



Anàlisi “ex vivo” de mecanismes d’inducció d’apoptosi i resistència al tractament en gliomes malignes

Ruth Villalonga Planells

ADVERTIMENT. La consulta d’aquesta tesi queda condicionada a l’acceptació de les següents condicions d’ús: La difusió d’aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d’investigació i docència. No s’autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d’un lloc aliè al servei TDX. No s’autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you’re accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it’s obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
Programa de Doctorat "Biomedicina"

Ruth Villalonga Planells

**Anàlisi "ex vivo" de mecanismes d'inducció d'apoptosi i
resistència al tractament en gliomes malignes**

DIRECTORS DE LA TESI

Dra. Avelina TORTOSA I MORENO
Dra. Josefa GIMÉNEZ BONAFÉ

Data de lectura: 14 de setembre de 2011

Introducció

1. Tumors glials: generalitats

Els tumors cerebrals primaris de l'adult constitueixen un grup heterogeni complexa de neoplàsies que deriven de diferents llinatges cel·lulars. Entre ells, els gliomes representen el grup més important de tumors malignes en els adults. Als Estats Units es diagnostiquen aproximadament unes 51.000 neoplàsies intracranials a l'any, de les quals un 36 % son d'origen glial o gliomes (Clarcke J,2010). Els tumors d'origen glial s'agrupen en distintes histologies, entre els que s'inclouen els astrocitomes, els oligodendrogliomes i els endimomes, sent els astrocitomes els més freqüents i representen entre un 60-70% de tots els casos (Louis DN, 2007).

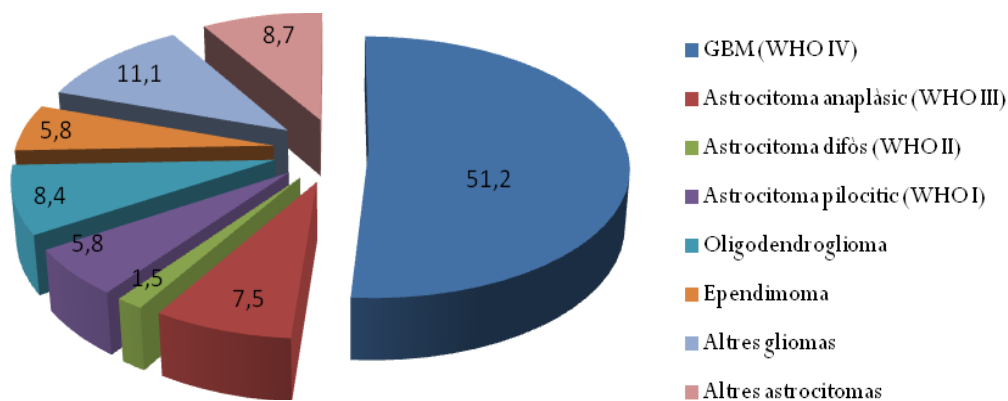


Figura 1 Incidència dels gliomes. Modificat de Adamson C,2009.

La classificació histològica més utilitzada actualment dels astrocitomes és la proposada per la Organització Mundial de la Salut (OMS), que va ser inicialment establerta a l'any 1979, revisada en diverses ocasions (anys 1993 i 2000), sent la darrera, i actualment vigent, la revisió de l'any 2007 (Reifenberger G,2004; Louis DN,2007). Aquesta classificació es basa en criteris histopatològics (presència o no de: atípia nuclear, mitosis, angiogènesis i necrosi) que reflecteixen de forma anticipada el comportament biològic del tumor (Huse Jt, 2010). La gradació dels astrocitomes d'acord a la classificació de l'OMS inclou quatre graus de malignitat (Figura2). Els astrocitomes pilocítics grau I representen els tumors biològicament més benignes i que poden ser curats si s'efectua una exèresis quirúrgica completa (Furnari FB, 2007). Els

