BAK/BAX provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de proteínas solubles como el citocromo c y la posterior formación del apoptosoma que, como se ha explicado en numerosas ocasiones, conduce a la activación de caspasa 9 y caspasa 3 (**Figura 2**).

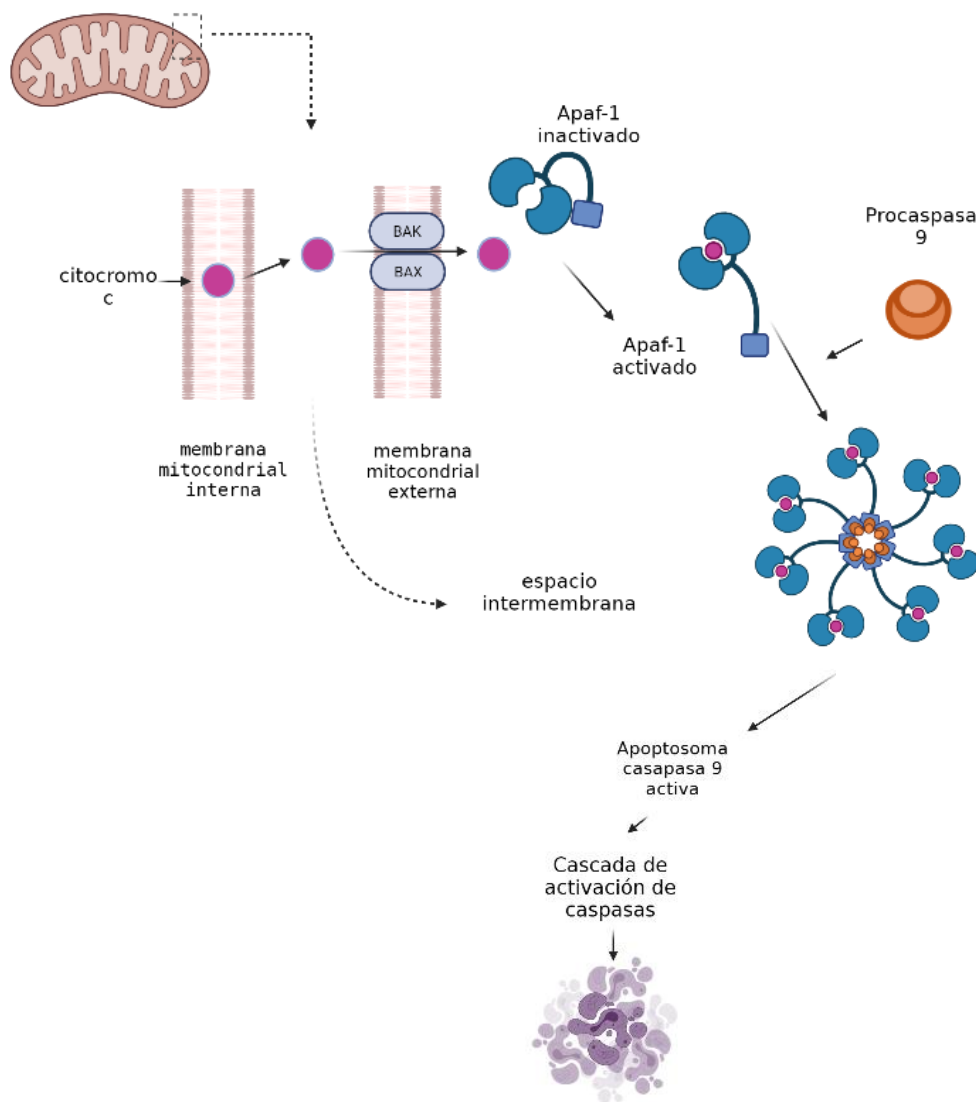


Figura 2. Esquema simplificado sobre la implicación de la activación BAK y BAX que a su vez inician MOMP y se produce la liberación del citocromo c, la formación del apoptosoma, la activación de caspasa 9 y el desencadenamiento de la cascada de activación de caspasas y con ello la muerte celular.

Adicionalmente, la caspasa 8 activada estimula la apoptosis a través de dos cascadas paralelas: puede escindir y activar directamente la caspasa 3 o, alternativamente, puede escindir BID que pasa a su forma truncada tBID. Esta se traslada a las mitocondrias y activa BAK y BAX que a su vez inician MOMP.

Es por esto por lo que a los miembros de la familia BCL-2 se les atribuye funciones importantes en la integración de múltiples vías apoptóticas⁵⁵ y, en concreto, a tBID se le considera el nexo de unión entre la ruta intrínseca y la extrínseca^{56,57}.

3.2 Intrínseca reticular:

El retículo endoplasmático es un orgánulo intracelular constituido por un sistema complejo de membranas que está involucrado en la síntesis y modificación postraducciona de proteínas, así como en garantizar el plegamiento y la translocación de estas al citosol⁵⁸.

Perturbaciones en la homeostasis del RE dan lugar a condiciones de estrés reticular y pérdida de la funcionalidad del RE. Esto altera el plegamiento proteico lo que da lugar a una acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas (UPs, del inglés *Unfolding Proteins*); consideradas una amenaza para la vida celular⁵⁹. Para combatir estas perturbaciones que dan lugar a condiciones de estrés reticular, las células activan una respuesta intracelular conocida como respuesta a proteína desplegadas o UPR que pretende reestablecer la homeostasis del RE²⁸; lo que proporciona una señal de supervivencia celular. Por lo tanto, un fallo en el mecanismo UPR conlleva asociada la muerte celular programada. Sin embargo, existe una maquinaria de vigilancia acoplada a la respuesta UPR que garantiza la restauración de la funcionalidad del RE; los principales componentes de esta señalización son el factor 6 de activación transcripcional (ATF6), PERK (del inglés, *Protein Kinase RNA-like ER Kinase*) y IRE1 α , (*Inositol-Requiring Protein-1*) encargados de activar las rutas para la degradación de las proteínas mal plegadas, atenuando la traducción de proteínas y aumentando la expresión de chaperonas que permiten resolver el mal plegamiento de las proteínas. En cambio, cuando estos mecanismos no son suficientes para restaurar la homeostasis proteica, estas mismas rutas desencadenan la apoptosis.

En el caso del eje IRE1 α en interacción con el factor 2 asociado al receptor TNF o TRAF2 (maquinaria de supervivencia a estrés reticular

IRE1 α /TRAF2), en persistencia del estímulo que produce el estrés reticular, inicia la activación de la señalización apoptótica-1 (ASK1) que además activa la quinasa c-Jun-N-terminal (JNK). La activación continua de la quinasa JNK por la vía IRE1 α induce la transcripción de genes pro-apoptóticos. Además, la fosforilación de BIM y BCL-2 por JNK provoca la activación de BIM y la inhibición de BCL-2. En conclusión, se permite la muerte celular⁵⁹.

Además, se conoce que BAK y BAX se localizan en el RE e intervienen en la regulación del metabolismo del calcio¹². En los últimos años, la conservación de la homeostasia del Ca²⁺ del RE ha emergido como un mecanismo crítico para el mantenimiento de la función de este orgánulo. Es más, en condiciones de estrés celular se inhibe la actividad de la bomba de calcio SERCA, o sarco/retículo endoplásmico Ca²⁺-ATPasa, presente en la membrana reticular, causando una depleción de este ion en el RE; la alteración de las concentraciones de Ca²⁺ reticular, como agente que interfiere en la función del RE, desencadena una respuesta de estrés reticular que induce despolarización mitocondrial. Esto es, BAK reticular activa una ruta de señalización RE-mitocondria que induce liberación de citocromo c independientemente de la vía intrínseca mitocondrial. Existen sitios de contacto entre las mitocondrias y el RE que se conocen comúnmente como membranas del RE asociadas a las mitocondrias o MAMs. En estas membranas se regulan una gran cantidad de procesos celulares, entre los que se encuentra la activación de la cascada de muerte celular programada o apoptosis¹³.

3.3 Extrínseca o vía receptor de muerte:

Hace referencia a un tipo de muerte celular apoptótica que se induce en respuesta a señales procedentes del microambiente extracelular y, que son detectadas y transmitidas al interior celular mediante receptores transmembrana específicos⁶⁰. En este caso la apoptosis se activa después de la unión de ligandos de muerte, incluidos el ligando de Fas (FasL), el factor de necrosis tumoral (TNF) o el ligando inductor de apoptosis relacionado

con TNF (TRAIL) a sus receptores afines (véase en 2.2 *Receptores de muerte y sus ligandos en Introducción*)^{61,62}.

Una de las señales mejor conocidas es la de la molécula FasL, que se encuentra, por ejemplo, en la superficie de los linfocitos T citotóxicos y células *Natural Killer* (NK)⁶³. Esta molécula se une al receptor Fas de la superficie de la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral. Al ser estimulado, el Fas se une a las proteínas adaptadoras FADD que a su vez se unen a una procaspasa y la activan a caspasa. Por su parte, cada caspasa activa otra procaspasa a caspasa, y ésta a la siguiente, produciendo una reacción en cadena que causa la apoptosis⁶⁴ (**Figura 3**).

