

MUERTE CELULAR Y CÁNCER: LAS VÍAS DE LA APOPTOSIS Y DE LA AUTOFAGIA COMO DIANAS EN LA TERAPIA DEL CÁNCER

DOCTORA DÑA. EVANGELINA PALACIOS
*Académica de Número de la sección de Farmacia
de la Real Academia de Doctores de España*

DOCTORA DÑA. M. J. MIRÓ
*Profesora de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid*

DOCTORA DÑA. CONSUELO BOTICARIO
*Académica Correspondiente de la sección de Farmacia
de la Real Academia de Doctores de España*

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja y progresiva que se origina por la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la transformación de una célula normal en maligna. Este proceso multifactorial configura una vía dinámica y única para cada tumor, que hace extremadamente difícil determinar las alteraciones que causan, mantienen y propagan la enfermedad (1). La mutación de genes reguladores (protooncogenes y/o genes supresores de tumores) evoluciona hasta motivar alteraciones en vías y procesos esenciales para el normal desarrollo y funcionamiento del organismo. La pérdida de la regulación de esas vías se manifiesta en un incremento de la actividad del ciclo celular, disminución de la actividad de las vías de diferenciación, pérdida de efectividad de los mecanismos de reparación del ADN y descenso de la muerte celular (2).

La erradicación de las células dañadas, para evitar su multiplicación, es la estrategia principal de protección frente al cáncer. En las células normales existen varios mecanismos que provocan la muerte celular, pero en estos procesos participan proteínas clave (supresoras de tumores) que frecuentemente se inactivan durante la génesis del cáncer. Por ello, un factor central de la progresión de esta enfermedad es la inactivación de las vías de muerte celular (3). Es bien conocido que las células cancerosas no sufren apoptosis y que la evolución clonal del cáncer selecciona las células caracterizadas por su elevada actividad proliferativa y capacidad de supervivencia. Por otra parte la alteración de los componentes de las vías de muerte celular supone una barrera para la eficacia de muchas formas de terapia anticancerosa, cuya respuesta depende de la actividad de esas proteínas (4).

Entre los mecanismos más importantes que regulan el equilibrio entre el crecimiento y la muerte de las células, se encuentra la muerte celular programada (PCD), proceso conservado a través de la evolución que decide el destino de la célula. Por lo tanto, para el desarrollo de estrategias racionalizadas destinadas a provocar la muerte de las células neoplásicas es de importancia crucial la identificación de nuevos factores y vías que regulan la viabilidad celular. Por ello, en la última década la PCD ha recibido atención destacada y creciente en la búsqueda de nuevas dianas para el tratamiento del cáncer (5). Los estudios de muerte celular programada en cáncer se han

centrado en la *apoptosis*, sin embargo, más recientemente, la atención se ha dirigido también a otro proceso que tiene profundos efectos sobre la viabilidad celular, la *autofagia*. Mientras la apoptosis contribuye invariablemente a la muerte de las células cancerosas, la autofagia juega el papel de Jano en la supervivencia y muerte de estas células. En este artículo se revisa, en primer lugar, la regulación de vías de señalización de muerte celular programada, enfocada a las estrategias para el ataque de las células cancerosas a través de las vías apoptóticas claves para la terapia de esta enfermedad; en segundo lugar se analiza el doble papel que desempeña la autofagia en el desarrollo del cáncer y las implicaciones terapéuticas; finalmente, se hará referencia a la intrincada relación entre ambas vías de señalización. Estos conocimientos facilitarán, en última instancia, la utilización de las vías de la apoptosis y de la autofagia como dianas terapéuticas en la lucha contra el cáncer.

II. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

Las principales vías de muerte celular son: apoptosis, muerte con autofagia, necrosis y catástrofe mitótica, cada uno de estos tipos de muerte induce en la célula una serie de cambios bioquímicos y morfológicos característicos.

La catástrofe mitótica se produce durante la metafase como consecuencia de una mitosis abortiva y se caracteriza por la presencia de aneuploidía y multinucleación.

La muerte de las células por necrosis se acompaña de una serie de cambios morfológicos que incluye la fragmentación de la membrana plasmática y la salida de los constituyentes celulares al medio extracelular, lo que provoca una potente respuesta inflamatoria (6). Cuando la apoptosis no es funcional, la necrosis es la principal forma de muerte que sufren las células en respuesta a la administración de fármacos (4).

En la apoptosis (del griego «apo», hacia y «ptosis», caída), PCD tipo I, se produce reducción del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, activación de caspasas, fragmentación del ADN, vesiculación de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos que finalmente serán fagocitados por macrófagos o por las propias células vecinas para su eliminación. Es una muerte limpia, no provoca inflamación en tejidos circundantes (7).

A diferencia de la apoptosis, la autofagia (del griego auto: uno mismo y phagy: comer), PCD tipo II, depende de la presencia de autofagosomas, autolisosomas, así como de un núcleo celular intacto. La autofagia se observó por primera vez en 1960, cuando se demostró también que era un proceso específico de las células eucariotas (8), mediante el cual, las proteínas disfuncionales, el ADN y los orgánulos dañados se transfieren al lisosoma para su degradación, funcionando así, como un mecanismo homeostático que afecta a la integridad de ambos, genoma y proteoma. Por otra parte, los productos de la degradación (nucleótidos, aminoácidos y ácidos grasos) pueden ser reciclados para sintetizar macromoléculas y ATP que se utilizan para el mantenimiento básico de la vida celular. La autofagia funciona en este sentido, como mecanismo de supervivencia de las células. Son numerosas, sin embargo, las investigaciones que han demostrado que la autofagia no es sólo una respuesta de supervivencia a factores de crecimiento o a la carencia de nutrientes sino también, un importante mecanismo molecular para el suicidio de las células tumorales (9).

Aunque apoptosis y autofagia tienen distintas características morfológicas y soportan diferentes procesos fisiológicos, ambas vías señalizadoras mantienen compleja colaboración. A veces, estos procesos ejercen efectos sinérgicos mientras que en otras ocasiones la autofagia se activa cuando se suprime la apoptosis (10). Por otra parte, estudios recientes han señalado que la apoptosis y la autofagia se pueden interconectar e incluso ser reguladas simultáneamente por el mismo agente desencadenante en las células tumorales (11). A medida que se van desvelando los mecanismos moleculares de la apoptosis y de la autofagia y su relación, se van identificando dianas para el desarrollo de terapias anticancerosas de nueva generación. A continuación se revisarán recientes avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la apoptosis y de la autofagia y sus interacciones en relación con varias rutas importantes de señalización. Finalmente se hará referencia a fármacos anti-

tumorales cuyas dianas farmacológicas son proteínas con importante función en estas vías de señalización de muerte celular programada.

III. VIAS DE LA APOPTOSIS COMO OBJETIVOS DE LAS TERAPIAS FRENTE AL CANCER

1. Vías de la apoptosis: relación con el cáncer

En la última década se han realizado importantes avances en el conocimiento de la genética y de la biología del cáncer. En este sentido destacan los logros obtenidos en relación con los mecanismos y función de proteínas implicadas en las vías de señalización de muerte apoptótica y de los genes con destacado efecto en el fenotipo maligno. La apoptosis juega un papel crucial en el control de la muerte celular cuando el daño en el ADN es irreparable. Se ha demostrado que algunas mutaciones oncogénicas, que suprimen la apoptosis conducen a la iniciación, progresión del cáncer y/o metástasis (12,5).

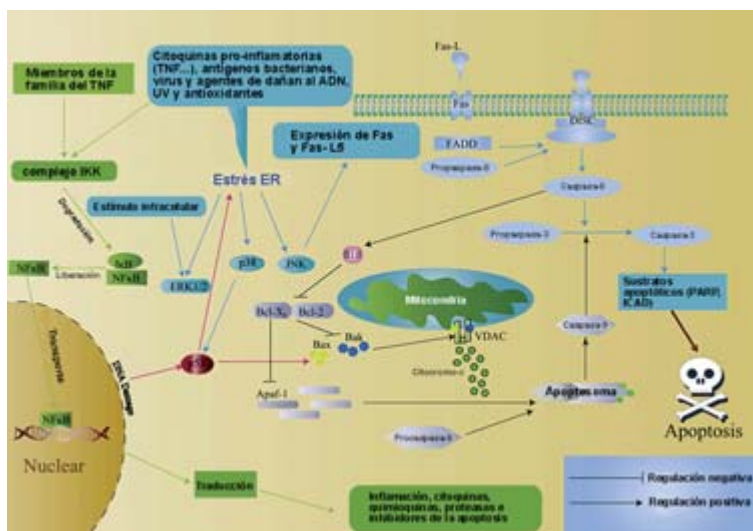


FIGURA 1. Vías de señalización relacionadas con la apoptosis (5).

Existen dos vías principales que inducen la apoptosis: *extrínseca* (también conocida como *vía del receptor de muerte*) e *intrínseca* (o *mitocondrial*) (Figura 1). La primera se activa cuando un ligando específico se une a su correspondiente receptor de muerte en la superficie celular. Entre las moléculas capaces de inducir apoptosis (ligandos de muerte) se encuentran: Factores de Necrosis Tumoral (TNF-α y TNF-β), Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado con TNF (TRAIL) y Ligando Fas (Fas L). Cada uno de ellos se une a su correspondiente receptor de muerte en la superficie celular: Receptor del TNF (TNFR), Receptor del el Ligando Inductor de la Apoptosis Relacionado con TNF (TRAILR), Receptor APO-1, también denominado Fas o CD95 (13).

Cuando se produce un estímulo de muerte, la unión del ligando de muerte a su receptor induce la trimerización de este último seguida del reclutamiento al oligómero de la proteína adaptadora FADD (proteína con dominio de muerte que se asocia a Fas) y de la unión, para su activación, de las pro-caspasas (-8 y/o -10) iniciadoras de la apoptosis. Esta estructura supramolecular se denomina Complejo de Señalización Inductor de Muerte (DISC) (Figura 2). En este complejo, las procaspasas (pre -cisteín proteasas) son convertidas mediante hidrólisis parcial, en caspasas activas, capaces de hidrolizar y con ello activar a las pro-caspasas efectoras o ejecutoras de muerte (caspasas-3, -7) que actuarán sobre sus sustratos diana, para inducir las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis: condensación citoplasmática y nuclear, hidrólisis específica de

proteínas celulares, ruptura endolítica del DNA en fragmentos oligo-nucleosómicos y condensación del contenido celular en cuerpos apoptóticos que finalmente serán fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. La activación de la caspasa -8 puede ser bloqueada por la proteína *c-FLIP* (Proteína Inhibidora de la enzima convertidora de Interleukina-1 β semejante a FADD) (11,14).

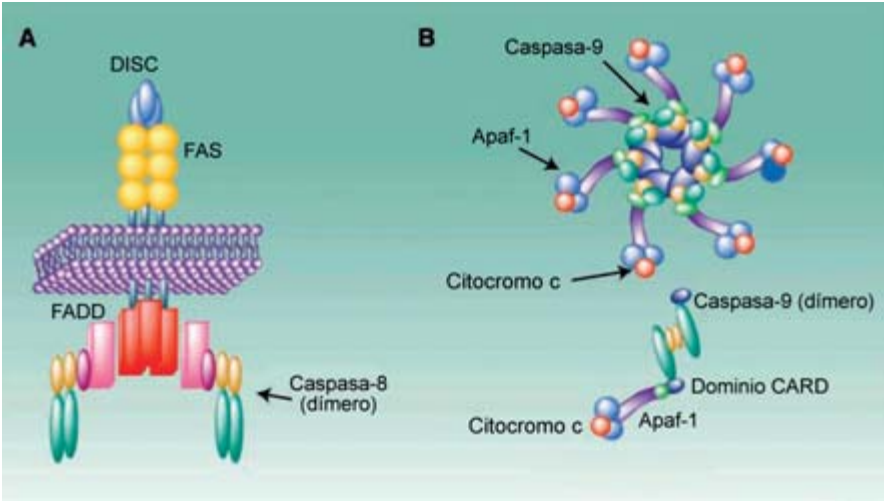


FIGURA 2. Complejos proteicos para la activación de las caspasas. A. DISC para la activación de las caspasas en la vía extrínseca. B. Apoptosoma para la activación de las caspasas en la vía intrínseca de la apoptosis (26).