tumors de grau II, anomenats astrocitomes difosos, són tumors ben diferenciats de creixement lent, però amb una elevada tendència a infiltrar estructures cerebrals adjacents. Histològicament es caracteritzen per un augment moderat de la cel·lularitat, sense imatges de necrosi ni presència de proliferació ni microvascularització. Aquests tumors poden recidivar després de la cirurgia i, en general, la recidiva es caracteritza per una progressió a graus més malignes. Els astrocitomes anaplàstics o grau III són tumors que es caracteritzen per un augment de la cel·lularitat i de l'activitat mitòtica, així com presència d'atípia nuclear. Els fenòmens d'angiogènesis i necrosis són inexistents (Ohgaki H, 2009; Dunbar E,2010). Al igual que en el cas dels astrocitomes grau II, l'astrocitoma anaplàstic també recidiva en un 98% dels casos i en un elevat percentatge de vegades la recidiva es presenta com un tumor de major grau de malignitat. Finalment el glioma més agressiu és el glioblastoma multiforme (GBM) o astrocitoma grau IV, caracteritzat per proliferació cel·lular totalment descontrolada, amb infiltració difusa, tendència a la necrosi, capacitat de neoformació vascular, una elevada resistència a l'apoptosi i una gran inestabilitat genòmica (Furnari FB, 2007).

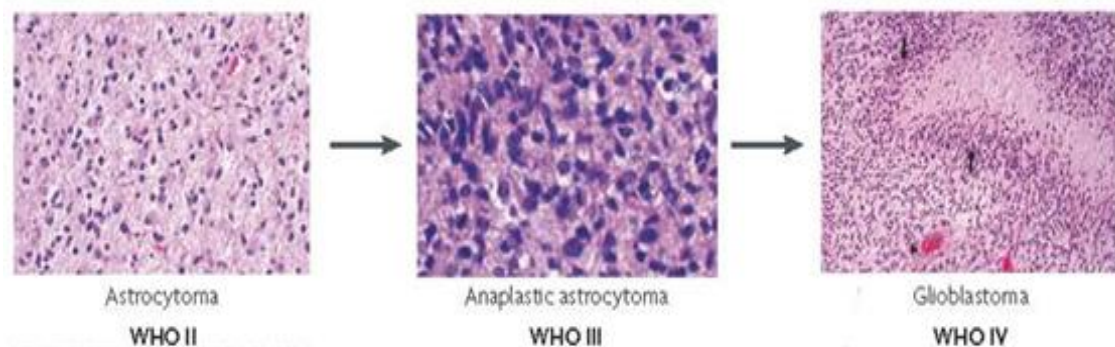


Figura 2. Progressió a partir d'un astrocitoma difús grau II a glioblastoma multiforme. Modificat de Huse JT, 2010.

Els graus de l'OMS juntament amb altres paràmetres clínics i moleculars constitueixen un grup de criteris que s'utilitzen per a predir la resposta al tractament i la supervivència dels pacients amb gliomes en general. En aquest sentit, els astrocitomes de grau II s'associen a una supervivència mitjana entre 5 i 15 anys, mentre que en els pacients amb astrocitomes de grau III aquesta supervivència disminueix fins a 3 anys i pels pacients amb GBM la supervivència mitjana és d'aproximadament 1 any (Figura 3) (Louis DN, 2006; Ohgaki H, 2009).