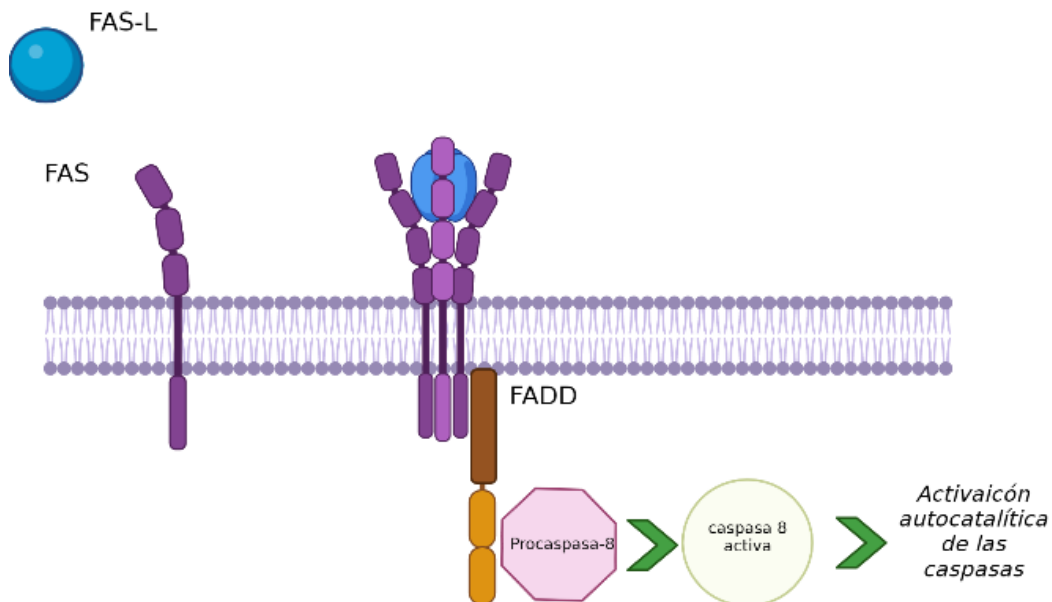


Figura 3. Sinopsis gráfica de la unión del receptor Fas a su ligando que promueve la unión de proteínas adaptadoras al dominio de muerte de Fas. Esta estructura multiproteica transduce señales de activación de caspasas que culminan en la activación autocatalítica de la cadena de caspasas que conducen al fenómeno de muerte celular.

De una manera alternativa los linfocitos T citotóxicos y células NK pueden segregar perforina que forma un poro en la célula diana, y proteasas como la granzima B, que penetran por el poro y activan la cadena de caspasas⁶³.

Otro ligando es el TNF, que se une a un receptor de la misma familia, el TNFR1; éste se une a unas proteínas activadoras llamadas TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain), que, a su vez, se unen a las proteínas FADD, continuando el proceso como en el caso anterior.

Concretamente, estas señales se propagan a través de la unión de la procaspasa 8 a las proteínas adaptadoras FADD para su activación en caspasa 8 y llevan a cabo su respuesta por caspasas ejecutoras, principalmente a través de la caspasa 3.

Sin embargo, hay factores intracelulares capaces de unirse a los TRADD de modo que éstas, en vez de activar las FADD, activen el factor de transcripción nuclear kB (NF-kB), cuyo efecto es inhibir la apoptosis induciendo la expresión de genes pro-supervivencia incluyendo BCL-2 y c-FLIP. Este último puede inhibir directamente la activación de caspasa 8.

4. Apoptosis en cáncer

Una de las características distintivas o *hallmark* de las células cancerígenas es la resistencia a muerte celular o evasión del proceso de apoptosis⁶⁵. La pérdida del control apoptótico permite que las células cancerosas sobrevivan más tiempo, lo que implica mayor disposición para la acumulación de mutaciones que a su vez pueden aumentar la invasividad durante la progresión del tumor⁶⁶. Luego, se sabe que la apoptosis alterada constituye un paso crucial en los procesos de tumorigénesis. Por lo tanto, la habilidad de modular la vida o la muerte celular es reconocida por su inmenso potencial terapéutico. De hecho, la mayoría de compuestos farmacológicos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para regular la muerte celular están dirigidos al tratamiento del cáncer⁶⁷.

Normalmente, es la vía intrínseca la que se inhibe en este tipo de patologías, sin embargo, la apoptosis es un sistema de regulación complejo en el que intervienen numerosas moléculas y rutas de transducción de señales, esto implica la existencia de una gran variedad de formas a través

de las cuales las células tumorales pueden evadir la muerte celular programada. Por tanto, cualquier molécula participe en la vía de señalización apoptótica puede ser considerada una posible diana terapéutica⁶⁸.

Resulta usual que, en respuesta a diversas señales de daño intracelular, incluidas las provocadas por la terapia anticancerígena, la decisión de la célula de sufrir apoptosis esté determinada por las interacciones entre los miembros de la familia BCL-2. Por ejemplo, se sabe que la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2 se encuentra en niveles altos en el cáncer pulmonar de células pequeñas y que los inhibidores de BCL-2, Venetoclax y Navitoclax, han sido eficaces para combatir este tipo de cáncer^{69,70}.

Sin embargo, los agentes terapéuticos diseñados para la supresión tumoral también pueden ir dirigidos contra los DRs, c-FLIP o contra la proteína supresora de tumores p53. Agentes quimioterapéuticos que dañan el DNA tales como cisplatino o metotrexato, afectan a la expresión del receptor de muerte Fas (DR2, CD95 o Apo1). Así mismo, etopósido, inhibidor de la síntesis de DNA, también ejerce su acción a través de los receptores DR4 y DR5, en ambos casos estimulando su expresión^{71,72}. De manera similar, se han diseñado distintas drogas enfocadas a la activación de caspasas, como Apoptin, agente inductor de la actividad de la caspasas ejecutoras 3 y 7. En cuanto a la proteína p53, esta realiza su función inductora de apoptosis activando o suprimiendo la transcripción de proteínas de la familia BCL-2 pro-apoptóticas o anti-apoptóticas, respectivamente. Además, puede interaccionar directamente con BAX lo que conduce a la liberación del citocromo c vía MOMP y ayuda a la inducción de la apoptosis. Se ha reportado que más de la mitad de las neoplasias presentan mutaciones en el gen p53; lo que perjudica a su función reparadora de DNA, reguladora del ciclo celular e inductora de la muerte celular programada. En otros muchos tumores p53 no se encuentra mutado,

pero sí inactivado, con actividad reducida o con un aumento en su velocidad de degradación. Actualmente, se han identificado moléculas pequeñas capaces de restaurar la función salvaje (*wild-type*) de p53 en células cancerígenas. Es el caso de la molécula Nutlins capaz de inhibir a la proteína MDM2 (del inglés, *Murine Doble Minute 2*), regulador negativo de p53⁷³. Se conoce que MDM2 puede unirse a p53 e inhibir su capacidad de activar la transcripción génica, impidiendo así la parada del ciclo celular dependiente de p53 en la fase G1 y anulando las propiedades anti-proliferativas y apoptóticas de esta proteína⁵¹. Al interrumpir la interacción entre p53 y MDM2 mediante Nutlins, p53 es estabilizada recuperando su actividad transcripcional.

En conclusión, un conocimiento profundo de las señales apoptóticas contribuirá a los medios de desarrollo farmacológico y terapéutico mediante la identificación de potenciales dianas terapéuticas en procesos patológicos que impliquen apoptosis.

5. Introducción a la autofagia

La autofagia se trata de un mecanismo, conservado evolutivamente en eucariotas (de levaduras a humanos), de adaptación a condiciones microambientales adversas⁷⁴. Principalmente se le conoce como respuesta al estrés celular dependiente de un suministro limitado de nutrientes. De hecho, el término autofagia se deriva de las raíces griegas "Auto" (uno mismo) y "phagy" (comer). Este fenómeno de "auto-digestión" se encarga de degradar proteínas, carbohidratos y lípidos para compensar las necesidades energéticas en condiciones de ayuno, manteniendo así la función y la supervivencia celular de manera individual al tiempo que preserva la homeostasis del organismo.

En la mayoría de las células, la autofagia también ocurre en condiciones fisiológicas a niveles basales, como vía catabólica de degradación y reciclaje, eliminando agregados de proteínas y orgánulos

dañados⁷⁵. Además, también interviene en la diferenciación celular, en la remodelación tisular y ha sido clasificada como muerte celular de tipo 2. Aunque la autofagia es una estrategia de supervivencia celular, la muerte celular autofágica se desencadena bajo condiciones irreversibles de estrés celular, en las cuales la respuesta autofágica es exacerbada e insuficiente para recobrar el escenario inicial. Es decir, en algunas circunstancias, las proteínas de la maquinaria autofágica pueden promover la eliminación celular a través de una "auto-digestión" excesiva (la llamada muerte celular autofágica o muerte celular de tipo 2) o inducir la activación de otras vías de muerte celular como la apoptosis⁷⁶.

Aunque inicialmente se consideraba un fenómeno íntegramente no selectivo, en la actualidad se han descrito diversas formas de autofagia específicas de cargo. Dichos cargos poseen señales específicas (por ejemplo, marcas de ubiquitinación), que son reconocidas por receptores autofágicos⁷⁷. Las señales de degradación y las moléculas que actúan en los casos de autofagia selectiva son específicas para cada proceso en particular.

Dado que la autofagia desempeña un papel fundamental en distintos procesos fisiológicos como la inmunidad innata y adquirida, la supresión de tumores, el envejecimiento y la muerte celular, no es sorprendente que la disfunción autofágica esté asociada con una amplia variedad de procesos patológicos entre los que se encuentran enfermedades metabólicas, trastornos neurodegenerativos, enfermedades infecciosas y cáncer. Se considera que la regulación positiva de la autofagia puede ser beneficiosa para el tratamiento de dichas patologías. Por esta razón, se están desarrollando diferentes aproximaciones farmacológicas que permitan modular este proceso. Del mismo modo, la inhibición de la autofagia como estrategia para el tratamiento del cáncer también está siendo ampliamente estudiada⁷⁸. En concreto, el uso de inhibidores de la formación de fagosomas (véase apartado 6. *Maquinaria autofágica* en *Introducción*) han resultado

efectivos en estudios preclínicos para sensibilizar a las células tumorales al efecto de fármacos quimioterapéuticos⁷⁷.

6. Maquinaria autofágica, ATGs: ATG16L1. Dominio WD estructura y función

La autofagia ha sido categorizada en tres grandes grupos: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA)⁷⁹. La macroautofagia es la más estudiada y conocida; en lo sucesivo denominada simplemente autofagia.

El campo de la investigación en autofagia se ha desarrollado rápidamente desde la primera descripción del proceso en 1963 y la identificación de genes implicados en el proceso autofágico en 1993; ahora conocidos como ATGs (genes relacionados con autofagia)⁸⁰. A partir de ese momento, la investigación realizada durante las tres últimas décadas ha proporcionado información detallada sobre la función de las proteínas ATGs centrales; se considera que funcionan como seis complejos distintos: el complejo quinasa ULK1, vesículas ATG9, el complejo ATG14-PI3-quinasa, el complejo ATG2-ATG18 (familia de proteínas WIPI en mamífero), el sistema de conjugación ATG12 y el sistema de conjugación ATG8⁸¹.