La vía intrínseca o mitocondrial es otra estrategia que conduce a la apoptosis, en la que la mitocondria desempeña un papel central cuyo «punto sin retorno» es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Figura 1). El papel crítico de control de esta vía corresponde a las proteínas de la familia BCL-2 (originalmente descubiertas en linfomas foliculares) que incluye varios miembros pro-apoptóticos y otros anti-apoptóticos. Cuando las células perciben un estímulo extracelular (citotóxico, radiación UV, rayos X), o alguna señal intracelular (por ejemplo, daño del ADN, inestabilidad nuclear), la membrana externa de la mitocondria sufre cambios en su potencial de membrana y en la transición de su permeabilidad. Como consecuencia, se liberan una serie de proteínas apoptóticas desde el espacio intermembrana al citosol: citocromo c, Factor-1 activador de las proteasas apoptogénicas (Apaf-1), endonucleasa G, factor iniciador de la apoptosis (AIF) y Smac/Diablo (segundo activador mitocondrial de caspasa). En el citosol, el citocromo c se une al factor activador de las proteasas apoptogénicas que en presencia de ATP, atrae a la pro-caspasa iniciadora -9 para su activación en el complejo supramolecular denominado Apoptosoma (figura 2). La caspasa -9 (como aspartato cisteína proteasa) activa, hidroliza selectivamente a la procaspasa-3 para convertirla en caspasa -3 que se considera la «ejecutora central de la apoptosis». Esta caspasa se dirige a los sustratos apoptóticos PARP (Poli-ADP-Polimerasa), ICAD (Inhibidor de la desoxi ribonucleasa activada por caspasa) iniciándose la serie de eventos que desembocarán en la muerte celular (15).

La vía de las caspasas está regulada por las proteínas inhibidoras de la apoptosis, IAPs (XIAP; IAP-2, cIAP-1, cIAP-2, ML-IAP NIAP, survivina y apollon). Las IAPs se unen a las procaspasas e impiden su activación, así como la actividad de las caspasas maduras, promoviendo su degradación por el proteosoma. Por otra parte, el efecto inhibitor de estas proteínas y por tanto, su efecto antiapoptótico es antagonizado por moléculas también liberadas de la mitocondria que son inhibidores endógenos de las IAPs, como SMAC/DIABLO (diablo homólogo de Drosophila), Omo/Htra2 y factor-1 asociado a XAP (XAF1) (16,17). La survivina es una proteína anti-apoptótica que se expresa ampliamente durante el desarrollo fetal y en la malignización celular. Su interacción con una proteína clave en la autofagia, Beclina-1, regula la sensibilidad de algunas células cancerosas humanas a la apoptosis inducida por el receptor de muerte TRAIL (18).

Aunque las dos vías de señalización extrínseca e intrínseca parecen ser independientes, la señalización a través del receptor de muerte también puede conducir a la apoptosis por la vía mitocondrial, siendo Bid un factor que conecta ambas vías: en condiciones normales, esta proteína se encuentra inactiva en el citoplasma pero tras la estimulación del receptor de muerte, sufre una proteólisis parcial activante. Como un péptido menor, Bid truncado y activo se transloca a la membrana mitocondrial donde interacciona con las proteínas anti-apoptóticas y antagoniza su efecto (19). Teniendo en cuenta que experimentalmente se ha comprobado que la inhibición de la apoptosis favorece el desarrollo tumoral y el cáncer, las dos vías de señalización son objeto de activa investigación para lograr su más adecuada manipulación con fines pro-apoptóticos, de cara a su utilidad terapéutica.

2. Regulación de las vías de la apoptosis: Implicaciones terapéuticas

Las dos vías apoptóticas están reguladas por varias proteínas, entre ellas **p53**, **BCI-2**, **NFκβ** (Factor nuclear κβ) y **MAPKs** (Proteínas quinasa activadas por mitógenos)

p53 supresora de tumores y guardián del genoma

En células normales p53 -que funcionan esencialmente como un factor de transcripción- se mantiene en niveles bajos a través de la acción de su propio gen diana que le dirige hacia su degradación proteosómica. En respuesta a diferentes señales como daño del ADN, estrés ribosómico, hipoxia o activación de oncogenes, los efectos del gen *Hdm2* se atenúan y p53 se acumula (20). Uno de los genes primarios diana de p53 que se induce tras la activación de la misma, es el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, p21 (también conocido como Waf1, Cip1, Sdi1). Cuando la concentración de p21 incrementa se produce la inhibición de las quinasas dependientes de ciclina, las cuales fosforilan e inhiben a la proteína pRB (proteína del retinoblastoma). Como consecuencia, las células sufren una detención reversible del ciclo celular, momento en que se inician los mecanismos de reparación. Si hay éxito en la reparación del daño, el bloqueo del ciclo celular cesa y la célula puede sufrir la replicación tras la estimulación mitogénica, confirmando el axioma de que p53 es el «guardián del genoma» (21). En determinadas condiciones, dependiendo del estímulo y/o del grado de daño, no es posible la detención del ciclo celular y la reparación, en cuya situación, se producen señales en la célula que desembocan en la muerte celular programada (12,20,21). De hecho, son varias las investigaciones clínicas que indican que en situaciones como la exposición a los rayos UV, o durante la quimioterapia, puede producirse daño en el DNA y se activa la p53 lo que desemboca en la detención del ciclo celular. Si el daño no puede ser totalmente reparado, la activación continuada de p53 conduce a la apoptosis. Este es claramente, el último resorte para la célula individual, pero es enormemente beneficioso para el organismo, ya que permite erradicar una célula errante, que de otra forma, podría evolucionar y formar un tumor. De manera que p53 es un importante factor pro-apoptótico e inhibidor de la formación tumores; diversos fármacos antitumorales podrían ejercer sus funciones teniendo como dianas las vías de señalización relacionadas con p53 (22,5).

p53 está comprometida en ambos tipos de muerte apoptótica, extrínseca e intrínseca (figura 3). Es capaz de: a) transactivar a los receptores de muerte Fas/Apo-1 (receptor del ligando Fas) y al receptor de TRAIL, denominado KILLER/DR5; b) activar proteínas apoptóticas de la familia BCL2 (Bax, Noxa y Puma) que motivan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial; c) causar alteraciones celulares tales como el estrés del retículo endoplasmático con implicación del gen diana, Scotina, que en última instancia conduce a una respuesta de muerte celular intrínseca (20). Además de esos efectos transcripcionales, se ha descrito también un papel más directo de p53 en la iniciación de muerte celular regulando directamente la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Figura 1).

Debido al papel central de la muerte celular programada en la supresión de tumores, aquellos que prosperan deben encontrar vías para eludir esos mecanismos de y el camino más simple para las células tumorales es su mutación o la inactivación de los componentes de las vías de muerte celular. Se ha observado que frecuentemente, p53 se encuentra defectuosa en diferentes tipos tumores. Por otra parte, muchas formas estándar de quimioterapia necesitan para su efectividad de las vías de muerte celular; la falta de un regulador crítico

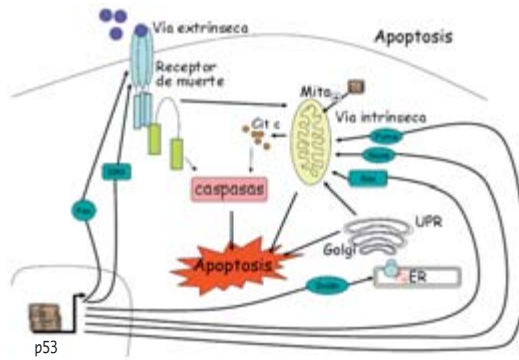


FIGURA 3. Activación de la muerte celular apoptótica por p53 (4).

puede causar la resistencia a fármacos. Por ello la identificación y conocimiento de las moléculas que regulan la muerte celular es esencial para disponer de métodos más eficaces de diagnóstico y caracterización de nuevas dianas farmacológicas para las intervenciones terapéuticas antineoplásicas (5).

Familia de proteínas BCL-2 como reguladoras de la apoptosis

La vía intrínseca de la apoptosis implica la alteración de la integridad estructural y funcional de la membrana externa mitocondrial que por otra parte, está estrictamente controlada por las proteínas pro- y anti-apoptóticas de familia BCL-2 (células B del linfoma -2). El equilibrio entre los péptidos pro- y anti-apoptóticos de esta familia tiene gran importancia para la decisión del destino de las células individuales (figura 4).

Los péptidos pro-apoptóticos que integran la familia de proteínas BCL-2 son: BAD, BAX, BAK, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA Y PUMA. Las proteínas BCL-2 anti-apoptóticas son: BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 y A1 (figura 5). Todas ellas presentan regiones de homología secuencial conservada denominadas dominios BH de homología BCL-2. Todas las proteínas anti-apoptóticas, así como las pro-apoptóticas, BAX y BAD, presentan cuatro dominios BH: BH1, BH2, BH3, BH4. El resto de los péptidos pro-apoptóticos tienen un único dominio BH -helicoidal que es el BH3, por ello se denominan proteínas BH3 (*BH3-only*). Las proteínas BCL-2 anti-apoptóticas presentan una cavidad hidrofóbica en la que se une y acomoda la región BH3, también hidrofoba, -helicoidal, de los péptidos pro-apoptóticos, anulando su capacidad anti-apoptótica. Por otro lado la actividad pro-apoptótica de estos últimos queda también bloqueada (figura 6). El tramo de unión entre los dominios BH3-y BH4 de BCL-2 y de BCL-XL es susceptible de fosforilación, modificación estructural que motiva su inactivación.

En varios tipos de cáncer, se ha observado que la elevada expresión de proteínas BCL-2 anti-apoptóticas favorece la supervivencia sin afectar a la proliferación celular, apoyando así la hipótesis de que cuando se restaura la apoptosis modulando los niveles y/o función de las proteínas anti-apoptóticas en las células cancerosas, se facilita su eliminación.

El conocimiento de aspectos estructurales y mecanismo de acción de la familia de proteínas BCL-2, proporciona la plataforma para el desarrollo de péptidos y otros compuestos químicos que ocupando la cavidad hidrofoba de los miembros anti-apoptóticos de la misma, anulen su actividad y desencadenen la muerte apoptótica. Por otra parte, esos compuestos al ocupar el sitio de unión de las proteínas BH-3 pro-apoptóticas (que abandonarían la hendidura hidrofoba de las anti-apoptóticas) facilitan su función promotora de la muerte celular (23).