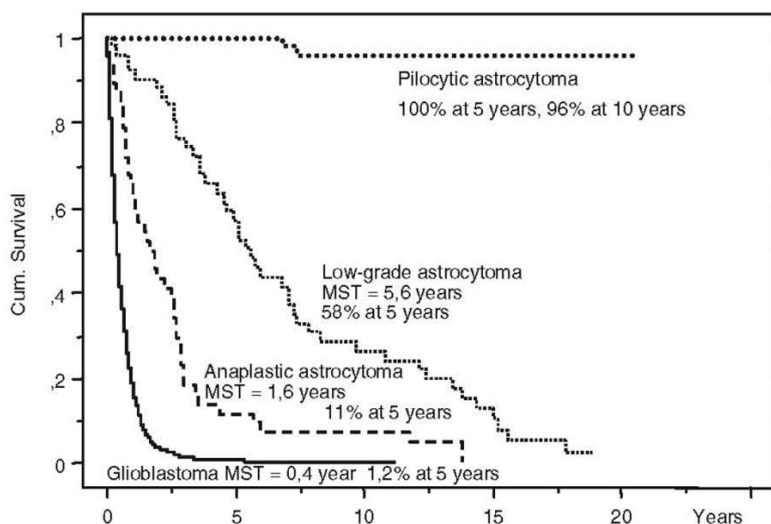


Figura 3. Corba de supervivència per als diferents graus tumorals. Modificat de Ohgaki H, 2009.

1.1 Glioblastoma multiforme: incidència i característiques histològiques

El glioblastoma multiforme és la neoplàsia intracraneal més freqüent en adults, representant un autèntic desafiament per a la Neuro-oncologia tenint en compte que, després del tractament estàndard, més del 95% dels casos recorren en el lloc original del tumor, el que suggereix l'existència d'una elevada resistència als tractaments. En aquest treball de tesi ens hem centrat en la recerca de noves dianes terapèutiques que puguin representar un avanç en el tractament de pacients amb GBM.

Els GBMs representen al voltant del 51% del tots els gliomes (Figura 1), són més freqüents en homes que en dones, i en individus de raça blanca (Wen PY, 2008). La incidència dels GBM en Països Europeus i als Estats Units és de 3.19 (2.96-3.39) casos nous /100.000 habitants per any [Central Brain Tumor Registry of the United States: Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS); <http://www.cbtrus.org>] (Ohgaki 2009). La seva incidència ha augmentat lleugerament en les últimes 2 dècades, sobretot en adults d'edat avançada, en part degut a la millora del diagnòstic (Adamson C, 2009). Els GBMs es poden desenvolupar a qualsevol edat, però sobretot en adults amb un pic d'incidència entre els 45-75 anys, sent l'edat mitjana dels pacients amb GBM de 62 anys (Louis DN, 2007).

Els GBMs són tumors difusament infiltrants i pobrament diferenciats, amb cèl·lules glials de creixement ràpid, i amb una gran resistència als tractaments estàndards (Purrow B, 2009; Clarke J, 2010). La denominació multiforme ve donada per l'heterogeneïtat de les cèl·lules que el conformen.

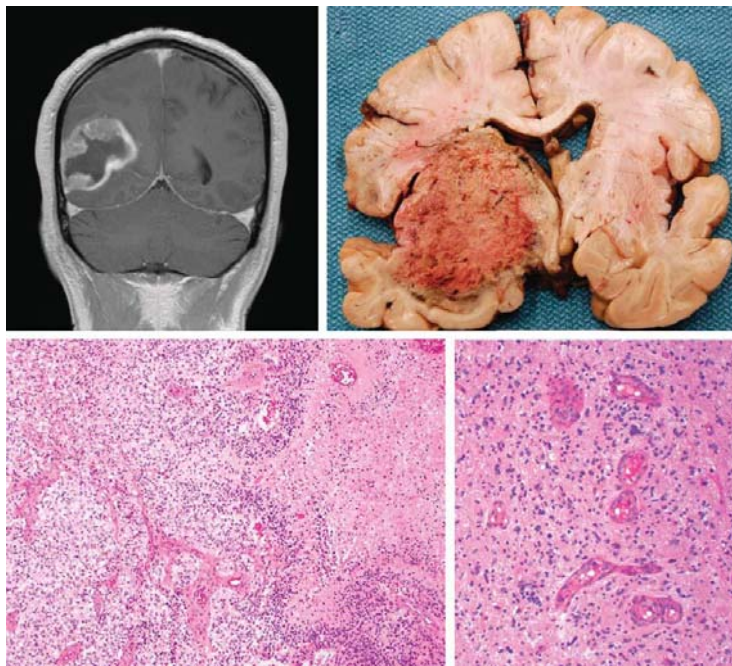


Figura 4. Característiques dels GBM. Modificat de Dunbar E, 2010.