La autofagia implica el secuestro de componentes citoplásmicos dentro de vesículas intracelulares de doble membrana, el llamado autofagosoma. Los autofagosomas son considerados compartimentos no degradativos; se fusionan con lisosomas para generar autolisosomas, donde la carga autofágica es degradada por hidrolasas ácidas.

Las cascadas de transducción de señales que operan en este proceso de degradación implican una serie secuencial de eventos en lo que la maquinaria molecular actúa de forma jerárquica, de tal manera que los ATGs se pueden agrupar, según sus pasos funcionales, en etapas clave de la vía de autofagia: inducción de la ruta, generación del autofagosoma (iniciación,

nucleación del fagóforo y elongación del fagóforo), maduración y fusión del autofagosoma con los lisosomas⁸² (**Figura 4**).

En presencia de nutrientes, mTORC1 (del inglés, *Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1*) suprime al complejo ULK1. Por eso, mTORC1 es considerado como un potente inhibidor de autofagia en eucariotas, por el contrario, aunque su inhibición desencadena la inducción de autofagia, la activación de la ruta no siempre depende de este complejo. Tras la llegada de los estímulos desencadenantes de la autofagia, el complejo ULK1 (incluye ULK1, ATG13, FIP200 y ATG101) es activado y translocado a regiones del RE positivas para PI3P y para proteínas de unión a PI3P, conocidas como omegasomas⁸³. Esta localización se debe a que el fagóforo emana del omegasoma⁸⁴ dado que el RE podría contribuir, como fuente de membrana, a la formación del fagóforo⁸². Sin embargo, las últimas hipótesis señalan que las membranas mitocondriales y plasmáticas también son fuentes alternativas de membrana para la formación del fagóforo.

A continuación, el complejo PI3K de clase III (VPS34) es regulado por el complejo ULK1 puesto que es atraído al fagóforo vía ATG13. Este segundo complejo está comprendido principalmente por VPS34, Beclin 1 y ATG14. Estudios recientes indican una fuerte colocalización entre autofagosomas tempranos y marcadores PI3P (producto de la actividad de VPS34)⁸⁴. En presencia de nutrientes Beclin 1 se asocia a la proteína BCL-2. Ambas proteínas se disocian tras la fosforilación de BCL-2 por JNK1. En ese momento Beclin 1 se asocia al complejo PI3K⁸⁵.

Seguidamente, PI3P se une a miembros de la familia de proteínas WIPI (del inglés, *WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides*) y a DFCP1 (del inglés, *Double FYVE-Containing Protein 1*), efectores autofágicos cruciales para la maduración del omegasoma y la sucesiva nucleación y formación del fagóforo; las proteínas WIPI y DFCP1 participan en el reclutamiento del sistema ATG12-ATG15-ATG16L1 durante la elongación del fagóforo. Por otra parte, la elongación del fagóforo se ve favorecida por la

intervención de ATG2 y la proteína transmembrana ATG9. Todo parece indicar que ATG9 se recluta en forma de vesículas y colabora en el transporte de lípidos y membranas para la elongación del fagóforo⁸².

El complejo ATG12-ATG15-ATG16L1 se asocia a la membrana del fagóforo durante la elongación y el cierre de la membrana y se disocia una vez se ha formado el autofagosoma. Paralelamente, el dominio C-terminal de la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos, mayormente conocida como LC3, se asocia con el fosfolípido fosfatiletanolamina (PE). Esta ruta se inicia con el procesamiento de LC3 por la cisteín proteasa ATG4, exponiendo un residuo de glicina en el extremo C-terminal de LC3 (LC3 I). En esta conjugación, la actividad ligasa la proporciona ATG5-ATG12. El papel de ATG16L1 es marcar el sitio de lipidación de LC3. LC3 conjugado con PE (LC3 II) es la forma asociada a membrana y se recluta tanto en la superficie como en el interior del autofagosoma temprano.

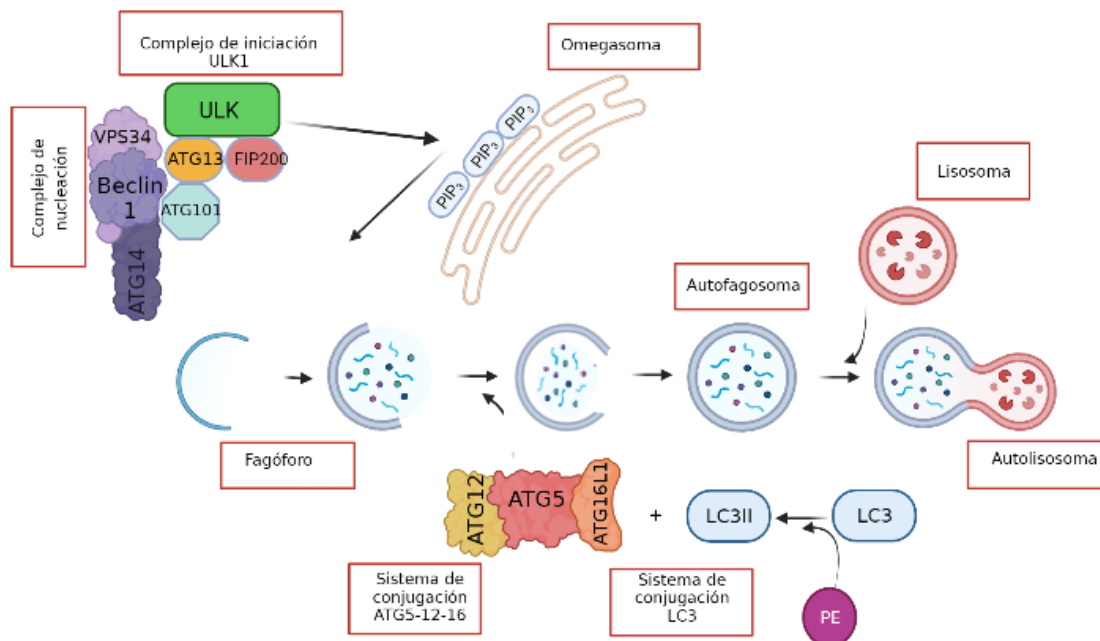


Figura 4. Esquema general de los miembros que conforman la maquinaria molecular autofágica, así como del progreso de los eventos y etapas claves que se producen hasta la formación del autolisosoma.

La maduración del autofagosoma y su fusión con el lisosoma requiere de receptores SNAREs (receptores de proteínas de unión al factor sensible a

la N-etilmaleimida o NSF; importante en los procesos de fusión de membranas) que promueven la fusión entre autofagosomas y lisosomas, dando lugar al autolisosoma; último compartimento de la ruta. Tras la fusión, la degradación de la membrana lisosomal interna permite el procesamiento de los cargos a través de distintas enzimas lisosomales que hidrolizan proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos a pH ácido⁷⁴.

La autofagia puede ser monitorizada a través de dos aproximaciones; la primera de ellas se basa en la observación directa o indirecta de las estructuras formadas a lo largo de este proceso. Por ejemplo, los autolisosomas se pueden observar por microscopia electrónica (ME) o utilizando marcadores fluorescentes lisosomales o para LC3 asociado a PE. Por su parte, LC3 es el marcador autofágico más utilizado; mientras la mayoría de las proteínas ATG sólo están presentes en el autofagosoma de manera transitoria, LC3 permanece en la membrana hasta su degradación en el autolisosoma⁸⁶. Esto es, la cantidad de LC3 II refleja el número de autofagosomas. En *Western-blot*, LC3 I y LC3 II presentan una movilidad electroforética ligeramente diferente. En inmunofluorescencia, la forma LC3 I se encuentra soluble y difusa en el citoplasma, mientras que LC3 II adquiere una disposición punteada. En cambio, el análisis estático de estructuras autofágicas en un momento determinado a menudo conduce a interpretaciones inexactas. La segunda aproximación, para valorar el proceso autofágico, se trata de la cuantificación de las proteínas y orgánulos que dependen de esta vía para ser degradados^{87,88}. Es el caso de la proteína p62 que se localiza en el autofagosoma y es continuamente degradada por autofagia, con lo que una disminución en los niveles totales de p62 por *Western-blot* indicarían una inducción del proceso autofágico. Asimismo, el uso de inhibidores autofágicos como bafilomicina A1 son útiles también para evaluar el flujo autofágico⁸⁹.

A su vez, existen procesos de autofagia que no siguen la ruta convencional. Por ejemplo, compuestos pro-apoptóticos como estaurosporina y etopósido inducen autofagia de manera independiente de

Beclin 1. Además, mientras que en la ruta autofágica convencional se han establecido relativamente bien las funciones de la mayoría de las proteínas ATGs, algunas de ellas también participan en otro tipo de actividades o procesos que no están relacionados con la autofagia canónica⁹⁰. A propósito de esto, considerando buscar conexiones entre los procesos de autofagia y apoptosis, cabe mencionar que otra línea de investigación del grupo se basa en caracterizar y estudiar las diversas actividades alternativas recientemente relacionadas con ATG16L1, componente de uno de los dos sistemas que intervienen en la elongación del fagóforo como responsable de determinar el sitio de lipidación de LC3. Además, se sabe que ATG16L1 incluye un dominio C-terminal formado por siete repeticiones de tipo WD40 (WDD) entre los aminoácidos 320-607 de la molécula⁹¹⁻⁹³ y cuya función molecular no se encuentra completamente caracterizada.