BAX y BAK son dos miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas BCL-2 que constituyen la puerta de entrada a la vía mitocondrial de la apoptosis (figura 4). Su activación durante la misma tiene lugar mediante una serie de cambios conformacionales que se acompañan de su oligomerización. BAX es una proteína mono-

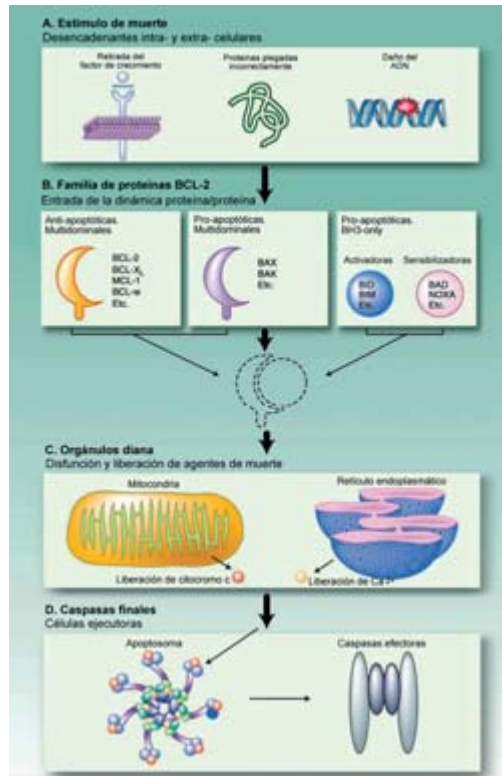


FIGURA 4. Vía intrínseca de la apoptosis: las proteínas pro-apoptóticas con un solo dominio BH (BH3 only) detectan las señales de estrés y las transmiten a las proteínas pro- y anti-apoptóticas con varios dominios BH cuya función es atacar y proteger respectivamente la integridad de la membrana externa mitocondrial. Finalmente BAX y BAK logran abrir poros en la membrana externa mitocondrial que permiten la salida de factores apoptogénicos (citocromo c) del espacio intermembrana al citosol para llevar a cabo el programa de muerte. El retículo endoplasmático libera Ca^{2+} (26).

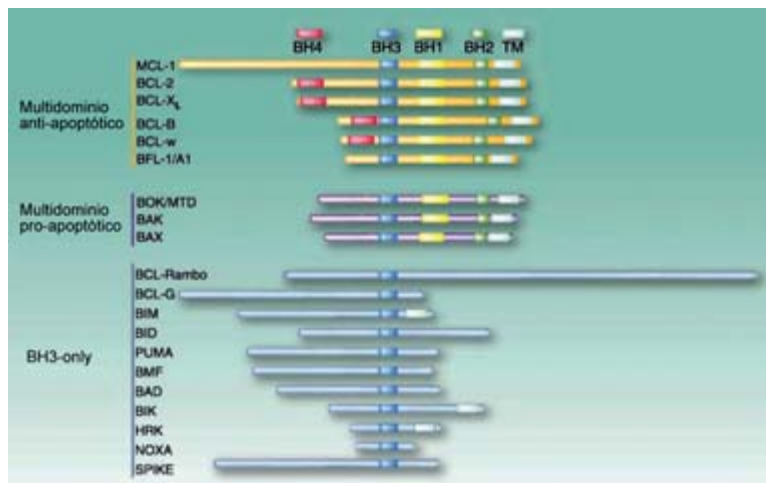


FIGURA 5. Familia de proteínas BCL-2 (pro- y anti-apoptóticas clasificadas de acuerdo con sus dominios de secuencia conservada) (26).

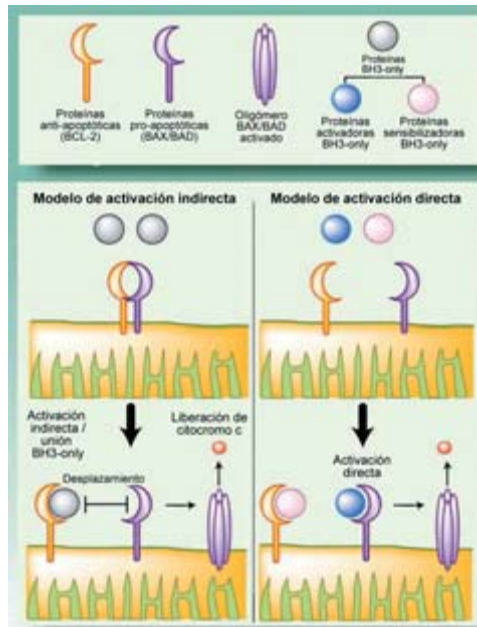


FIGURA 6. Modelos para la activación de BAX y BAD con la intervención de las proteínas (activadoras o sensibilizadoras) con un solo dominio, BH3. En el modelo de activación indirecta, la función primordial de las proteínas anti-apoptóticas es su unión a las pro-apoptóticas para anular su actividad: los péptidos BH3 anulan la capacidad anti-apoptótica de BCL-2/XL uniéndose a las mismas y desplazando a BAX y BAD que quedan libres para atacar a sus orgánulos diana. En el modelo de activación directa la función primaria de las proteínas anti-apoptóticas es secuestrar, mediante su unión a las mismas, a las proteínas pro-apoptóticas BH3 para evitar que se asocien a BAX y BAD. La asociación directa de las proteínas BH3 activadoras con las pro-apoptóticas es necesaria para la activación de estas últimas.

mérica que se localiza en el citosol o se halla como proteína periférica de la membrana externa mitocondrial (MEmit), insertándose en la misma cuando recibe un estímulo de muerte. En su estado citosólico, inactivo, BAX presenta una estructura tridimensional con su cadena peptídica plegada de forma que el extremo C-terminal (que es esencial para su inserción en la membrana externa mitocondrial) se acomoda y oculta en la hendidura hidrofóbica que forman los dominios BH del propio péptido. Cuando se induce la apoptosis, se despliega la cadena peptídica y el extremo C-terminal de la misma se ancla en la MEmit, se oligomeriza en el espacio intermembrana y abre canales ó poros de suficiente tamaño para permitir la salida de citocromo c. La proteína BAK reside en la mitocondria, como monómero inactivo y se oligomeriza en el espacio intermembrana al percibir la señal apoptótica; contribuye también, a la apertura de canales en la MEmit.

Las proteínas pro-apoptóticas «BH3-only» son centinelas previos a la acción de BAX y de BAD que responden a las señales próximas de muerte y de supervivencia, pero necesitan de BAX/BAK para inducir la muerte (figura 6). La letalidad latente en estos miembros pro-apoptóticos BH3 de la familia BCL-2, necesita para su activación modificaciones específicas y características para cada uno de ellos según tejido, naturaleza de la señal, etc.

Los péptidos anti-apoptóticos BCL-2 y BCL-XL bloquean la formación de los canales que forman BAX/BAK, e impiden la liberación del citocromo c (24). Además, Bcl-XL se puede combinar con Apaf-1 lo que aparentemente suprime la capacidad de Apaf-1 para activar la caspasa-9, bloqueando la cascada apoptótica en las células cancerosas. El equilibrio entre los péptidos pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 es de importancia crucial para decidir el destino de las células individuales (25).

El péptido BID, se encuentra en el citosol en estado inactivo pero cuando se induce la apoptosis se activa proteolíticamente por la caspasa- 8 que le convierte en un péptido menor, Bid truncado (tBID), en cuyo estado se dirige

específicamente a la mitocondria, anclándose a la membrana interna mitocondrial (Mimit) a través de la cardiolipina. En los procesos iniciales de la apoptosis la cardiolipina, glicerofosfolípido específico de la membrana interna mitocondrial y confinado en la cara matricial de la misma, se traslada a la monocapa externa de la Mimit, cara al espacio intermembrana (17). En esta nueva localización interacciona y confiere especificidad a la relocalización subcelular de *tBid* que a su vez, activará a las proteínas apoptóticas BAX y/o BAK. Además, la unión de *tBid* con el glicerofosfolípido motiva una curvatura negativa en la membrana que desestabiliza la bicapa lipídica y favorece su permeabilización. BID, a través de su hidrólisis por la caspasa-8, amplifica la señal de muerte apoptótica.

La actividad del péptido pro-apoptótico BAD se regula por fosforilación: ejerce su efecto lesivo para la mitocondria en su estado defosforilado ya que la inserción del grupo fosfato en su molécula, lo inactiva. BAD es susceptible de fosforilación por varias quinasas entre las que se encuentra Akt (serina treonina quinasa) que a su vez es regulada negativamente por la proteína fosfatasa de la familia 2A (PP2A). Además, el péptido pro-apoptótico es sustrato de PP1A (proteína fosfatasa1) que es capaz de activarlo.

La activación de NOXA y PUMA está bajo la regulación transcripcional directa de p53 (figura 3), hallazgo que es congruente con sus funciones de centinela especializado durante el daño del ADN. La localización única y el mecanismo específico de activación para cada una de estas proteínas «*BH3-only*», subraya su papel como centinelas para las diferentes señales de daño (ADN, factor de crecimiento, hipoxia etc.) (15,26).

Función reguladora de las proteínas quinasa activadas por mitógenos, MAPKs

El cáncer puede ser interpretado como una enfermedad en la que la comunicación intra- e inter-celular están alteradas. Las aberraciones son múltiples pero entre ellas las vías de señalización de las proteínas quinasa activadas por mitógenos ocupan lugar destacado. La familia de las MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) está integrada por serina-treonina quinasas, estrechamente vinculadas con el cáncer. Se han caracterizado al menos, tres sub-familias de esta familia MAPK que incluyen las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2); la proteína quinasa activada por el estrés/proteína quinasa N-terminal c-Jun (SAPK/JNKs) y p38. El papel de las ERKs es complicado, pueden inducir el crecimiento celular o inhibir la proliferación, dependiendo de la naturaleza del estímulo. Por ejemplo ERK1 y ERK2 pueden ser activadas por interleukina 3 (IL-3) y originar finalmente una señal proliferativa y de supervivencia a través de la conexión funcional con SAPK. Otros estímulos como el estrés oxidativo arrancan una respuesta diferente y la activación de ERK1/2 por este factor promueve la muerte celular (27). Por lo tanto, en diferentes tipos de cáncer y ante estímulos diferentes, las ERK podrían utilizarse selectivamente como dianas de agentes anti-neoplásicos. A diferencia de estas quinasas, JNK y p38 están más relacionadas con la división de las células T, producción de citoquinas, apoptosis y detención del ciclo celular (28). Algunas investigaciones han demostrado que p38 y JNK promueven la apoptosis mediante la fosforilación de p53 para incrementar su expresión o estimular la expresión de Fas y la de Fas-L5, lo que evidencia los efectos anti-proliferativos de JNK y p38 (5).

Factor nuclear $\kappa\beta$ (NFK β) como regulador de la apoptosis

NFK β , importante regulador de la apoptosis, es un factor nuclear de transcripción que controla la expresión de elevado número de genes implicados en la regulación de la apoptosis, replicación viral, génesis de tumores, inflamación y otras enfermedades autoinmunes. La activación de NFK β se produce como respuesta a diferentes estímulos: factores de crecimiento, citoquinas, linfocinas, radiaciones y agentes farmacológicos (figura 1). Desempeña un papel fundamental en muchas situaciones anti-apoptóticas y pro-supervivencia en las que las células de cáncer se enfrentan al estrés microambiental. En células de mamíferos, NFK β , se encuentra normalmente inhibido mediante la asociación con su inhibidor IK β . Cuando se induce por factores pro-apoptóticos (citoquinas pro-inflamatorias, antígenos bacterianos, infecciones virales, miembros de la familia TNF), se activa una quinasa, IKK (kinasa del inhibidor $\kappa\beta$) que fosforila a los inhibidores (IK β s) unidos al factor NFK β , lo que motiva la liberación del mismo y su activación (29). Un punto de vista aceptado comúnmente es que NFK β desempeña

principalmente un papel oncogénico en muchos tipos de células neoplásicas, a través de la regulación transcripcional de factores genes implicados en la proliferación celular. Se ha referido también que NFK β puede regular la expresión de varios genes relacionados con el ciclo celular, tales como ciclinas D1, D2, D3 y ciclina E así como c-myc (30). NFK β puede tener también efectos inhibitorios sobre el crecimiento indicando un comportamiento opuesto al que ejerce en las neoplasias, como es la supresión de la proliferación de queratinocitos (29,30). En resumen, se ha observado que son numerosas las proteínas y cascadas de señalización esenciales para la regulación de la apoptosis. Su función es altamente dependiente del contexto y tipo de célula o de tejido. Para una mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la apoptosis y de los efectos terapéuticos de esta vía de señalización en el cáncer, aún son necesarias rigurosas y sólidas exploraciones científicas.