Aquests tumors es caracteritzen per una gran atípia nuclear i un índex mitòtic alt. La formació patològica de nous vasos i la necrosi (sovint de tipus pseudoempallissada) son essencials per el diagnòstic histològic.

Macroscòpicament, aquests tumors son masses necròtiques grans amb una zona perifèrica de substància grisa que envolta la neoplàsia la qual acostuma a mostrar edema. Es freqüent la presència d'hemorràgies intratumorals.

Microscòpicament, són tumors altament anaplàstics, caracteritzats per una sorprenent heterogenicitat histològica, molecular i genètica, no només de forma individual entre diferents

1.2 Presentació clínica, diagnòstic i factors pronòstic del GBM

La simptomatologia dels pacients amb GBM és molt variada i bàsicament depèn de la localització del tumor. Entre els símptomes més freqüents s'inclouen els dèficits neurològics focals, cefalees, convulsions, confusió, pèrdua de memòria i canvis de personalitat (Wen PY, 2008). La majoria de GBMs es localitzen en el lòbul frontal dels compartiments supratentorials. No obstant, també es poden desenvolupar a qualsevol altre lòbul cerebral, tronc encefàlic, cerebel i la medul·la espinal. La major part de les cèl·lules tumorals es troben dins de la massa del tumor o dintre del perímetre de 2 cm que rodeja el tumor. Així i tot, també s'han trobat cèl·lules que migren varis centímetres o inclús als hemisferis contralaterals.

La prova d'elecció pel diagnòstic d'un GBM és la ressonància magnètica amb i sense contrast. Aquesta tècnica proporciona informació detallada sobre la mida, la composició i la localització del tumor, sobre la presència d'edema i el grau de captació de contrast. Radiològicament, els GBMs es caracteritzen per masses hipodenses amb contorns irregulars que capten contrast de forma sòlida o en anell rodejant una àrea necròtica central (Van Meir EG, 2010).

Des d'un punt de vista clínic i biològic els GBM es poden desenvolupar a partir de 2 vies neoplàsiques: els glioblastomes primaris i els glioblastomes secundaris. La majoria dels casos (> 90%) són glioblastomes primaris o també anomenats "*de novo*", els quals en 2/3 dels casos tenen una història clínica de menys de 3 mesos, amb una mitjana de 6,3 mesos entre la primera simptomatologia i el diagnòstic histològic (Ohgaki H, 2007). Els GBM primaris es diagnostiquen sense evidència clínica, radiològica o histopatològica d'una lesió prèvia. Pel contrari, els glioblastomes secundaris es desenvolupen més lentament a través d'una progressió maligna d'un astrocitoma de baix grau (astrocitoma difús, grau II o astrocitoma anaplàstic, grau III) a graus superiors (grau III o IV). La mitjana de progressió d'un astrocitoma de baix grau a glioblastoma és d'uns 5 anys, mentre que a partir d'un astrocitoma anaplàstic a glioblastoma és d'aproximadament 2 anys (Schwartzbaum JA, 2006; Ohgaki H, 2007; Wen PY, 2008).

Encara que l'etiologia dels GBMs és desconeguda molt probablement té un origen multi factorial, en el qual hi poden intervenir agents medi ambientals i genètics com factors de risc. Els agents medi ambientals associats al desenvolupament d'un GBM inclou l'exposició a altes dosis radiació ionitzant, altes dosis de quimioteràpics pel tractament d'altres neoplàsies en llocs diferents del cervell i carcinògens químics.

En un 5% dels gliomes l'agregació genètica familiar representa un paper important. A partir d'estudis d'agregació familiar, sensibilitat mutagènica o síndromes genètiques, s'han trobat certes evidències que determinades alteracions genètiques augmenten la susceptibilitat a desenvolupar un glioma. Malgrat tractar-se d'un nombre petit de casos, aquestes síndromes donen una informació molt valuosa a partir de la qual es poden identificar gens candidats o vies que poden estar implicades en el procés de gliomagènesis (Figura 5). Síndromes com la de la Neurofibromatosis 1 i 2, l'esclerosi tuberosa, el retinoblastoma, la síndrome de Li-Fraumeni, la síndrome de Turcot i múltiples hamartomes, es troben associats amb un increment del risc a desenvolupar gliomes o altres tipus de neoplàsies cerebrals (Kanu OO, 2009; Schwartzbaum JA, 2006, Wen PY, 2008).