El hecho de que esta región se encuentre ausente en Atg16 de levaduras indica que no es necesaria para las funciones básicas de la autofagia en organismos unicelulares⁹². Del mismo modo, en células de mamíferos una versión de ATG16L1 que carece de las repeticiones WD40 es capaz de llevar a cabo actividades autofágicas canónicas. Esto sugiere que la mayoría de efectores autofágicos críticos que se unen a ATG16L1 reconocen regiones distintas al dominio WD y que, por lo tanto, la función de las repeticiones WD40 probablemente no esté relacionada con la autofagia convencional. En cambio, este dominio interviene en actividades no convencionales en las que LC3 lipidado se encuentra en localizaciones subcelulares atípicas; no relacionadas con los autofagosomas canónicos de doble membrana⁹⁰. De modo que el WDD de ATG16L1 ejerce de plataforma de acoplamiento para moléculas que incluyen un motivo de aminoácidos específicos^{94,95} de reconocimiento a WDD, lo que activa las capacidades de ATG16L1 para lipidar LC3 en estructuras de membrana única.

Recientemente, en el laboratorio se ha ampliado el conocimiento del motivo de unión a WDD y se han identificado moléculas transmembrana que albergan este motivo en su región intracelular. Es el caso de la subunidad β

de receptor de interleuquina 10 (IL10RB) que, después de su activación por la unión de su ligando IL10, se une al WDD de ATG16L1 para facilitar la endocitosis, el tráfico temprano y la señalización de los complejos IL10-IL10R sin influir en su tasa de degradación^{90,96}.

Estos resultados revelan un nuevo papel no convencional de ATG16L1 en la señalización de citoquinas que no conlleva un propósito degradativo, contribuyendo así a catalogar los roles fisiológicos que ejercen las actividades no convencionales de la maquinaria autofágica. En cualquier caso, el dominio WD40 no desempeña sus funciones aisladamente, siendo imprescindible el concurso del dominio efector N-terminal de ATG16L1⁹⁰.

De igual modo, y dado que la autofagia modula distintas respuestas celulares⁹⁷, el dominio C-terminal de ATG16L1 podría tener un papel esencial en las señales de comunicación e intersección entre autofagia y apoptosis^{98,99}.

7. Mitofagia

La mitocondria es un orgánulo esencial que regula la homeostasis energética y la muerte celular. Está ampliamente documentado que la mitocondria juega un papel fundamental en la apoptosis (vía intrínseca mitocondrial); es el orgánulo central para el control de esta ruta ya que la permeabilización de su membrana externa resulta en la liberación de proteínas pro-apoptóticas tales como citocromo c, SMAC/DIABLO o endonucleasa G, que conducen, irrevocablemente, a la muerte celular. (véase apartado 3.1 *Apoptosis intrínseca mitocondrial* en *Introducción*).

Por su parte, la eliminación de las mitocondrias dañadas a través de mecanismos autofágicos se denomina mitofagia y es clave para el mantenimiento adecuado de las funciones celulares^{100, 101, 102}.

La mitofagia requiere de dos pasos: la inducción de la autofagia convencional y el marcaje de la mitocondria dañada para su reconocimiento por parte de los mecanismos moleculares de la autofagia selectiva. Múltiples estudios sobre la mitofagia revelan que el primado mitocondrial para la

degradación autofágica de las mitocondrias es mediado por los factores de la ruta PINK1-Parkin o por los receptores mitofágicos NIX/BNIP3L^{102,103}.

En la actualidad, existen cada vez más evidencias de que la mitofagia se encuentra significativamente alterada en distintas patologías humanas como en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, patologías cardiovasculares y cáncer¹⁰⁴. Esto indica que la degradación de mitocondrias disfuncionales a través de mitofagia, es un proceso citoprotector que limita tanto la producción de ROS como la liberación de proteínas intramitocondriales y la consiguiente apoptosis⁷⁵.

8. Conexión entre apoptosis y autofagia

Aunque la autofagia y la apoptosis constituyen procesos celulares distintos con resultados a menudo opuestos, numerosos estudios han mostrado que la red de proteínas que controlan las fases de iniciación y ejecución de ambos mecanismos están fuertemente interconectadas⁶. Existen diferentes escenarios para la interacción entre la autofagia y la apoptosis por lo que se considera que se trata de un ensamblaje multinivel.

Queda en evidencia que, la relación funcional entre ambos procesos es complicada; dependiendo de las circunstancias, la autofagia puede constituir un mecanismo de adaptación al estrés que evita la muerte celular (suprime la apoptosis), mientras que en otros contextos, la autofagia puede actuar como un proceso alternativo de muerte e incluso ambos procesos pueden ser inducidos en respuesta a las mismas señales iniciadoras lo que puede resultar en una combinación de apoptosis y autofagia o suponer un cambio de una respuesta a otra de forma mutuamente excluyente^{75,78,105}. Por lo tanto, delimitar el proceso de transición entre autofagia y apoptosis es una tarea compleja.

Las múltiples maneras de conexión entre autofagia y apoptosis se manifiestan en un continuo balance entre la vida y la muerte en respuesta a señales de estrés celular. Por lo tanto, perturbaciones que alteren la armonía

de este equilibrio entre ambos procesos pueden estar asociadas con varias patologías como enfermedades neurodegenerativas y cáncer¹⁰⁶. Esto explica que en los últimos años se haya puesto especial énfasis en estudiar la interconexión entre dichos procesos, concretamente en la identificación de interacciones proteína-proteína entre las proteínas de autofagia y apoptosis. Tras estos estudios, se ha propuesto que la conexión entre la apoptosis y la autofagia se produce a distintos niveles que pueden clasificarse en tres paradigmas distintos:

8.1 Regulación de la apoptosis por proteínas específicas de autofagia y viceversa:

Proteínas específicas del proceso autofágico han evolucionado para regular la ruta apoptótica interaccionando directamente con los componentes moleculares de la maquinaria apoptótica^{6,105,106}. Es decir, este modelo propone una relación física y funcional entre proteínas apoptóticas y proteínas específicas de la vía catabólica autofágica.

Entre los puntos de conexión más conocidos se incluyen las interacciones entre Beclin 1 y BCL-2/BCL-X_L, entre FADD y ATG5, escisiones de proteínas relacionadas con la autofagia mediadas por caspasas y calpaínas³², y degradación vía autofagia de caspasas¹⁰⁷.

ATG5 y ATG12 son integrantes de uno de los complejos centrales que intervienen en la autofagia. Además de su papel en la autofagia, se descubrió que ATG5 y ATG12 tienen funciones clave en la iniciación de la apoptosis en respuesta a diversas señales de estrés. Sorprendentemente, en el ámbito de la apoptosis, son las formas no conjugadas de ATG12 y ATG5 las que contribuyen en el proceso, lo que plantea que su papel apoptótico puede ser independiente de su papel canónico en la autofagia^{6,108}.

En células apoptóticas, ATG5 es cortado por calpaínas. El fragmento N-terminal resultante de ATG5 se traslada a la mitocondria donde media la liberación de citocromo c al interactuar con BCL-X_L¹⁰⁹. Además, se ha

demostrado que ATG5 interactúa con FADD a través de su dominio DD; se ha sugerido que la interacción ATG5-FADD puede servir para regular la apoptosis, y no para regular la autofagia¹¹⁰.

También se ha identificado una función pro-apoptótica por parte de ATG12. Específicamente, se requiere ATG12 para la activación de caspasas en respuesta a una gran variedad de señales apoptóticas¹¹¹. Inversamente, las caspasas también regulan la autofagia. Gran variedad de proteínas autofágicas (Beclin 1, VPS34, ATG3 y ATG4) han sido señaladas como dianas de la acción proteasa mediada por caspasas. Esta fragmentación inactiva su función autofágica. Una posible explicación para este fenómeno sería que esta inhibición de la autofagia anterior al proceso de apoptosis previene la estimulación de procesos contradictorios de pro-supervivencia y pro-muerte. Entonces, son varias las proteínas de autofagia que se proteolizan durante la apoptosis. No solo ATG5 sufre este proceso, sino que también, tras la inducción de apoptosis, Beclin 1 es proteolizada por caspasas en sitios específicos. Su producto C-terminal se localiza predominantemente en mitocondrias donde es capaz de inducir la liberación del citocromo c^{112,113}. Los resultados de varios estudios sugieren que el equilibrio entre Beclin 1 fragmentado y Beclin 1 de longitud completa o sin fragmentar se refleja en el balance entre la vida y la muerte celular. Solo Beclin 1 de longitud completa puede inducir autofagia^{107,112}.

Las similitudes entre los hallazgos de Beclin 1 y ATG5 son sorprendentes. En ambos casos, la activación de la apoptosis conduce a escisión específica de estas proteínas autofágicas, que no sólo sirve para suprimir la autofagia citoprotectora, sino que también genera productos de escisión dirigidos a las mitocondrias que funcionan como bucles de retroalimentación positiva para impulsar la apoptosis^{27,113,114}.

Además, uno de los puntos de interconexión más estudiados entre ambos procesos, también involucra a Beclin 1. El hallazgo del complejo Beclin 1 y BCL-2 se consideró un nexo entre las cascadas de señalización de

autofagia y apoptosis. Estudios posteriores demostraron que Beclin 1 tiene un dominio BH3 que, además de interactuar con BCL-2, le permite conjugarse con BCL-X_L, MCL-1 o BCL-W. Sin embargo, Beclin 1 no interactúa con ningún miembro pro-apoptótico¹⁰⁷. En presencia de nutrientes, Beclin 1 se une a BCL-2 o BCL-X_L, lo que inhibe su capacidad para iniciar autofagia. Durante la falta de nutrientes o ante otras condiciones de estrés, varios mecanismos median la interrupción de esta interacción para permitir la autofagia, revelando un papel inhibidor de los miembros de la familia BCL-2 en autofagia mediada por Beclin 1^{7,27,107}.

Por lo tanto, la regulación de la autofagia vía proteínas apoptóticas, y viceversa, permite una transición paulatina entre ambos procesos. Concretamente, si el estado de estrés es resuelto, las células típicamente recobran los niveles basales de autofagia. Por el contrario, si el estrés persiste y la autofagia ya no puede soportar la supervivencia celular, las células responden activando la apoptosis e inhibiendo la autofagia con el objetivo de garantizar una eliminación eficiente y controlada^{6,107,112}.