3. Proteínas reguladoras de la apoptosis como objetivo de las terapias antineoplásicas

Son muchos los agentes anti-tumorales que recientemente se han dirigido hacia las proteínas involucradas en la apoptosis y cuyos efectos son variables. Algunos inducen la muerte y otros aumentan la sensibilidad de las células neoplásicas a los fármacos citotóxicos y a la radioterapia. Sin embargo, el gran obstáculo que subyace en el tratamiento del cáncer radica en que los defectos en la vía de la apoptosis constituyen una característica común y prácticamente universal en el cáncer. Las células tumorales son, en muchos casos, insensibles a los fármacos diseñados para provocar este tipo de muerte y se presentan los fenómenos de resistencia frente a los agentes antineoplásicos (16,26).

A lo largo de los últimos diez años, se han utilizado en clínica fármacos como **tríóxido de arsénico**, dirigido al gen híbrido PML-RAR α [gen híbrido procedente de la traslocación 15,17 específica de la leucemia promielocítica aguda (LPA) y el receptor del ácido retinoico]; los **activadores de las caspasas**; el **Bortezomib**, dirigido al proteasoma 20S, en el sistema de la Ubiquitina/Proteasoma y el **Imatinib mesilato (Gleevec)** (no ataca directamente a los constituyentes de la vía apoptótica, sino que modula indirectamente este proceso por su efecto inhibitorio de la actividad tirosina quinasa de BCR-ABL que se asocia con la vía de la PI3K/AKT). Otros fármacos, dirigidos a proteínas relacionadas con la apoptosis se encuentran aún en ensayos preclínicos o clínicos, entre ellos: **PS1145** que actúa como inhibidor de I κ B; el ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (**TRAIL**), dirigido a los receptores de muerte DR4 y DR5 en la vía extrínseca e **INGN201**, cuya diana es la p53 (5)

Inhibidores de BCL-2

Los compuestos capaces de ocupar la hendidura hidrófoba de las proteínas BCL-2 antiapoptóticas pueden imitar la función de las proteínas BH3-*only* y rebajar el umbral necesario para la apoptosis de las células neoplásicas (figura 6).

Se han descrito varios compuestos que reproducen la acción de los péptidos BH3, bloqueando la función antiapoptótica de BCL-2 y de BCL-XL. Entre ellos el denominado **ABT-737** que se une a BCL-2, BCL-XL, y BCL-W induciendo apoptosis en células malignas pero no en las controles (31). Este compuesto mostró eficacia prometedora en diferentes líneas de cáncer y modelos de tumores (carcinoma de pulmón, leucemia y linfomas). Se observaron, sin embargo, ciertas formas de resistencia al no ser dianas del mismo algunos miembros BCL-2 antiapoptóticos como MCL-1. Posteriormente se diseñó una pequeña molécula, **TW37**, que reproduce también las propiedades de los péptidos BH3 y tiene gran afinidad por las proteínas anti-apoptóticas incluyendo MCL-1 (32). La combinación de **TW37-CHOP** (ciclofosfamida-doxorubicina-vincristina-prednisona) ha originado resultados alentadores en el tratamiento de células B del linfoma. El denominado **Gossypol** se mostró eficaz en la leucemia leucocítica crónica, sin embargo, los ensayos clínicos en fase I/II no fueron alentadores. Más recientemente se han desarrollado **análogos** y **derivados** del gossypol como **elAT-101** que han mostrado buena tolerancia durante los ensayos clínicos (fase I/II) en cáncer de próstata, pulmón, esófago, glioblastoma y linfoproliferaciones de células B. Un **análogo** semisintético del **gossypol (Apogossypolone)** con actividad farmacológica mejorada, ha mostrado actividad tumoricida «*in vitro*» e «*in vivo*» (33). Curiosamente, los ensayos clínicos (fase I) para un inhibidor de amplio

espectro de la familia BCL-2 (*mesilato de obatolax*), demostraron también buena tolerancia y actividad en pacientes de leucemia linfocítica crónica, previamente tratados (34). Otra estrategia consiste en el uso de un **oligonucleótido antisentido** (*oblimersen sódico*), dirigido al mRNA de BCL-2 para impedir su traducción. La administración de esta molécula en diferentes combinaciones (por ejemplo con los fármacos utilizados en la quimioterapia) se mostró eficaz para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica y frente al melanoma maligno (35, 16).

Inhibidores de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP)

La expresión elevada de IAP, suele conferir resistencia a diferentes estímulos apoptóticos y constituye un marcador de pronóstico desfavorable en cánceres sólidos y hematológicos. La supresión de la actividad de las IAPs, desencadena directamente la apoptosis en algunos casos y en otros, sensibiliza a las células cancerosas a los estímulos pro-apoptóticos que se utilizan en los tratamientos frente a esta enfermedad. Por lo tanto, para tratar las neoplasias se han desarrollado estrategias con las que se intenta reproducir o imitar la acción de los inhibidores endógenos de la IAPs como SMAC. En estos tratamientos se pretende bloquear la interacción de las XIAPs con las caspasas o bien modular los niveles de las mismas.

La interacción de la proteína endógena SMAC con IAPs se produce a través del tetrapéptido N-terminal AVPI (Ala1-Val2-Pro3-Ile4) del inhibidor de las mismas. Sobre la base de esta información estructural, se han diseñado pequeñas moléculas para reproducir las características y efectos del tetrapéptido N terminal (AVPI) de SMAC (y por lo tanto dotadas de su función inhibitoria) con el fin de obtener compuestos estables de posible aplicación terapéutica. En este grupo se incluyen cuatro compuestos semejantes a SMAC (*GDC-0152*, *LCL161*, *AEG40826/HGS1029* y *AT-406*) que han recibido aprobación para ensayos clínicos (36).

Ligando inductor de apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral (TRAIL)

TRAIL es un factor de la vía extrínseca de muerte que transduce la señal apoptótica mediante la activación de la cascada de las caspasas (figura 7). Es una proteína transmembrana tipo II que en forma de homotrímero se une con similar afinidad a sus cuatro receptores de muerte (DR), específicos para el ligando y ubicados en la membrana celular (figura 7a). De los cuatro receptores DR, dos: DR4/TRAIL y DR5/TRAIL, presentan un dominio de muerte intracelular que se activa con la unión del ligando TRAIL y recluta a las proteínas adaptadoras FADD (dominio de muerte asociado a Fas) así como a las procaspasas iniciadoras -8/-10 que se convierten en caspasas activas en el DISC (figura 7b). En algunas células, TRAIL también operará mediante la activación de la vía intrínseca, cuya conexión con la anterior se establece a través de BID. Los otros dos receptores TRAIL, receptores señuelo (DcR1/TRAIL y DcR2/TRAIL), carecen o tienen truncado el dominio de muerte, por lo que la unión ligando no es capaz de inducir la apoptosis.

La administración exógena de TRAIL desarrolla una potente acción lesiva en las células cancerosas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, sus efectos sobre las células normales son insignificantes lo que supone una característica importante de esta cascada en cuanto a su potencial terapéutico (37). Aunque los estudios iniciales, realizados *in vitro*, indicaron cierto grado de toxicidad de este ligando para los hepatocitos normales, células de próstata y células de cerebro, análisis posteriores concluyeron que el efecto tóxico observado en esas condiciones era consecuencia de la utilización de una molécula modificada de TRAIL: TRAIL marcado con histidina o con leucina. La citoquina recombinante no marcada, carecía de toxicidad para las células normales (38). Por otra parte, investigaciones recientes han demostrado que aunque las preparaciones con derivados marcados (histidina- o leucina-TRAIL), tienen efectos tóxicos para los hepatocitos primarios humanos, carecen de toxicidad o ésta es mínima en explantes hepáticos de donantes sanos. Ello indica que el uso de hepatocitos humanos primarios como modelo para el análisis de toxicidad podría no ser el más adecuado (39). El mismo estudio muestra que los explantes obtenidos de pacientes que sufren de enfermedades hepáticas (hepatitis C, infecciones virales o esteatosis hepática) son sensibles a la acción tóxica de la citocina, lo que sugiere que el uso clínico de TRAIL debe ser considerado con cautela en pacientes que presentan enfermedad hepática inflamatoria.

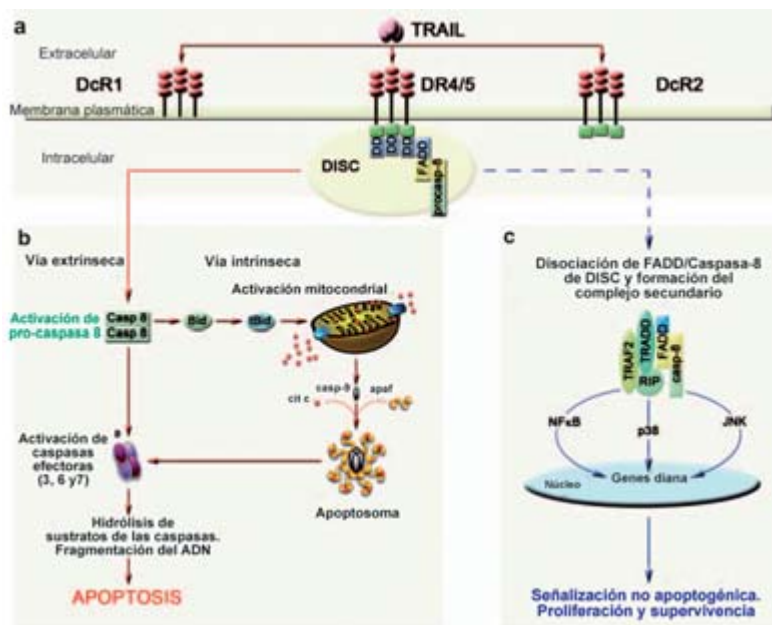


FIGURA 7. Vía de señalización a través de TRAIL.