8.2 Activación de caspasas en la membrana del autofagosoma:

Datos procedentes de distintos grupos de investigación han señalado un mecanismo inesperado a través del cual, la autofagia puede contribuir directamente en la inducción de apoptosis. En este paradigma, las caspasas son reclutadas en las membranas de los autofagosomas, que sirven de plataformas intracelulares para la activación de dichas caspasas^{6,33,108,115}. Es el caso de la caspasa 8. Se han descrito distintas rutas de reclutamiento para la caspasa 8 por parte de autofagosomas. Una de ellas detalla la unión de la caspasa 8 ubiquitinada a la proteína p62 a través de su dominio de unión a ubiquitina (UBD). Seguidamente, p62 a su vez se une a LC3 y así la caspasa 8 es reclutada hacia el autofagosoma. En una segunda vía, la caspasa 8 es reclutada en el autofagosoma a través de la interacción con la proteína adaptadora FADD conjugada con ATG5^{6,109,116}.

Para la activación de caspasas en la membrana del autofagosoma no se requiere la existencia de actividad autolisosomal.

8.3 Regulación de la apoptosis por degradación autofágica:

La respuesta apoptótica puede verse profundamente afectada por la habilidad del proceso de degradación autofágico para controlar la disponibilidad energética, la funcionalidad de los orgánulos celulares y la renovación y reemplazo de proteínas. En este modelo, perturbaciones en la formación de autofagosomas o en la actividad lisosomal afectan a la respuesta apoptótica, dado que ambos procesos necesitan mantener el flujo autofágico. Además, la autofagia selectiva de cargo puede desplazar el equilibrio entre proteínas anti-apoptóticas y pro-apoptóticas marcando así la iniciación o la inhibición de la apoptosis^{6,117,118}.

Teniendo en cuenta estos tres paradigmas, es concebible pensar que la existencia de nexos regulatorios entre autofagia y apoptosis confiere una ventaja evolutiva a las células ya que permite dar una respuesta al estrés celular de manera más precisa.

9. Muerte celular inmunogénica (ICD)

9.1 Introducción a ICD:

Se trata de un tipo de RCD que en un escenario inmunocompetente induce la activación de una respuesta inmune adaptativa¹¹⁹.

Es la base de la comunicación entre las células moribundas y las células del sistema inmune; un exitoso diálogo entre las células apoptóticas y un sistema inmunológico debidamente alertado^{61,120}.

Se considera que la inflamación, la antigenicidad de las células y su capacidad para generar señales adyuvantes, son los parámetros clave que determinan y definen la muerte celular inmunogénica¹²¹. En la ICD tienen un papel fundamental diversos patrones moleculares asociados a daño celular (*Damage Associated Molecular Pattern*, DAMPs); moléculas endógenas que

son normalmente invisibles para el sistema inmune, pero que una vez expuestas o liberadas por situaciones de estrés o de muerte celular, alertan al organismo sobre una amenaza potencial al ser reconocidas por el sistema inmune¹²². Los DAMPs más ampliamente estudiados son:

1. Liberación de ATP al espacio extracelular: durante el curso de la muerte celular inmunogénica, el ATP contenido en vesículas dependientes del proceso autofágico, es liberado a través de un proceso de exocitosis activa vía canales de Panexina-1 (PANX1)¹²³, originados a través de la actuación de caspasas. Estos canales permiten la salida del ATP desde el interior hacia el exterior celular. Esto sugiere que tanto la autofagia como la activación de caspasas y, por lo tanto, de alguna forma la apoptosis, juegan un papel esencial en la liberación de ATP, aunque la cadena exacta de eventos aún no se ha dilucidado por completo^{124,125}.

Una vez liberado, el ATP extracelular media los efectos pro-inflamatorios sobre la activación, dependiente del complejo inflamasoma, de la caspasa 1, esta a su vez, proteoliza y activa citoquinas pro-inflamatorias, entre las que se encuentra IL-1 β y IL-18. Es por ello por lo que se considera que la liberación de ATP es necesaria para la generación de una fuerte respuesta inmune antitumoral inducida por tratamientos de quimioterapia^{119,126,127}.

2. Exposición/presentación de calreticulina (CRT) y proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90, del inglés *Heat-Shock Proteins*) en la superficie celular. CRT es una proteína soluble que se encuentra en el lumen del RE, donde es capaz de mediar diversas funciones. Durante la ICD, en un contexto quimioterapéutico, la translocación del CRT desde el RE a la membrana plasmática facilita la captura de las células moribundas por células dendríticas y macrófagos lo que lleva a la posterior presentación de antígenos tumorales y la respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos del tumor¹²⁸. Por su parte, las HSP son proteínas intracelulares altamente conservadas con propiedades citoprotectoras y anti-apoptóticas. Estas se comportan como proteínas chaperonas

ayudando a otras proteínas recién formadas a plegarse. Se ha observado que la inducción de la expresión de HSP en respuesta a muerte celular y su translocación y exposición en la superficie, aumenta la inmunogenicidad de las células tumorales y mejora la eliminación de la masa tumoral *in vivo*¹¹⁹. Es más, el incremento de la presencia de proteínas HSP en la membrana celular inducido por tratamientos quimioterapéuticos se correlaciona con una mayor activación de células dendríticas¹²⁹.

3. Liberación de HMGB-1 (del inglés, *High-Mobility Group Box Protein*). HMGB-1 se une a los receptores de células dendríticas TLR4 (del inglés, *Toll Like Receptor 4*) interviniendo así en respuesta inflamatoria. TLR4 estimula el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales procedentes de células bajo proceso de muerte inducida por agentes anticancerígenos^{121,130}. Adicionalmente, la translocación de la proteína HMGB-1 al citosol desencadena la disociación del complejo BCL-2 / BCL-X_L-Beclin 1 e induce autofagia^{107,131,132}.

No todos los inductores de ICD activan las mismas respuestas de estrés y, por lo tanto, tampoco provocan las mismas señales moleculares o *hallmarks*¹²¹.

Durante la ICD, los DAMPs son objeto de tráfico activo dependiente de vías de señalización de peligro. A grandes rasgos, estos mensajeros de inmunogenicidad, al unirse a receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), expresados por células dendríticas, inician una respuesta en cascada que culmina con la activación tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa y la inflamación. Estas vías de señalización de peligro son provocadas y reguladas por una relación compleja entre escenarios de estrés en el RE, producción de ROS a nivel mitocondrial, ciertos procesos metabólicos como la autofagia y factores extrínsecos a las propias células. Estos últimos, influyen en la respuesta de las vías de señalización de peligro pudiendo colaborar con la inducción de beneficios antitumorales o, por el

contrario, promoviendo ventaja para el crecimiento del tumor¹³³. En definitiva, la ICD presenta un patrón de respuesta altamente dependiente de factores que promueven inducción de escenarios de estrés en distintos orgánulos celulares culminando con la muerte celular acompañada de la liberación o exposición de un número variable de DAMPs. Los principales orgánulos vinculados al estrés son el RE y la mitocondria. Esto es, la ejecución de ICD requiere alteración del equilibrio redox en el RE, lo que, a su vez, induce la producción de ROS en el RE y en las mitocondrias. La inducción de estrés oxidativo es crucial para estimular vías de señalización de peligro mediante el tráfico y la emisión de señales de DAMPs^{120,134}. Estudios bioquímicos y celulares han validado el papel fundamental de las respuestas al estrés del RE para el tráfico extracelular de DAMPs. Igualmente, las mitocondrias están profundamente involucradas en las vías de señalización provocadas por perturbaciones en la homeostasis. Por un lado, las mitocondrias son capaces de interpretar las señales de peligro que reciben para traducirlas en respuestas adaptativas. Por otro lado, las mitocondrias bajo condiciones de estrés emiten estas señales intracelulares de peligro que son traducidas por la célula en respuestas homeostáticas y en DAMPs. Si no se puede restaurar la homeostasis, se produce la muerte celular¹²².

Son varias las vías de muerte celular por las que puede culminar la ICD. De hecho, en una única célula pueden coexistir varias cascadas de muerte; la interconexión de las mismas es esencial e inevitable. Entre ellas se encuentra la piroptosis que se considera un tipo de muerte celular inmunogénica ya que se asocia a la liberación de proteínas pro-inflamatorias. La activación de la piroptosis en las células tumorales induce inmunidad antitumoral eficaz que se sinergiza con el efecto directo del tratamiento antitumoral^{119,134}. La piroptosis se determina por el procesamiento, vía caspasas, de la proteína Gasdermina D o E (GSDMD o GSDME). Una vez fragmentada, GSDM forma grandes poros en la membrana plasmática que conducen a la muerte celular. Paralelamente los monocitos

y macrófagos activan la caspasa 1 y la caspasa 8, estas a su vez procesan dos citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y IL-18. Una vez procesadas, la IL-1 β y la IL-18 son liberadas a través de los poros formados por GSDM junto con otras señales de alarma, esto genera grandes cambios en la respuesta inmune ^{121, 124}.

Paralelamente a la piroptosis, otras rutas de muerte también se encuentran relacionadas con inflamación; la inflamación es un proceso de reparación biológica fuertemente ligada al complejo inflamasoma⁶¹, un complejo multiproteico que comprende un sensor intracelular, responsable de la activación de los procesos inflamatorios. El término inflamasoma fue acuñado por Tschopp y colaboradores en el año 2002¹³⁵ para describir un complejo multiproteico, de alto peso molecular, presente en el citosol de células inmunes estimuladas, dicho complejo es capaz de mediar la activación de caspasas inflamatorias, llamadas así porque sus sustratos principales son citoquinas (como pro-IL-1 β , pro-IL-18 y eventualmente pro-IL-33)^{135,136}.

La activación descontrolada del inflamasoma, está vinculada al desarrollo de cáncer, enfermedades autoinmunitarias, metabólicas y neurodegenerativas¹³⁷. Por lo tanto, el estricto control del ensamblaje y señalización del inflamasoma es crucial para permitir que el sistema inmunitario inicie respuestas inflamatorias adecuadas^{136,138}.

Por otro lado, con respecto a la respuesta inmune y a la inflamación, la vía NF- κ B está estrechamente relacionado con las decisiones de vida y muerte; se encarga de regular la producción de citoquinas e inflamación (uno de los parámetros clave que define la ICD)^{121,139,140}. Esta ruta forma parte del mecanismo de autodefensa de las células ante señales inflamatorias, virales, bacterianas, y, en definitiva, señales que provocan estrés en la célula. Se ha demostrado que es responsable de la desensibilización, quimiorresistencia y radiorresistencia, tan indeseables para la eficacia de ciertas terapias^{141,142}.

NF- κ B, está presente de manera inactiva en todas las células. Cuando su inhibidor I κ B es fosforilado se degrada por el proteosoma y NF- κ B se transloca al núcleo y se une a regiones promotoras de sus genes diana produciendo así su transactivación. Gracias a la regulación de estos genes, la vía NF- κ B va a actuar regulando la inflamación, el ciclo celular, la angiogénesis, la invasión y metástasis, la actividad apoptótica y la propia vía NF- κ B. La activación constitutiva de NF- κ B está presente en tumores sólidos, hepáticos, colorectales, de pulmón, mama, próstata, ovario, páncreas y faríngeo. Además, se ha demostrado esta activación constitutiva en enfermedades hematológicas como en el linfoma de Hodgkin. Este estado también genera resistencia a la quimioterapia y radioterapia^{23,141-144}.

Existen tres rutas NF- κ B: la clásica o canónica, la alternativa o no canónica y la atípica; diferenciadas por la naturaleza del estímulo. En las tres vías el proteosoma es un orgánulo importante ya que en todas ellas encontramos un proceso de degradación proteosomal que permite la activación del sistema. Por tanto, uno de los inhibidores de esta vía son los inhibidores del proteosoma^{145,146}.

9.2 ICD, cáncer e inmunoterapia:

En los organismos inmunocompetentes la ICD implica la activación de sistema inmune en contra de las células cancerígenas (respuesta inmune antitumoral). En pacientes de cáncer se desencadena tras aplicar tratamientos de radioterapia¹³⁴ o al administrar distintos tipos de drogas quimioterapéuticas¹³¹.

La liberación de DAMPs por parte de las células tumorales moribundas resulta en la activación de una respuesta inmune específica contra el tumor. Consecuentemente, tanto los DAMPs como los procesos asociados a estos, pueden tener un valor pronóstico y predictivo en pacientes afectados por distintos tumores. Así pues, comprender las vías moleculares por las que ciertos tratamientos contra el cáncer inducen DAMPs y activan el sistema inmunológico del huésped, ofrece la posibilidad de convertir inductores de

muerte celular no inmunogénica en potentes inductores de ICD. Además, abre la puerta al estudio y empleo de la interacción entre cáncer y sistema inmunitario; una nueva estrategia terapéutica conocida como inmunoterapia contra el cáncer.

La idea de utilizar el sistema inmunológico como herramienta para el tratamiento de enfermedades neoplásicas surgió en el siglo XIX. Wilhelm Busch and Friedrich Fehleisen fueron los primeros en vincular el estado inmunológico del paciente con el desarrollo o la regresión de cáncer¹⁴⁷. Posteriormente William Coley, reconocido como el padre de la inmunoterapia, observó que el índice de supervivencia, tras la cirugía de un tumor, era mayor cuando se producía una infección bacteriana. En 1891 inyectó, directamente en el tumor de un paciente de cáncer, *Streptococcus pyogenes* causante de la infección de la piel erisipela y observó que, en efecto, el tumor se redujo¹⁴⁸.

Por lo tanto, la inmunoterapia está orientada a intensificar y restaurar el sistema inmunitario del paciente lo que la hace imprescindible a la hora de combatir el cáncer. Esto es debido a que, gran parte de las células cancerosas han desarrollado habilidades para evadir la vigilancia del sistema inmune, eliminando activamente las respuestas inmunitarias a través de la regulación a la baja de la presentación de antígenos, suprimiendo la activación de los linfocitos T o mostrando transformaciones que dificultan su reconocimiento (moléculas inmunoregulatoras en la superficie celular).

La inmunoterapia puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos de acción. Una de las estrategias consiste en la activación y proliferación de los linfocitos T a través de anticuerpos monoclonales que inhiben los puntos de control del sistema inmunológico encargados de mantener inactivadas las células T, evitando así reacciones inmunitarias persistentes. De hecho, el linfocito T, y especialmente su capacidad para provocar citotoxicidad dependiente del reconocimiento de antígenos, se ha convertido en el foco

central para involucrar al sistema inmune en la lucha contra el cáncer; es el caso de PDL1, un ligando en la superficie de las células que interactúa con su receptor específico, PD1, que se encuentra en los linfocitos T. Los tejidos sanos expresan PDL1 de forma normal, pero las células cancerígenas lo sobreexpresan. Por lo tanto, cuando los linfocitos T interactúan con ellas, reciben una gran cantidad de señales de inhibición a través de la interacción PD1-PDL1. El desarrollo de terapias con anticuerpos monoclonales que se unen a PD1 en las células T y bloquea la interacción con PDL1 en las células tumorales, disminuye la supresión inmunitaria inducida por el tumor (Figura 5).

Otro caso similar se encuentra en el anticuerpo monoclonal Ipilimumab dirigido al antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)¹⁴⁹.

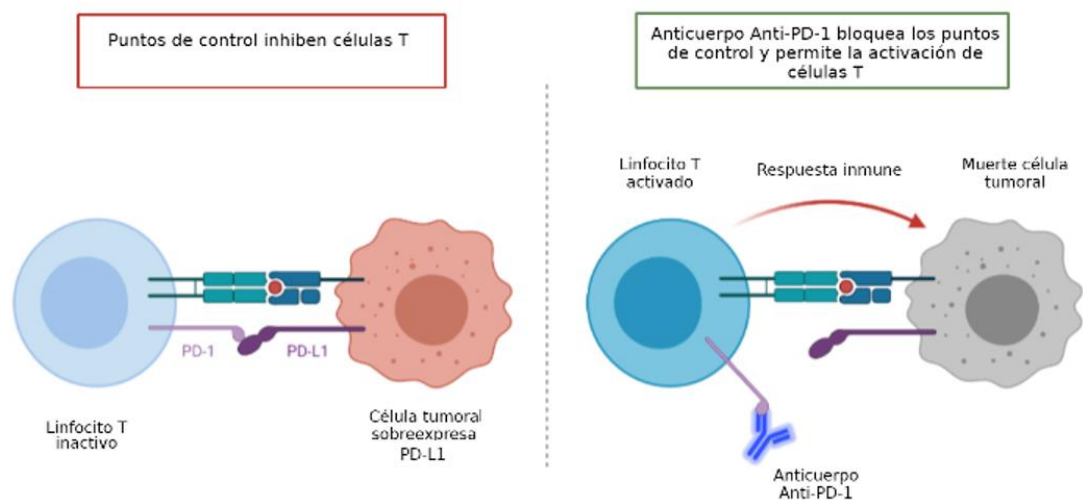


Figura 5. Imagen representativa del mecanismo de acción de las terapias anticancerígenas con anticuerpos monoclonales anti-PD1 encargados de evitar la inactivación de los linfocitos T por parte de las células tumorales y promover así una respuesta inmune anticancerígena.

Además, cada vez va adquiriendo más importancia otra alternativa inmunoterapéutica; la reeducación de los linfocitos T mediante vacunas que activan las células presentadoras de antígenos. Se ha demostrado que la inyección subcutánea de células tumorales moribundas, capaces de inducir ICD, provoca un efecto de vacuna anticancerígena^{147,149,150}.

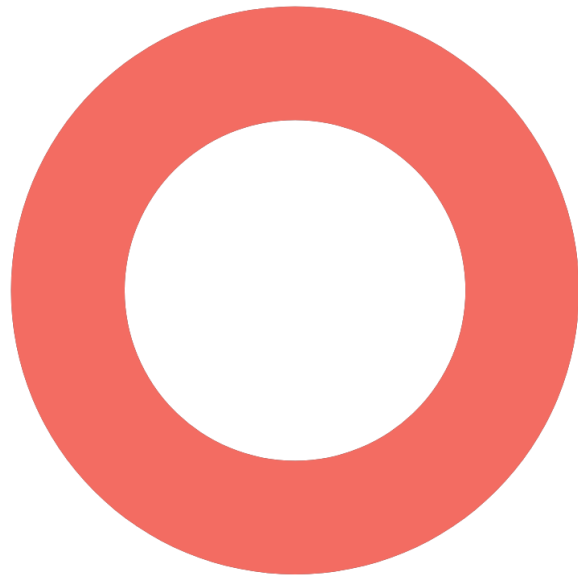
Para el desarrollo de vacunas antitumorales se somete a secuenciación de DNA una muestra del tejido sano y otra del tejido tumoral del paciente con cáncer. Los resultados obtenidos se analizan por análisis bioinformático con el fin de identificar variantes de genes que codifican péptidos específicos del tejido tumoral, conocidos como neoantígenos o antígenos asociados a tumores (AATs)¹⁵¹ que actúan como dianas terapéuticas para cada tumor y para cada paciente y que, por lo tanto, su caracterización ayuda a perfeccionar terapias dirigidas que atacan exclusivamente a esas proteínas mutadas. Estas vacunas se administran al paciente combinando o bien antígenos tumorales específicos del tumor o bien lisados de células cancerígenas junto con adyuvantes como células dendríticas autólogas, sales minerales o ácidos nucleicos¹⁵².

La inmunoterapia, al contrario que la quimioterapia se asocia con una reducción de la probabilidad de desarrollo eventos adversos (EAs) severos. Por el contrario, EAs relacionados con el sistema inmunitario son más comunes en pacientes tratados con inmunoterapia. En concreto, el uso de inhibidores de los puntos de control se ha relacionado con toxicidad cardíaca, rara pero potencialmente mortal, como la miocarditis por lo que requieren seguimiento clínico. Comprender los eventos EAs relacionados con el tratamiento de estos medicamentos en comparación con la quimioterapia tradicional es crucial para la práctica clínica¹⁵⁰.