A pesar del limitado conocimiento de la base molecular de la acción selectiva de TRAIL para las células de cáncer, se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos con el fin de definir su potencial terapéutico, ya sea administrado individualmente o en combinación con otros agentes (16). Las principales estrategias farmacológicas desarrolladas hasta la fecha, incluyen la administración de TRAIL recombinante humano (*Apo2L/AMG951*), el uso de anticuerpos humanizados dirigidos a los receptores de muerte DR4 (*mapatumumab/HGS-ETR1*) o DR-5 (*lexatumumab/HGS-ETR2/AMG655*) y la liberación adenoviral de la secuencia codificante de TRAIL en las células tumorales (*Ad5-Trail*) (40). Los informes iniciales emanados de los ensayos clínicos (fase I y II) indicaron (contrariamente a lo que se esperaba sobre la base de los datos *in vitro*) que la toxicidad hepática o renal no eran clínicamente significativas y cuando se presentaban, eran leves y aparecían generalmente en pacientes con problemas hepáticos. Los efectos adversos más frecuentes eran náuseas, estreñimiento, fatiga, y leucopenia (en el 10-20% de los pacientes) y no dieron lugar a la interrupción del tratamiento. Además, no se ha observado respuesta inmunitaria frente al *mapatumumab* o *lexatumumab*. Las respuestas clínicas obtenidas con la administración de formas no marcadas de TRAIL recombinante humano o anticuerpos dirigidos a receptores de muerte como monoterapia, son variables y abarcan desde respuestas parciales y estabilización de la enfermedad a respuestas completas (41-43). Los ensayos clínicos han indicado también que diferentes tumores humanos pueden ser resistentes a la monoterapia con TRAIL. Por otra parte, se han referido efectos proliferativos *in vitro* en respuesta a la administración del mismo cuando se utilizaron gliomas y líneas celulares de cáncer de pulmón (44). Finalmente, en dos estudios con blastos procedentes de pacientes con leucemia se ha obtenido resultados que van desde la activación de la muerte a la inducción de la proliferación celular, tras la exposición a TRAIL (45). Efectos proliferativos inducidos por el ligando, se han observado también en sinoviocitos humanos de pacientes reumáticos que por otra parte presentan una respuesta bifásica a la citoquina que desencadena la muerte en una fase inicial, pero favorece la proliferación en una fracción de células resistentes. Estos resultados sugieren que algunas células neoplásicas o durante las enfermedades inflamatorias, la respuesta apoptótica a TRAIL puede cambiar a respuesta proliferativa. Aunque hay pruebas de que el factor nuclear κB , p38, JNK y la vía de las quinasas reguladas por señales extracelulares modulan la respuesta proliferativa (figura 7c), es importante definir con precisión qué factores y complejos modulan las dos respuestas diferentes a un mismo agente inductor (44).

A pesar de que se ha observado que un elevado número de moléculas y mecanismos participan en la apoptosis inducida por TRAIL y/o en los procesos de resistencia de las células cancerosas, no ha sido posible determinar un factor común regulador de la sensibilidad al ligando en diferentes tipos de tumores. Por lo tanto, estos datos sugieren que es posible que no exista un «regulador maestro» que active el cambio del interruptor: resistencia a TRAIL en las células normales a sensibilidad al mismo en las tumorales, sino que es más bien el equilibrio entre las diferentes moléculas y/o vías de señalización el factor determinante del final del crecimiento o de la actividad estimulante de la apoptosis propia de la citoquina (46, 16)

En conjunto, los resultados de la investigación básica y los ensayos clínicos no sólo apoyan la inducción selectiva de la apoptosis en los tumores, a través de la activación de la vía de TRAIL, sino que también señalan la necesidad de estudios amplios y cuidadosamente monitorizados para lograr descifrar las redes reguladoras que controlan las actividades de proliferación y apoptóticas de la vía de señalización inducida por el ligando TRAIL. Es urgente, por tanto, la identificación de biomarcadores y la realización de ensayos de sensibilidad que permitan reconocer a los pacientes que se pueden beneficiar de las posibilidades terapéuticas de esta vía sin sufrir sus potenciales efectos no deseados (proliferativos). Es importante destacar que la resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL en células cancerosas, no representa un obstáculo para el uso de esta vía de señalización como diana terapéutica. De hecho, está bien establecido que la resistencia puede ser revertida por el fenómeno generalmente conocido como «sensibilización». El fenotipo resistente a TRAIL puede ser superado por varios agentes: radiaciones ionizantes, medicamentos utilizados en la quimioterapia, citoquinas, así como HDAC (histona deacetilasa) inhibidores del proteosoma, etc. Por otra parte, la administración de inhibidores de la vía del factor nuclear- que se ha caracterizado como reguladora de la resistencia a la apoptosis dependiente de TRAIL, motiva la sensibilización de las células neoplásicas al ligando. (47, 16).

Los primeros ensayos clínicos en los que se utilizaron conjuntamente mapatumumab, cisplatino y gemcitabina demostraron que esta combinación puede administrarse de forma segura. Los resultados que recogen la respuesta de estos ensayos (fase I) fueron alentadores, ya que en 26 de cada 37 pacientes disminuyeron las lesiones tumorales y otros 12 mostraron una respuesta parcial. El uso terapéutico de las proteínas recombinantes y los anticuerpos humanizados está bien establecido; sin embargo, las desventajas inherentes a las proteínas (síntesis, pureza, estabilidad, costos de producción) constituyen un sólido fundamento que subraya la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos de acción similar a la de los activadores del TRAIL. A este respecto, la reciente demostración de que péptidos sintéticos específicos y selectivos para DR5 activan la vía del ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF en tumores, ofrece un campo prometedor de investigación. Esos nuevos fármacos que intentan reproducir la actividad TRAIL/DR5, desarrollaban actividad anticancerosa *in vivo* como agentes individuales en modelos de tumores humanos y ofrecen expectativas prometedoras para la utilización de la vía del TRAIL como diana en los tratamientos frente al cáncer (48).

Lo anteriormente expuesto identifica a la cascada del ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF como una de las vías más interesantes y prometedoras para el desarrollo de terapias no genotóxicas y selectivas frente al cáncer. TRAIL: a) forma parte de un sistema endógeno de defensa antitumoral evolutivo; b) induce apoptosis selectivamente en los tumores; c) los problemas de resistencia pueden ser superados por diferentes métodos de «sensibilización»; d) muestra actividad en modelos preclínicos (xenoinjertos de tumores humanos); e) son alentadores los resultados obtenidos en los ensayos clínicos; f) puede ser utilizado, en diferentes formas farmacológicas. Hasta la fecha se han recogido datos de 6 ensayos clínicos completos, mientras que otros 25 (dirigidos a la vía TRAIL sólo o en diferentes aproximaciones combinatorias), están actualmente en curso. Cabe mencionar que en los ensayos iniciales se inscribieron principalmente pacientes con cáncer refractario avanzado y recurrente, por lo tanto, la eficacia tumoricida de los inductores de la vía de TRAIL en etapas menos avanzadas de malignidad aún se desconoce. Además, se ha demostrado recientemente que TRAIL en combinación con *acetato de »trans» retinol* puede atacar eficientemente a las células pre-malignas del tumor (49). Un campo que merece especial atención es averiguar si las terapias basadas en la cascada del TRAIL pueden ser utilizadas, como terapia preventiva, para el tratamiento de lesiones pre-neoplásicas, tras la intervención quirúrgica.

IV. VIAS DE LA AUTOFAGIA COMO OBJETIVOS DE LAS TERAPIAS FRENTE AL CANCER

1. Vías de la autofagia: relación con el cáncer

Al igual que la apoptosis, la autofagia es un proceso conservado en la evolución y determinado genéticamente que vierte constituyentes citoplasmáticos al lisosoma para su degradación. Representa el mecanismo principal mediante el cual las células pueden degradar proteínas disfuncionales, ADN y orgánulos dañados (figura 8). El proceso comienza con la formación de una estructura membranosa denominada fagóforo o membrana de aislamiento que crece gradualmente para formar una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma (50). Una vez formada esa estructura, la proteína citoplasmática, LC3B (proteína de cadena ligera 3B asociada a los microtúbulos), sufre una proteólisis parcial en la que pierde parte de su estructura peptídica, adquiere una capa lipídica y se convierte en una proteína integral de la membrana del autofagosoma. El reclutamiento de la proteína LC3B a la membrana del autofagosoma es, por tanto, un índice de la formación ó de la acumulación de esas vesículas. La carga o contenido para su degradación puede ser encapsulada en el momento de la formación o puede ser liberada a los autofagosomas una vez formados. Esta incorporación se realiza con la intervención de proteínas adaptadoras que contienen motivos que interaccionan con LC3B en la membrana de los autofagosomas (51). El autofagosoma puede sufrir la fusión con inclusiones citoplasmáticas como los cuerpos multi-vesiculares o los endosomas pero, en última instancia, la fusión tiene lugar con un lisosoma para formar un autolisosoma (figura 8). Los componentes del autofagosoma se degradan parcialmente mediante las hidrolasas ácidas que proporciona el lisosoma. Los productos de la hidrólisis de las moléculas y estructuras degradadas pueden reciclarse mediante su utilización por las vías biosintéticas ó, ser catabolizados para generar ATP (4).

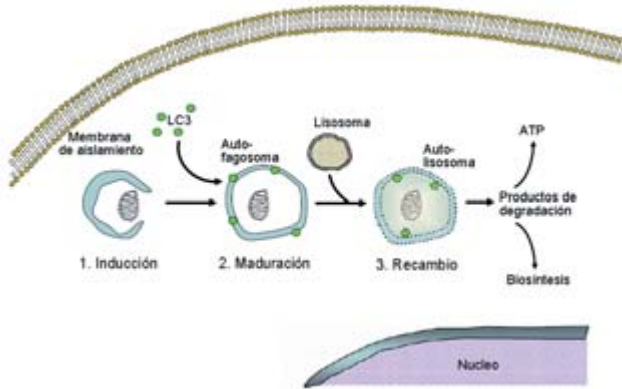


FIGURA 8. Vías de la autofagia en células de mamíferos (4).

La autofagia funciona a nivel basal, prácticamente, en todas las células, pero la carga de la misma se modifica dependiendo de las condiciones, para responder a las demandas celulares. Así en la levadura, donde la autofagia se definió genéticamente por primera vez, se activa este proceso para producir ATP a partir de fuentes endógenas con el fin de prevenir la necrosis durante un periodo limitado, hasta que las condiciones de reposición de nutrientes se recuperan. Este mecanismo de supervivencia celular es también importante para la existencia humana: si se extrapolan los resultados de investigaciones realizadas en ratones deficientes en un gen esencial de la autofagia, se concluye que el proceso puede servir de puente durante la interrupción que ocurre al cambiar de la alimentación umbilical al amamantamiento tras el nacimiento (52).

Cuando existen suficientes nutrientes exógenos, la autofagia, en la mayoría de los casos, es un mecanismo homeostático que junto con el proteasoma sirve para mantener la integridad y fidelidad del proteoma y de los orgánulos celulares; si las proteínas y orgánulos dañados no se eliminan, se crearía una situación que, en muchos

la inhibición esta cascada y la inducción de la autofagia (58,59). La 3-fosfatasa que desfosforila al PIP3 (PETEN), también puede terminar la señalización de PI3K clase I (5).

A pesar de que la PI3K clase III pertenece a la misma familia de enzimas que la citada anteriormente (PI3K-clase I), PI3K-III (figura 9) regula positivamente la autofagia. Esta quinasa, cataliza específicamente la fosforilación del fosfatidil inositol en su posición 3 y desempeña, en organismos superiores, una función similar a la lípido quinasa VPS34 de levadura, regulando la salida eficiente de proteínas a las vacuolas (60). En células superiores PI3K- III (VPS34), se une a beclina-1 y a VPS15 formando un complejo que provoca la autofagia. En este marco regulador, beclina- 1 ocupa un lugar central, debido a su función necesaria para la formación de vacuolas autofágicas; su eliminación puede interrumpir el proceso de autofagia. Son numerosos los factores intracelulares que pueden tener un impacto en este marco regulador debido a sus interacciones con beclina-1 (5).

El gen asociado a la resistencia por radiación UV, **UVRAG**, muestra actividad supresora de tumores que desarrolla mediante mecanismos dependientes o independientes de la autofagia. UVRAG se une a beclina-1, facilita la formación de complejos PI3K-III/VPS34/VPS15 y con ello, la inducción de la autofagia; promueve así mismo, la formación de autofagosomas (mediante la activación del complejo de beclina-1) y su maduración (atrayendo la maquinaria de fusión al endosoma final) en células superiores (18).