En definitiva, la inmunoterapia contra el cáncer ha revolucionado el campo de la oncología al mostrar un gran potencial para prolongar la supervivencia de los pacientes con cáncer de crecimiento rápido y mal pronóstico¹⁴⁸. Actualmente se necesita más investigación sobre el potencial de la inmunoterapia en entornos clínicos, valorar su toxicidad y la aparición de resistencias. Del mismo modo, el desarrollo de enfoques metodológicos y plataformas para identificar nuevos inductores de ICD ayudarán a acelerar el desarrollo de la próxima generación de terapias anticancerígenas que conecten la quimioterapia con la inmunoterapia. Igualmente, sería de gran

ventaja, poder contar con la identificación de biomarcadores que estratifiquen a los pacientes según el riesgo o beneficio que supone el uso de estas terapias en cada caso¹¹⁹.

Referencias bibliográficas



1. Vogt KC. Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelerkroete (*Alytes obstetricians*). Solothurn: Jent und Gassmann. 1842; 130 p.
2. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25:486–541.
3. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, Kroemer G. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73:2405–10.
4. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death in disease: Mechanisms and emerging therapeutic concepts. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1570–83.
5. Cruz-Martín-del-Campo SL, González-Espinosa C, Ruiz-Quiñonez AK, Carranza-Aguilar CJ. Types of cell death and their clinical implications. *Resid*. 2020;15(3):97–112.
6. Rubinstein AD, Kimchi A. Life in the balance - A mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci*. 2012;125:5259–68.
7. Cory S, Adams JM. The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):647–56.
8. Panda P, Ray S, Behera S, Tripathy S, Bhanja SS, Acharya V. A review on apoptosis: When death precedes life. *Eur J Mol Clin Med*. 2020;7(6):1174–82.
9. Eidet JR, Pasovic L, Maria R, Jackson CJ, Utheim TP. Objective assessment of changes in nuclear morphology and cell distribution following induction of apoptosis. *Diagn Pathol*. 2014;9.

10. Hughes J, Gobe G. Identification and quantification of apoptosis in the kidney using morphology, biochemical and molecular markers. *Nephrology*. 2007;12(5):452-8.
11. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol*. 2003;171(9):4672-9.
12. Rong Y, Distelhorst CW. Bcl-2 protein family members: Versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:73-91.
13. Klee M, Pallauf K, Alcalá S, Fleischer A, Pimentel-Muiños FX. Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J*. 2009 Jun 17;28(12):1757-68.
14. Pimentel-Muiños FX, Boada-Romero E. Selective autophagy against membranous compartments: Canonical and unconventional purposes and mechanisms. 2014;10(3):397-407.
15. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
16. Naim S, Kaufmann T. The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK. *Front Cell Dev Bio*. 2020;8.
17. Carpio MA, et al. BCL-2 family member BOK promotes apoptosis Acad, in response to endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl*. 2015;112(23):7201-06.
18. Fernández-Marrero Y, Bleicken S, Das KK, Bachmann D, Kaufmann T, Garcia-Saez AJ. The membrane activity of BOK involves formation of large, stable toroidal pores and is promoted by cBID. *FEBS J*. 2017;284(5):711-24.
19. Einsele-Scholz S, Malmsheimer S, Bertram K, Stehle D, Johanning J, Manz M, et al. Correction: Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak. *J Cell Sci*. 2016;129(11): 2213-23.

20. Schulman JJ, Wright FA, Han X, Zluhan EJ, Szczesniak LM, Wojcikiewicz RJH. The stability and expression level of Bok are governed by binding to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem.* 2016;291(22):11820–8.
21. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 2012;19:36–41.
22. Alondo Gil R, Izquierdo Pastor M (dir). Regulación de la muerte celular inducida por activación en linfocitos T. Papel de la Diacilglicerol Quinasa alfa [tesis doctoral]. Instituto de Biología y Genética Molecular: Universidad de Valladolid-CSIC; 2005.
23. Van Herreweghe F, Festjens N, Declercq W, Vandenabeele P. Tumor necrosis factor-mediated cell death: To break or to burst, that's the question. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(10):1567–79.
24. Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez F. Citología e histología vegetal y animal: biología de las células y tejidos animales y vegetales. Editorial McGraw-Hill-Interamericana de España; 2007.
25. Klee M, Pimentel-Muiños FX (dir). Caracterización funcional de la molécula proapoptótica Bak en el retículo endoplasmático [tesis doctoral]. Centro de Investigación del Cáncer: Universidad de Salamanca – CSIC; 2008.
26. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):32–43.
27. Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis.* 2010;1.
28. Obeng E. Apoptosis (Programmed cell death) and its signals-a review. *Braz J Biol.* 2021;81(4):1133–43.

29. Shi Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(6):677–84.
30. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol.* 2011;3(4):279–96.
31. Shoesmith Berke SJ, Flores Schmied FA, Brunt ER, Ellerby LM, Paulson HL. Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3. *J Neurochem.* 2004;89(4):908–18.
32. Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA. Bid is Cleaved by Calpain to an Active Fragment in Vitro and during Myocardial Ischemia/Reperfusion. *J Biol Chem.* 2001;276(33):30724–8.
33. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families: Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol.* 2000;150(4):887–94.
34. Shao G, Wang L, Wang X, Fu C. Apaf-1/caspase-4 pyroptosome: a mediator of mitochondrial permeability transition-triggered pyroptosis. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6.
35. Malet Engra G, Pérez-Payá E (dir). Identificación de moduladores del apoptosoma mediante química combinatoria [tesis doctoral]. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular: Universidad de Valencia; 2005.
36. Noori AR, Tashakor A, Nikkhah M, Eriksson LA, Hosseinkhani S, Fearnhead HO. Loss of WD2 subdomain of Apaf-1 forms an apoptosome structure which blocks activation of caspase-3 and caspase-9. *Biochimie* 2021;180:23–9.
37. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie.* 2017;135:111–25.
38. Wu CC, Lee S, Malladi S, Chen M Der, Mastrandrea NJ, Zhang Z, et al. The Apaf-1 apoptosome induces formation of caspase-9 homo- and heterodimers with distinct activities. *Nat Commun.* 2016;7:1–14.

39. Reiners JJ, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves bid cleavage. *Cell Death Differ.* 2002;9(9):934-44.
40. Noori AR, Hosseini ES, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Apoptosome formation upon overexpression of native and truncated Apaf-1 in cell-free and cell-based systems. *Arch Biochem Biophys.* 2018;642:46-51.
41. Songyang Z, Baltimore D, Cantley LC, Kaplan DR, Franke TF. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11345-50.
42. Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, Gao D, Tseng A, Maser RS, et al. SCFFBW7 regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature.* 2011;471(7336):104-9.
43. Hsieh CH, Pai P, Wu JP, Ho TJ, Wu CH, Shibu MA, et al. Activation of IGF-I survival signaling and its compensative inhibition of the cardiac apoptosis on carotid arteries balloon-injured rat hearts. *Chin J Physiol.* 2017;60(3):166-73.
44. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: Critical Control Points. *Cell.* 2004;116(2):205-19.
45. Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S, Houtzager VM, Seiden I, Keen SLC, et al. Cell death attenuation by “Usurpin”, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ.* 1998;5(4):271-88.
46. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 1997;388(6638):190-5.
47. Clapp C, Portt L, Khoury C, Sheibani S, Norman G, Ebner P, et al. 14-3-3 Protects against stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 2012;3(7).

48. Fanger GR, Widmann C, Porter AC, Sather S, Johnson GL, Vaillancourt RR. 14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases. *J Biol Chem*. 1998;273(6):3476–83.
49. Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*. 2002;9(1):20–6.
50. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: Translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004;64(20):7183–90.
51. Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ*. 2018;25(1):104–13.
52. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2016;1863(12):2977–92.
53. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):621–32.
54. Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(2):85–100.
55. Rodriguez DA, Zamorano S, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Urra H, Cubillos-Ruiz JR, et al. BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1 α . *EMBO J*. 2012;31(10):2322–35.
56. Annibaldi A, Meier P. Checkpoints in TNF-Induced Cell Death: Implications in Inflammation and Cancer. *Trends Mol Med*. 2018;24(1):49–65.

57. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2011;1813(4):558–63.
58. Zeng T, Peng L, Chao H, Xi H, Fu B, Wang Y, et al. IRE1 α -TRAF2-ASK1 complex-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction contribute to CXC195-induced apoptosis in human bladder carcinoma T24 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(3):530–6.
59. Kreckel J, Anany MA, Siegmund D, Wajant H. TRAF2 controls death receptor-induced caspase-8 processing and facilitates proinflammatory signaling. *Front Immunol.* 2019;10.
60. Liu H, Su D, Zhang J, Ge S, Li Y, Wang F, et al. Improvement of Pharmacokinetic Profile of TRAIL via Trimer-Tag Enhances its Antitumor Activity in vivo. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11.
61. Legrand AJ, Konstantinou M, Goode EF, Meier P. The Diversification of Cell Death and Immunity: Memento Mori. *Mol Cell.* 2019;76(2):232–42.
62. Shlyakhtina Y, Pavet V, Gronemeyer H. Dual role of DR5 in death and survival signaling leads to TRAIL resistance in cancer cells. *Cell Death Dis* 2017;8(8):e3025.
63. Prager I, Liesche C, Van Ooijen H, Urlaub D, Verron Q, Sandström N, et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J Exp Med.* 2019;216(9):2113–27.
64. Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 2019;29(5):347–64.
65. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
66. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):448.