Bif-1 (Factor-1 de interacción B1/BAX), miembro de la familia de las endofilinas, también conocido como SH3GLB1 o **Endofilina B1**, es otro regulador de beclina 1. Como factor de interacción de Bax, la endofilina Bif-1 interacciona con Beclin-1 a través de UVRAG y funciona como modulador positivo de PI3K-III e induce la autofagia en células superiores. Los inhibidores de PI3K-clase III como 3-MA pueden limitar este marco regulador e inhibir la autofagia. A diferencia de la capacidad inductora de este proceso propio de los complejos Beclina-1/VPS34/VPS15, la unión de beclina-1 a los péptidos antiapoptóticos BCL-2 ó BCL-XL, anula la capacidad autofágica de la misma. La fosforilación de BCL-2 y de beclina-1, así como la ubiquitinación de esta última, interrumpe su mutua interacción (18).

Ras (pequeña GTPasa que intervienen en la transducción de señales) juega un doble papel como ocurre con la autofagia en el cáncer. Ras inhibe la autofagia mediante la activación de PI3K-I y al mismo tiempo, puede inducir la autofagia a través de la vía RAF1/MEK1/2/ERK1/2 (figura 9). Aunque los mecanismos precisos son aún poco conocidos, se han observado frecuentemente mutaciones y activación de Ras en diferentes tipos de cáncer, especialmente en los de páncreas, colon, pulmón, así como en tumores del tiroides (61). Además de los reguladores mencionados, p53 y la familia de proteínas Bcl-2, cuya participación esencial en la apoptosis se ha descrito previamente, afectan también a las vías relacionadas con la autofagia (62).

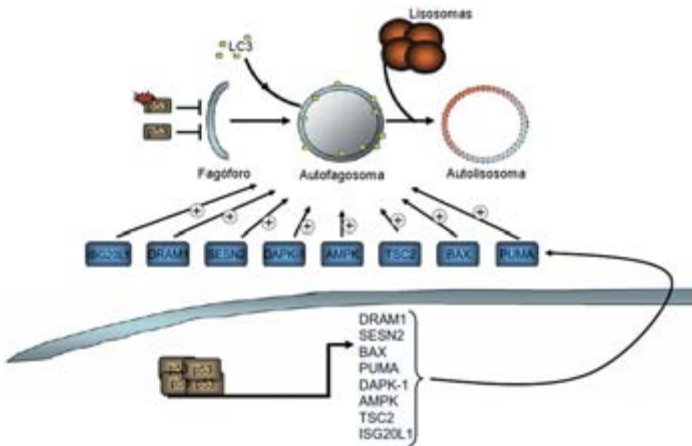


FIGURA 10. Implicación de p53 en la regulación de la autofagia (4).

p53 modula la autofagia celular (figura 10) a través de la regulación de una serie de genes diana que regulan positivamente este proceso. Ryan y cols, identificaron una proteína (FLJ11259), cuyo gen codificante se activaba transcripcionalmente por p53, así como por agentes que lesionan el ADN de forma dependiente de p53 (63). Los estudios para la localización subcelular de la proteína (FLJ11259), demostraron su ubicación principal en los lisosomas y concretamente es en los autofagosomas donde el gen codificante se expresa masivamente. Ryan y cols. (4), demuestran que el gen FLJ11259 es diana directa de p53; por otra parte p53 regula positivamente la autofagia, efecto que es dependiente de FLJ11259, por ello, esta proteína se renombró como **DRAM**, Modulador de la Autofagia Regulada por Daño (o agresión al ADN (63)). DRAM pertenece a una familia de proteínas de la que se han caracterizado cinco miembros, en seres humanos, DRAM 1/2/3/4/5/. A su vez, DRAM 5 incluye dos variantes: DRAM 5a y DRAM5b (64). Los organismos más sencillos como *Drosophila* tienen una sola proteína con esta función. DRAM se ha mostrado esencial para la apoptosis mediada por p53; por otra parte, su expresión en tumores primarios, se encuentra frecuentemente disminuida (3). Entre las proteínas reguladas por p53, se encuentran algunas con función bien conocida en las vías de detección de nutrientes que conducen a la modulación de mTOR (TSC2, AMPK y SESN2) Otros genes diana de p53 de los que se ha referido su participación en la regulación de la autofagia, también se ha demostrado su implicación en la apoptosis (DRAM1, ISG20L1, DAPK-1, BAX y PUMA). Se ha descrito, así mismo que los niveles basales de p53, regulan negativamente la autofagia en el citoplasma, en ausencia de la activación de los genes diana de p53. Esta función se ha atribuido también, para los mutantes de p53 derivados de tumores.

3. La doble función de la autofagia en el cáncer

Como mecanismo crucial en la respuesta al estrés extra o intracelular, la autofagia contribuye a la supervivencia en determinadas circunstancias. Por otra parte, la continuada activación de esta vía, puede conducir a la muerte celular en condiciones adversas, tales como la escasez persistente de nutrientes o la exposición continuada a la radiación.

Como fenómeno universal, la autofagia facilita la supervivencia de las células normales cuando escasean o faltan los nutrientes. Del mismo modo, se puede inferir que la autofagia puede también amortiguar el estrés metabólico y mejorar la supervivencia de las células cancerosas que crecen rápidamente, aunque la vascularización sea escasa. En consecuencia, la autofagia puede ser una estrategia eficaz a disposición de las células tumorales para la superación de la escasez de energía y de nutrientes. De forma similar puede protegerlas frente a los tratamientos químicos y radiación ionizante, a través de la conversión de los orgánulos dañados en complementos útiles para el metabolismo, evitando la apoptosis de las células transformadas y facilitando su supervivencia (65). Se ha observado frecuentemente, que la autofagia se encuentra estimulada en los tumores, lo que avala sus funciones favoreciendo la supervivencia de las células neoplásicas. En regiones de la masa tumoral sometidas a estrés metabólico, la maquinaria de la autofagia se muestra activada (53,66); por otra parte, los lisosomas que desempeñan función esencial en la degradación de la carga de la autofagia, intensifican su actividad durante la formación de tumores lo que también sugiere un aumento de la actividad autofágica. Cuando se incuban células cancerosas humanas con agentes antineoplásicos (*inhibidores de la histona deacetilasa, trióxido de arsénico, TNF- α , imatinib, rapamicina*), se activan las cascadas de la autofagia (67). Esta activación puede conferir una ventaja de crecimiento a estas células mediante el aporte de nutrientes necesarios para el crecimiento.

Por otra parte, existen abundantes investigaciones que han demostrado que la anulación o la inactivación de genes relacionados con la autofagia (*Beclina-1, atg5*) favorece la formación de tumores en diferentes modelos de mamíferos, mientras que la elevada expresión de esos genes limitaba la aparición de varios tipos de cáncer en humanos (mama, ovario y próstata) (65, 68). Aunque no se conoce con exactitud cómo la inhibición de la autofagia favorece el desarrollo del cáncer, han surgido diferentes hipótesis: En primer lugar, la autofagia puede afectar a la mutación celular en etapas tempranas de la formación del tumor, debido a su papel importante protegiendo a las células del estrés genotóxico, así como manteniendo la estabilidad cromosómica y la integridad del genoma. Experimentalmente se ha comprobado que células con deficiente autofagia mostraban notable incremento en la escisión del ADN de doble cadena y amplificación de genes en respuesta al estrés metabólico

en comparación con sus homólogas con normal funcionamiento del proceso (69). En segundo lugar, la autofagia puede afectar a la proliferación de las células neoplásicas debido a su función reguladora del ciclo celular. En un estudio reciente se ha descubierto que la autofagia es necesaria para el establecimiento de la senescencia inducida por oncogenes (OIS), que es un estado de detención irreversible del ciclo celular que limita la proliferación de las células dañadas (70). En tercer lugar, existen resultados experimentales que sugieren que la capacidad de autofagia aumenta durante las etapas pre-malignas de la carcinogénesis pancreática, disminuyendo durante la transición del adenoma a adenocarcinoma. Se ha referido que la interrupción de la autofagia contribuye a la transición al cáncer, aunque no se ha establecido la relación de causalidad directa. Investigaciones recientes han demostrado que la autofagia puede originar la muerte de las células tumorales deficientes en apoptosis, tras sufrir la privación de nutriente o por exposición a las radiaciones o a la quimioterapia. Está bien demostrado que la apoptosis, a menudo, está bloqueada en las células cancerosas y por lo tanto la autofagia puede actuar alternativamente como una vía dominante de muerte celular.

En resumen, la autofagia desempeña una función doble: pro-supervivencia y pro-muerte. Ambos efectos son prometedores en relación con el tratamiento del cáncer. Aunque el equilibrio relativo entre las funciones pro- y anti-tumorales de este proceso es confuso, el ataque dirigido a las vías de señalización de la autofagia, ofrecerá útiles aproximaciones para la terapia anticancerosa.

4. La autofagia como objetivo de las terapias antineoplásicas

Algunas células tumorales son capaces de evadir completamente la apoptosis, por ello muchos fármacos antitumorales cuyo fin primordial es fomentar la actividad de las vías apoptóticas no son efectivos. En esos casos, la autofagia surge como otro modo de muerte celular alternativo que recientemente ha recibido atención por parte de los investigadores en este campo. Las investigaciones sobre los mecanismos moleculares de la autofagia, han proporcionado el fundamento para nuevas aproximaciones terapéuticas antitumorales (formas no apoptóticas de muerte celular programada) de aplicación en tipos de cáncer en los que las vías apoptóticas son defectuosas.

La función de la autofagia en el desarrollo tumoral es compleja (71). Muchos tumores presenta regiones muy poco vascularizadas en las que falta tanto el oxígeno como los nutrientes y en las que hay elevado número de autofagosomas (4). En ese marco, la autofagia se muestra como un mecanismo citoprotector para las células del tumor y puede considerarse por tanto que es oncogénica. Sin embargo, existe también evidencia experimental de que genes clave de la autofagia se encuentran inactivados en las principales formas esporádicas de cáncer humano y se ha demostrado que modelos de ratón, deficientes en genes de la autofagia, son propensos a desarrollar tumores, lo que indica que la autofagia, al menos en algún momento durante el desarrollo del tumor, contribuye a la supresión del mismo (72).

A la vista de esa información, surge una cuestión importante en relación con la autofagia y la terapia del cáncer: ¿Debe frenarse el proceso? y en caso afirmativo, ¿cuándo y cómo debe detenerse?. En la actualidad, no hay una respuesta sencilla y clara a esta pregunta que se complica más al considerar que la autofagia ejerce un papel protector frente a otras enfermedades además del cáncer. Es un proceso críticamente importante para la eliminación de las proteínas propensas a formar agregados que conducen a formas de enfermedades neurodegenerativas, así como a las mutaciones en un gen central de la autofagia que está causalmente vinculado con la formación de la enfermedad de Crohn. Se conoce, así mismo, que la autofagia está involucrada en la respuesta inmune a las infecciones víricas y bacterianas (73, 74).

En el planteamiento, en relación con la autofagia y la terapia antineoplásica, hay que considerar, no solamente si es conveniente inhibir o promover el proceso, sino también, si ello puede realizarse específicamente en el tumor sin afectar a las formas beneficiosas de la autofagia en los tejidos normales. Estudios iniciales indican que las formas de autofagia asociadas a enfermedades humanas podrían ser moduladas específicamente para el tratamiento de las mismas (4).