67. Derakhshan A, Chen Z, Waes C Van, Section TB, Branch NS, Disorders OC. Therapeutic small-molecules target inhibitor of apoptosis proteins in cancers with deregulation of extrinsic and intrinsic cell death pathways. *Clin Cancer Res.* 2017;23(6):1379–87.
68. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer.* 2015;112(6):957–62.
69. Rudin CM, Hann CL, Garon EB, Oliveira MR De, Bonomi PD, Camidge DR, et al. Phase II Study of Single-Agent Navitoclax (ABT-263) and Biomarker Correlates in Patients with Relapsed Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;18(11):3163–9.
70. Lochmann TL, Floros K V, Naseri M, Powell KM, March RJ, Stein GT, et al. Venetoclax is effective in small cell lung cancers with high BCL-2 expression. *Clin Cancer Res.* 2018;24(2):360–9.
71. Rehmat Jan, Chaudhry G-S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull.* 2019;9(2):205–18.
72. Elrod HA, Sun SY. Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(2):163–73.
73. Cao C, Shinohara ET, Niermann KJ, Donnelly EF, Chen X, Hallahan DE, et al. Murine double minute 2 as a therapeutic target for radiation sensitization of lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(8):1137–45.
74. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic control of autophagy. *Cell.* 2014;159(6):1263–76.
75. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(9):709–30.
76. Kasprowska-Liśkiewicz D. The cell on the edge of life and death: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Postep Hig Med Dosw.* 2017;71:825–41.

77. Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev Cell*. 2017;41(1):10–22.
78. Kourtis N, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):21–30
79. Terenzi A, Pirker C, Keppler BK, Berger W. Anticancer metal drugs and immunogenic cell death. *J Inorg Biochem*. 2016;165:71–9.
80. Levine B, Klionsky DJ. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(2):201–5.
81. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol*. 2018;20(5):521–7.
82. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010;90(4):1383–435.
83. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728–41.
84. Nascimbeni AC, Codogno P, Morel E. Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. *FEBS J*. 2017;284(9):1267–78.
85. Wei Y, Sinha S, Levine B. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy*. 2008;4(7):949–51.
86. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):124–31.
87. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1865.
88. Katayama H, Kogure T, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A. A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic

- events based on lysosomal delivery. *Chem Biol.* 2011;18(8):1042–52.
89. Vinod V, Padmakrishnan CJ, Vijayan B, Gopala S. How can i halt thee? the puzzles involved in autophagic inhibition. *Pharmacol Res.* 2014;82:1–8.
90. Serramito-Gómez I, Boada-Romero E, Villamuera R, Fernández-Cabrera Á, Cedillo JL, Martín-Regalado Á, et al. Regulation of cytokine signaling through direct interaction between cytokine receptors and the ATG16L1 WD40 domain. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–15.
91. Van der Voorn L, Ploegh HL. The WD-40 repeat. 1992;307 (2):131–4.
92. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* 2003;116(9):1679–88.
93. Temple FSmith, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(5):181–5.
94. Boada-Romero E, Letek M, Fleischer A, Pallauf K, Ramón-Barros C, Pimentel-Muiños FX. TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. *EMBO J.* 2013;32(4):566–82.
95. Boada-Romero E, Serramito-Gómez I, Sacristán MP, Boone DL, Xavier RJ, Pimentel-Muiños FX. The T300A Crohn's disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nat Commun.* 2016;7:11821.
96. Villamuera R, Fernández-Cabrera A, Serramito-Gómez I, Terraza-Silvestre E, Taouil R, Pimentel-Muiños FX. Unconventional WD40 domain-dependent role of ATG16L1 in the regulation of IL10R

- (interleukin 10 receptor) endocytosis, trafficking and signaling. *Autophagy*. 2021;17(9):2639-41.
97. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463-77.
98. Fujita N, Saitoh T, Kageyama S, Akira S, Noda T, Yoshimori T. Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease and canonical autophagy: Analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2009;284(47):32602-9.
99. Nishimura T, Kaizuka T, Cadwell K, Sahani MH, Saitoh T, Akira S, et al. FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Rep*. 2013;14(3):284-91.
100. Onishi M, Yamano K, Sato M, Matsuda N, Okamoto K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J*. 2021;40(3):e104705.
101. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*. 2013;20(1):31-42.
102. Ding WX YX. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*. 2012;393(7):547-64.
103. Ge P, Dawson VL, Dawson TM. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: A source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2020;15(1):20.
104. Chen G, Kroemer G, Kepp O. Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:200.
105. Fan Y, Zong WX. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chin J Cancer*. 2013;32(3):121-29.
106. Lin Y, Jiang M, Chen W, Zhao T, Wei Y. Cancer and ER stress: Mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response. *Biomed Pharmacother*. 2019;118.

107. Gordy C, He YW. The crosstalk between autophagy and apoptosis: Where does this lead? *Protein Cell*. 2012;3(1):17-27.
108. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009;16(7):966-75.
109. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2006;8(10):1124-32.
110. Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun J Il, Woo HN, et al. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: Dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20722-9.
111. Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2011;44(5):698-709.
112. Lu R, Zhang YG, Xia Y, Sun J. Imbalance of autophagy and apoptosis in intestinal epithelium lacking the vitamin D receptor. *FASEB J*. 2019;33(11):11845-56.
113. Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *EMBO J*. 2010;29(3):606-18.
114. Chen Y, Zhang W, Guo X, Ren J, Gao A. The crosstalk between autophagy and apoptosis was mediated by phosphorylation of Bcl-2 and beclin1 in benzene-induced hematotoxicity. *Cell Death Dis*. 2019;10(10):1-15.
115. Li W, Zou W, Yang Y, Chai Y, Chen B, Cheng S, et al. Autophagy genes function sequentially to promote apoptotic cell corpse degradation in the engulfing cell. *J Cell Biol*. 2012;197(1):27-35.
116. Laussmann MA, Passante E, Düssmann H, Rauen JA, Würstle ML, Delgado ME, et al. Proteasome inhibition can induce an

- autophagy-dependent apical activation of caspase-8. *Cell Death Differ.* 2011;18(10):1584–97.
117. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata JI, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006;441 (7095):880–884.
118. Suzuki SW, Onodera J, Ohsumi Y. Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One.* 2011;6(2):e17412.
119. Ahmed A, Tait SWG. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Mol Oncol.* 2020;14(12):2994–3006.
120. Garg AD, Dudek-Peric AM, Romano E, Agostinis P. Immunogenic cell death. *Int J Dev Biol.* 2015;59(1–3):131–40.
121. Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):1–13.
122. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: Master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):780–8.
123. Garg AD, Krysko D V., Vandenabeele P, Agostinis P. Extracellular ATP and P2X7 receptor exert contextspecific immunogenic effects after immunogenic cancer cell death. *Cell Death Dis.* 2016;7(2):e2097–e2097.
124. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol.*
125. Wang Y, Martins I, Ma Y, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Autophagy-dependent ATP release from dying cells via lysosomal exocytosis. *Autophagy.* 2013;9(10):1624–5.
126. Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, Shen S, et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):79–91.
127. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Martins I, Kroemer G, et al. Tumor cell death and ATP release prime

- dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res.* 2010;70(3):855-8.
128. Garg AD, Krysko DV, Verfaillie T, Kaczmarek A, Ferreira GB, Marysael T, et al. A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J.* 2012;31(5):1062-79.
129. Wang Q, Ju X, Wang J, Fan Y, Ren M, Zhang H. Immunogenic cell death in anticancer chemotherapy and its impact on clinical studies. *Cancer Lett.* 2018;438:17-23.
130. Bianchi ME. Killing cancer cells, twice with one shot. *Cell Death Dis.* 2014;21(1):1-2.
131. Kang R, Livesey KM, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. HMGB1: A novel Beclin 1-binding protein active in autophagy. *Autophagy.* 2010;6(8):1209-11.
132. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(26):11942-47.
133. Garg AD, Martin S, Golab J, Agostinis P. Danger signalling during cancer cell death: Origins, plasticity and regulation. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):26-38.
134. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:51-72.
135. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell.* 2002;10(2):417-26.
136. Man SM, Karki R, Kanneganti TD. AIM2 inflammasome in infection, cancer, and autoimmunity: Role in DNA sensing, inflammation, and innate immunity. *Eur J Immunol.* 2016;46(2):269-80.

137. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):262–75.
138. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):210–5.
139. Lerebours F, Vacher S, Andrieu C, Espie M, Marty M, Lidereau R, et al. NF-kappa B genes have a major role in Inflammatory Breast Cancer. *BMC Cancer*. 2008;8(1):1–11.
140. Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, Rieux-Laucat, F, Weil R. NF-κB: at the borders of autoimmunity and inflammation. *Front Immunol*. 2021;3169.
141. Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: Its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5–6):883–8.
142. Sun Z, Andersson R. NF-κB activation and inhibition: A review. *Shock*. 2002;18(2):99–106.
143. Xiao C, Ghosh S. NF-κB, an Evolutionarily Conserved Mediator of Immune and Inflammatory Responses. *Mech Lymph Act immune Regul X*. 2005;560:41–5.
144. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):1–46.
145. Hsu SM, Yang CH, Shen FH, Chen SH, Lin CJ, Shieh CC. Proteasome inhibitor bortezomib suppresses nuclear factor-kappa b activation and ameliorates eye inflammation in experimental autoimmune uveitis. *Mediators Inflamm*. 2015.
146. Palombella VJ, Conner EM, Fuseler JW, Destree A, Davis JM, Laroux FS, et al. Role of the proteasome and NF-κB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(26), 15671–15676.

147. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat.* 2017;3:250-261.
148. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(11):651-68.
149. Ny L, Jespersen H, Karlsson J, Alsén S, Filges S, All-eriksson C, et al. The PEMDAC phase 2 study of pembrolizumab and entinostat in patients with metastatic uveal melanoma. *Nat Commun.* 2021; 12(1):1-10.
150. Magee DE, Hird AE, Klaassen Z, Sridhar SS, Nam RK, Wallis CJD, et al. Adverse event profile for immunotherapy agents compared with chemotherapy in solid organ tumors: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Ann Oncol.* 2020;31(1):50-60.
151. Hammerich L, Binder A, Brody JD. In situ vaccination: Cancer immunotherapy both personalized and off-the-shelf. *Mol Oncol.* 2015;9(10):1966-81.
152. Wang Y, Gong N, Ma C, Zhang Y, Tan H, Qing G, et al. An amphiphilic dendrimer as a light-activable immunological adjuvant for in situ cancer vaccination. *Nat Commun.* 2021;12(1):1-16.

«No simplemente despiertas y te conviertes en mariposa. Crecer
es un proceso».

Rupi Kaur