Actualmente, se están utilizando agentes que inducen autofagia para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. A este grupo pertenece el antibiótico *rapamicina* y sus análogos perfeccionados *RAD001*, *ICC-779*, y *AP23573*, principales inhibidores de mTOR, que han mostrado destacada actividad antitumoral en varios modelos de cáncer (75). Se ha comprobado recientemente, que el *Imatinib* induce autofagia en células de sarcoma de Kaposi que presentan multiresistencia a fármacos. También se ha encontrado este fármaco eficaz para el tratamiento de glioblastomas.

En la medicina tradicional China existen agentes para el tratamiento del cáncer dirigidos a la regulación de la apoptosis y/o autofagia. Las *lectinas del muérdago* se han utilizado como terapia antitumoral alternativa durante años. Se ha referido que la *lectina* de *Phaseolus coccineus* induce apoptosis y autofagia, principalmente a través del bloqueo de las vías de señalización Ras-Raf, PI3K-Akt y ROS-p38-p53 (76). También, la *oridonina* (diterpeno activo, aislado de una hierba tradicional utilizada en la medicina china, *Rabdoisa rubescens*) ejerce importantes efectos antitumorales a través de a) detención de la proliferación (actuando sobre el complejo CDKs-ciclina); b) inducción de la muerte celular por apoptosis (aumentando la de expresión de Fas/Fas-L); d) bloqueando la capacidad de unión de NFK β al ADN e induciendo la autofagia (77).

V. LAS INTERCONEXIONES ENTRE LA APOPTOSIS Y LA AUTOFAGIA EN EL CÁNCER

Como estrategias críticas que controlan el destino celular, la apoptosis y la autofagia son cruciales en la fisiología normal y en estados patológicos. En determinadas circunstancias se ha detectado entre ambas vías, relación positiva en algunas ocasiones y negativa en otras, lo que indica la presencia de un interruptor molecular entre estos procesos. A pesar de las notables diferencias entre los dos tipos de muerte celular programada, recientes estudios han puesto de manifiesto que moléculas bien caracterizadas como reguladores, pueden actuar sincrónicamente en el control de ambos procesos (78).

El gen supresor de tumores mejor conocido en mamíferos, *p53*, actúa como un importante regulador común de la apoptosis y de la autofagia; regula positivamente la apoptosis, cuando el daño celular es irremediable (figura 11). Sin embargo ejerce doble función en la autofagia dependiendo de su localización subcelular, en el núcleo, *p53* estimula la autofagia, pero inhibe el proceso en el citoplasma (79). Frente a la inestabilidad genómica o durante la activación oncogénica, incrementa el efecto pro-autofágico de *p53*, mientras que cuando disminuye la expresión de *p53*, a causa de mutaciones que originan un gen *p53* defectuoso, se inhibe la autofagia aún en condiciones de estrés o de ayuno. En presencia de estrés genotóxico y alteraciones genéticas, la activación de la autofagia por *p53* promueve la muerte celular a través de PCD tipo II y conduce al bloqueo de la malignización de la célula; mientras que en células con *p53* defectuoso, bajo condiciones ambientales de estrés, la inhibición de la autofagia puede bloquear el suministro de material para la auto-digestión. Por lo tanto, tanto los efectos duales de *p53* convergen en un resultado común que es la eliminación de las células: al parecer, un potente gen supresor de tumores, como es *p53*, no escatima esfuerzos para evitar la formación de los mismos.

Otra importante vía celular que brinda posibles mecanismos moleculares para las interconexiones entre la apoptosis y la autofagia es la cascada bioquímica PI3K/Akt/mTOR (figura 11). Como se mencionó anteriormente, puede regular negativamente la autofagia cuando existen suficientes factores de crecimiento. Por otra parte, la activación constitutiva de esta cascada se ha visto implicada en muchos tipos de cánceres humanos (páncreas, ovario y cáncer de estómago) (57). Se ha comprobado que Akt inhibe la apoptosis mediante la fosforilación del péptido pro-apoptótico Bad, favoreciendo la supervivencia celular. Además, la activación de la vía de PI3K/Akt/mTOR puede causar ambos efectos inhibitorios: de Akt sobre la apoptosis y de mTOR sobre la autofagia y estimular por tanto, la capacidad de supervivencia de las células neoplásicas.

Las proteínas de la familia Bcl-2 no sólo participan en la regulación de la apoptosis: son también importantes inductores o inhibidores (según las condiciones) de la autofagia (80). Junto con Beclina-1, estas proteínas establecen otro punto importante de interconexión entre la apoptosis y la autofagia (81). En condiciones normales,

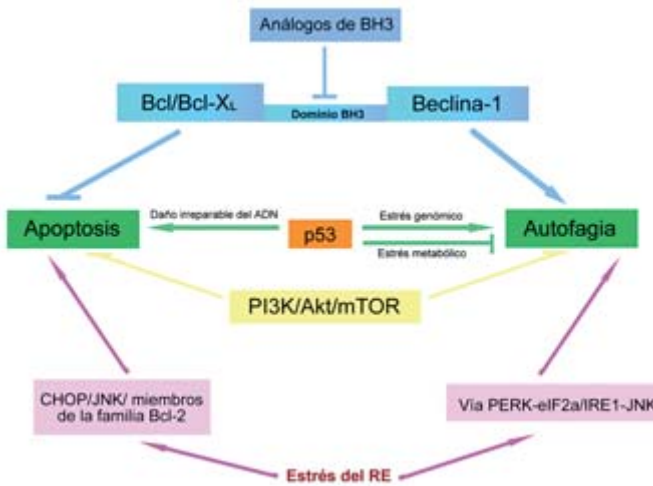


FIGURA 11. Conexiones entre la autofagia y la apoptosis.

Beclina-1 se encuentra inhibida debido a su unión a las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 o Bcl-XL (figura 11). Este complejo se forma por la unión del dominio BH3 de Beclina-1 al surco hidrófobo de Bcl-2/Bcl-XL. Bajo estímulos específicos, las proteínas apoptóticas con un solo dominio BH3 (BH3-only) pueden ocupar el surco de unión de Bcl-2/Bcl-XL y antagonizar competitivamente, la unión de Beclina-1. En resumen, las proteínas «BH3-only» pueden inducir autofagia y apoptosis actuando, al menos, en dos compartimientos subcelulares diferentes (82). A nivel de membrana mitocondrial, las proteínas con un solo dominio BH3 (o análogos) desencadenan la apoptosis (directamente o indirectamente) facilitando la actividad de las proteínas pro-apoptóticas, multidominales, (BAX y BAK), permeabilizando la membrana externa mitocondrial. A nivel del retículo endoplasmático (ER), las proteínas BH3-only (o sus análogos) promueven la formación de autofagosomas mediante la liberación de Beclina-1 a partir de los complejos que forman con sus inhibidores (Bcl-2/Bcl-XL) (83).

Se ha demostrado también que el estrés del retículo endoplasmático actúa como un mediador importante para vincular los dos tipos de muerte celular programada (84). Recientes investigaciones han puesto de manifiesto una relación más directa entre la apoptosis y la autofagia a través de la hidrólisis, dependiente de caspasa, de Beclina-1 (figura 12). Las caspasas (cisteinil aspartil proteasas) catalizan la hidrólisis de Beclina-1, en la apoptosis, con lo que anulan su actividad pro-autofágica. En esta hidrólisis con intervención de las caspasas -3,-7 y -8 se producen dos fragmentos, N- y C-terminal. El fragmento C-terminal, se transloca a la mitocondria y sensibiliza a las células a las señales apoptóticas. Este proceso representa un circuito amplificador para inducir masivamente la muerte celular apoptótica, mediante la inducción de la liberación de factores pro-apoptóticos desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol (85). La apoptosis inducida por la proteína proapoptótica, BAX, se reduce al estimular la hidrólisis de Beclina-1; se ha demostrado también que el ligando inductor de muerte TRAIL desencadena la hidrólisis de Beclina-1 en células HeLa. Sin embargo, la caspasa efectora-8 que se activa en el complejo DISC, puede ser degradada por autofagia (86), lo que sugiere la existencia de un mecanismo de retroalimentación que coordinadamente regula la apoptosis y la autofagia.

Curiosamente, aunque la hidrólisis (dependiente de apoptosis), de beclina-1 y de Atg5 inactiva la autofagia, la hidrólisis de Atg4 con intervención de la caspasa-3, origina un fragmento con actividad autofágica incrementada. Estos descubrimientos son realmente interesantes para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de las inter-conexiones entre la apoptosis y la autofagia (87). Pero es evidente la necesidad de nuevas investigaciones para lograr un claro conocimiento de esos mecanismos y su posterior aplicación clínica en la terapia antineoplásica.

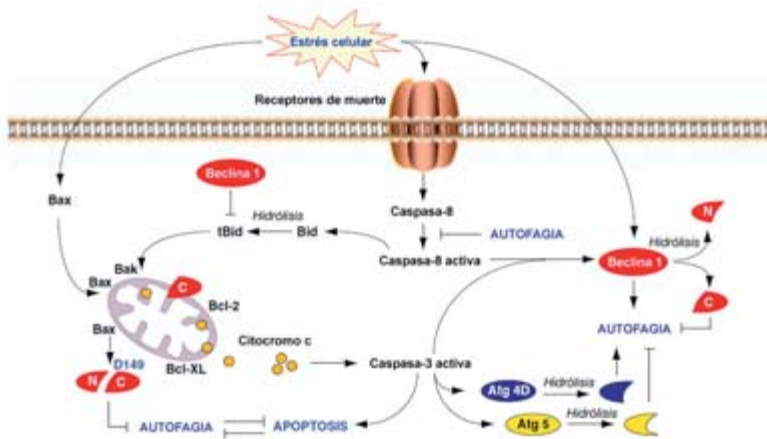


FIGURA 12. Relación entre la autofagia y la apoptosis. Ambos procesos comparten estímulos, utilizan vías comunes de señalización y muestran inhibición mutua. El estímulo apoptótico sostenido induce la activación de la caspasa 8 que libera dos péptidos a partir de Beclina-1. El péptido C-terminal se transloca a la mitocondria sensibilizándola a las señales apoptóticas.

CONCLUSIONES

El cáncer es una enfermedad compleja que se origina por la mutación de oncogenes y/o genes supresores de tumores que evoluciona hacia la alteración de las vías de señalización. El gran reto que subyace en la terapia contra el cáncer se sitúa en la incertidumbre respecto a los intrincados mecanismos moleculares que participan en la enfermedad. En la actualidad se ha aceptado un punto de vista común respecto a que ambos tipos de PCD, apoptosis y autofagia, pueden ser manipuladas para aumentar la eficacia de los tratamientos antitumorales, dada su capacidad para regular la muerte de las células neoplásicas. En los procesos reguladores de las dos vías están involucradas varias vías de señalización esenciales como la cascada PI3K/Akt, las relacionadas con las proteínas Bcl-2, la cascada de las MAPKS, el NFkB y los genes de la autofagia.

La apoptosis contribuye invariablemente a la muerte de las células neoplásicas, mientras que la autofagia juega el papel de Jano para las mismas (muerte ó supervivencia) lo que supone una incertidumbre para su manipulación de cara a los tratamientos antitumorales. Puede existir una relación positiva o negativa entre la apoptosis y la muerte celular por autofagia. La autofagia puede promover o regular la muerte celular por apoptosis, pero en ciertas circunstancias la vía autofágica podría iniciarse únicamente cuando la apoptosis se encuentra inhibida. Por lo tanto, es de la mayor importancia la elucidación de los mecanismos moleculares implicados en la apoptosis y en la autofagia, así como las interconexiones entre estas dos formas de PCD. Aunque se han utilizado en la clínica, muchos agentes antitumorales dirigidos a la regulación de estas vías de señalización, es urgente la búsqueda de medicamentos más efectivos contra el cáncer.

En conclusión, el enorme avance que se ha logrado en el entendimiento de los aspectos moleculares involucrados en la apoptosis y en la autofagia ha de facilitar un mejor conocimiento de aspectos fundamentales de las terapias contra el cáncer. A medida que se clarifiquen esos mecanismos moleculares, se elaborarán terapias más refinadas para la lucha contra esta enfermedad y se abrirán nuevas perspectivas para investigar y seleccionar los fármacos más eficaces en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas malignas en un futuro próximo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Barrero Díaz por su incondicional ayuda en la preparación de las figuras y a Adoración Urrea por su colaboración en el soporte bibliográfico.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgleish GL, Hunter C, Bignell G et al. (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**: 153-158.
- (2) Mariani SM (2003) Apoptosis a gracefull death: Apoptosis in cancer cells. *Medescape General Medicine* **5** (4)
- (3) Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, et al. (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**(1): 121-34.
- (4) Ryan KM (2011). p53 and autophagy in cancer: Guardian of the genome meets guardian of the proteome. *European J. Cancer.* **47**: 44-50.
- (5) Liu JJ, Mou Lin JY, Bo Y, Liu, Bao JK (2011) Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Letters* **300**: 105-114.
- (6) Zong WX, Thompson CB (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* **20**(1): 1-15.
- (7) Michael OH (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-777.
- (8) Kundu M, Thompson CB (2008) Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu. Rev. Pathol.* **3**: 427-455.
- (9) Hannigan AM, Gorski SM (2009) Macroautophagy: the key ingredient to a healthy diet? *Autophagy* **5**: 140-151.
- (10) Andrew T (2008) Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis* **13**:1-9.
- (11) Cheng Y, Qiu F, Ikejima T (2009) Molecular mechanisms of oridonin induced apoptosis and autophagy in murine fibrosarcoma L929 cells *Autophagy* **5**: 430-443.
- (12) Boticario C y Cascales M (2008). Apoptosis y cáncer. *En: Innovaciones en cáncer* pp 215-249 UNED Madrid.
- (13) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer* **26**:239-257.
- (14) Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005) Death receptor signaling. *J. Cell Sci.* **118**: 265-267.
- (15) Merino D y Bouillet, P (2009) The Bcl-2 family in autoimmune and degenerative disorders. *Apoptosis* **14**: 570-583.
- (16) Pavet V, Portal MM, Moulin JC, Herbrecht R y Gronemeyer H (2011) Towards novel paradigms for cancer therapy. *Oncogene* **30**: 1-20.
- (17) Palacios E, Miró MJ y Carrizosa MC (2004) Ceramida y apoptosis. *Ann R Acad Doc* **8**: 119-142.
- (18) Kang R, Zeh HJ, Lotze MT y Tang D (2011). The beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and differentiation* **18**: 571-580.
- (19) Palacios Alaíz E (2009). Función de los esfingolípidos en la señalización celular. *En: Redes de Señalización y Estrategias Terapéuticas.* RANF/IE pp 235-278. JM Ortiz y M Cascales ed. Madrid
- (20) Crighton D, Ryan KM (2004). Splicing DNA-damage responses to tumour cell death. *Biochim Biophys Acta* **1705**(1): 3-15.
- (21) Lane DP (1992) Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature* **358**(6381): 15-6.
- (22) Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**(6630): 299-303.
- (23) Lessene G, Czabotar PE, Colman PM (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 989-1000.
- (24) Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**: 99-163.
- (25) Cascales, M (2003) Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2002. Apoptosis. *Anales de la RADE* **7**: 97-120.
- (26) Danial NN (2007) BCL-2 Family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin. Cancer Res* **13** (24): 7254-7263.
- (27) Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, De-Franco, DB (2004). Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur. J. Biochem* **271**: 2060-2066.

- (28) Yu C, Wang S, Dent P, Gran, S (2001) Sequence-dependent potentiation of paclitaxel-mediated apoptosis in human leukemia cells by inhibitors of the mitogen activated protein kinase/ mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Pharmacol.* **60**: 143-154.
- (29) Karin M, Greten FR (2005) NF κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol* **5**: 749-759.
- (30) Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X (2005) NF κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* **446**: 475-482.
- (31) Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR et al. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**: 677-81.
- (32) Wang G, Nikolovska-Coleska Z, Yang CY, et al. (2006) Structure-based design of potent small-molecule inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *J Med Chem* **49**: 6139-42.
- (33) Sun Y, Wu J, Aboukameel A, Banerjee S, Arnold AA, Chen J et al. (2008). Apogossypolone, a nonpeptidic small molecule inhibitor targeting Bcl-2 family proteins, effectively inhibits growth of diffuse large cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* **7**: 1418-1426
- (34) Tan ML, Ooi JP, Ismail N, Moad AIH, Muhammad TST (2009) Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm Res* **26**: 1547-1559.
- (35) O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B et al. (2007). Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **25**: 1114-1120.
- (36) Flygare JA, Fairbrother WJ (2010). Small-molecule pan-IAP antagonists: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* **20**: 251-267.
- (37) Motoki K, Mori E, Matsumoto A, Thomas M, Tomura T, Humphreys R et al. (2005). Enhanced apoptosis and tumor regression induced by a direct agonist antibody to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 2. *Clin Cancer Res* **11**: 3126-3135.
- (38) Li JH, Kirkiles-Smith NC, McNiff JM, Pober JS. (2003). TRAIL induces apoptosis and inflammatory gene expression in human endothelial cells. *J Immunol* **171**: 1526-1533.
- (39) Volkman X, Fischer U, Bahr MJ, Ott M, Lehner F, Macfarlane M et al. (2007). Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver. *Hepatology* **46**: 1498-1508.
- (40) Holloch PA, Griffith TS (2009). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *Eur J Pharmacol* **625**: 63-72.
- (41) Mom CH, Verweij J, Oldenhuis CN, Gietema JA, Fox NL, Miceli R et al. (2009). Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study. *Clin Cancer Res* **15**: 5584-5590.
- (42) Trarbach T, Moehler M, Heinemann V, Kohne CH, Przyborek M Schulz C et al. (2010). Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* **102**: 506-512.
- (43) Wakelee HA, Patnaik A, Sicik BI, Mita M, Fox NL, Miceli R et al. (2010). Phase I and pharmacokinetic study of lexatumumab (HGSETR2) given every 2 weeks in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* **21**: 376-381.
- (44) Vilimanovich U, Bumbasirevic V (2008). TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2. *Cell Mol Life Sci* **65**: 814-826.
- (45) Hasegawa H, Yamada Y, Harasawa H, Tsuji T, Murata K, Sugahara K et al. (2005). Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Br J Haematol* **128**: 253-265.
- (46) Thorburn A, Behbakht K, Ford H. (2008) TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them. *Drug Resist Updat* **11**: 17-24.
- (47) Newsom-Davis T, Prieske S, Walczak H. (2009). Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* **14**: 607-623
- (48) Pavet V, Beyrath J, Pardin C, Morizot A, Lechner MC, Briand JP et al. (2010). Multivalent DR5 peptides activate the TRAIL death pathway and exert tumoricidal activity. *Cancer Res* **70**: 1101-1110.

- (49) Zhang L, Ren X, Alt E, Bai X, Huang S, Xu Z et al. (2010). Chemoprevention of colorectal cancer by targeting APC-deficient cells for apoptosis. *Nature* **464**: 1058-1061.
- (50) Yang Z, Klionsky DJ (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22(2)**: 124-31.
- (51) Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* **34 (3)**: 259-69.
- (52) Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432(7020)**: 1032-6.
- (53) Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, et al (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* **21(13)**: 1621-35.
- (54) Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempke B, Hibshoosh H, Levine B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672-676.
- (55) Maiuri MC, Tasdemir E, Crioll A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, Kroeme G (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor gene. *Cell Death Differ* **16**: 87-93.
- (56) Kang R, Tang D, Lotze MT, Zeh HJ (2011). Apoptosis to autophagy switch triggered by the MHC class III-encoded receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Autophagy* **7**: 91-93.
- (57) Majumder PK., Sellers WR. (2005) Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* **24**: 7465-7474.
- (58) Chen N y Karantza-Wadsworth V (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1793**: 1516-1523.
- (59) Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8** (2008)
- (60) Stack JH y Scott DM (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidyl inositol-specific PI3-kinase activities. *J. Biol. Chem.* **269**: 31552-31562.
- (61) Karnoub AE y Weinberg RA (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 517-531.
- (62) He C y Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**:67-93.
- (63) Crighton D, Wilkinson S, Ryan KM (2007). DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. *Autophagy.* **3(1)**: 72-4.
- (64) O'Prey J, Skommer J, Wilkinson S, Ryan K. (2009). Analysis of DRAM-related proteins reveals evolutionarily conserved and divergent roles in the control of autophagy. *Cell Cycle* **8(14)**: 2260-5.
- (65) Beth L (2007). Autophagy and cancer. *Nature* **446**: 745-747
- (66) Rosenfeldt MT, Ryan KM (2009) The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* **11**:e36.
- (67) Djavaheri-Mergny M, Botti J, Codogno P. (2007) Autophagy and autophagic cell death En: Gewirtz DA, S.E. Holt SE y Grant S. (Eds.) Apoptosis, Senescence, and Cancer, Humana Press N.J., pp.93-107.
- (68) Edinger A, Thompson C. (2009) Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* **4**:422-424.
- (69) Chen N, Debnath J. (2010). Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett.* **584**:1427-1435.
- (70) Young ARJ, Narita, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Daro JFJ, Tavar S, Arakawa S. Shimizu S, Watt FM. Narita M (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**:798-803.
- (71) Wilkinson S, Ryan KM (2010) Autophagy: an adaptable modifier of tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* **20(1)**: 57-64.
- (72) Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, et al (2007). Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* **282(25)**:18573-83.
- (73) Sarkar S, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2009) Autophagic clearance of aggregate-prone proteins associated with neurodegeneration. *Methods Enzymol* **453**: 83-110.

- (74) Cadwell K, Patel KK, Komatsu M, Virgin HWT, Stappenbeck TS (2009) A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease. *Autophagy* **5**(2): 250-2.
- (75) Faivre S., Kroemer G., Raymond E. (2006) Current development of Mtor inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**: 671-6.
- (76) Li D, Cui Q, Chen SG, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2007) Inactivation of ras and changes of mitochondrial membrane potential contribute to oridonin-induced autophagy in a 431 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **105**: 22-33.
- (77) Cheng Y, Qiu F, Ye YC, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2009) Oridonin induces G2/M arrest and apoptosis via activating ERK-p53 apoptotic pathway an inhibiting PTK-Ras-Raf-JNK survival pathway in murine fibrosarcoma L929 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **490**: 70-75.
- (78) Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 741-752.
- (79) Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Mergny MD, Amelio M (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* **10**: 676-687.
- (80) Levine B, Sinha S, Kroemer G. (2008) Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* **4**: 600- 606.
- (81) Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G (2010) Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome *EMBO J.* **29**: 515-516.
- (82) Maiuri MC, Toumelin GL, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P (2007) Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* **26**: 2527 -2539.
- (83) Kroemer G, Galluzzi L, Brenner L. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**: 99-163.
- (84) Moretti L, Cha YI, Niermann KJ, Lu B (2007) Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle* **6**:793-798.
- (85) Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC, Kroemer G. (2010) Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* **29**: 1717-1719.
- (86) HouW, Han J, Lu C, Goldstein LA, Rabinowich H. (2010) Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6**: 891-900.
- (87) Wirawan E, Walle LV, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, Rycke RD, Verspurten J, Declercq W, Agostinis P, Berghe TV, Lippens S, Vandenabeele P (2010) 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.* **1** 1-10.