Síndrome	Gen	Localització cromosòmica
Neurofibromatosis 1	NF1	17q11
Neurofibromatosis 2	NF2	22q12
Esclerosi Tuberosa	TSC1 TSC2	9q34 16p13
Retinoblastoma	RB1	13q14
Síndrome de Li-Fraumeni	TP53	17p13
Síndrome de Turcot i Hamartoma múltiple	APC hMLH1 hMLH2 PMS2 PTEN	5q21 3p21.3 2p22-21 7p22 10q23.3
Síndrome de Cowdens i malaltia de Lhermitte-Duclos	PTEN	10q23.3

Figura 5. Síndromes familiars associats amb el risc de desenvolupar una neoplàsia cerebral. Modificat de Kanu OO, 2009

En estudis poblacionals, la supervivència mitjana en pacients diagnosticats de GBM es de 17-30% durant el primer any, mentre que es només del 4% als 2 anys. El temps de supervivència està molt relacionat amb la presència de factors de bon pronòstic que inclouen l'edat en el moment de diagnòstic, l'estat clínic mesurat per l'escala KPS (Karnofsky performance status), la presència de metilació del promotor del gen O6-methylguanine methyltransferase (*MGMT*) i una resecció del tumor superior al 98% (Adamson C, 2009; Kanu OO, 2009). Si bé no hi ha diferències en les taxes de supervivència entre homes i dones, si que és cert que les taxes són clarament superiors en pacients més joves (Schwartzbaum JA, 2006). Les taxes supervivència als 5 anys son del 13% en pacients de entre 15-45 anys, mentre que en pacients amb edats superiors als 75 anys és de només un 1% (Adamson C, 2009; Kanu OO, 2009).

Algunes de les alteracions genètiques detectades en gliomes poden tenir implicacions en el diagnòstic i pronòstic de la malaltia, ja que es troben associades bé amb un tipus tumoral ben definit o relacionades amb el grau de malignitat tumoral. Aquests factors són útils per a la classificació histològica d'aquells tumors que mostren trets ambigus, a més de proporcionar informació de la resposta del pacient a un determinat tractament (Riemenschneider MJ, 2010).

Fins al moment , el nombre de marcadors en neuro-oncologia és limitat a unes quantes alteracions entre les que es troben:

- La codeleció *1p/19q* en tumors oligodendroglials, associat a un millor pronòstic en els pacients que reben radio/quimioteràpia adjuvant.
- La metilació del promotor del gen *MGMT* en glioblastomes i astrocitomes anaplàstics és un factor predictiu de resposta al tractament amb agents alquilants. S'associa a una major supervivència en pacients de GBM tractats amb radioteràpia amb combinació amb temozolomida.
- Les mutacions en els gens *IDH1* i *IDH2* en gliomes difosos ha esdevingut un marcador de bon pronòstic per a gliomes difosos graus WHO II i III, així com en GBMs secundaris.
- Duplicacions/fusions en el gen *BRAF* en astrocitomes pilocítics, és un marcador diagnòstic que ajuda a diferenciar-los de astrocitomes difosos.

1.3 Biologia molecular dels gliomes

El pas de grau II fins a grau III representa un augment de l'agressivitat tumoral que a nivell histològic es reflexa amb un augment de la cel.lularitat i un increment de l'activitat mitòtica. Des d'un punt de vista molecular, trobem alteracions en gens que regulen diferents vies relacionades amb la proliferació cel.lular, la supervivència, la invasió i l'angiogènesis. A més, en general, les alteracions moleculars es van adquirint de forma seqüencial. A la figura 6 s'indiquen les alteracions moleculars més freqüentment observades en gliomes.

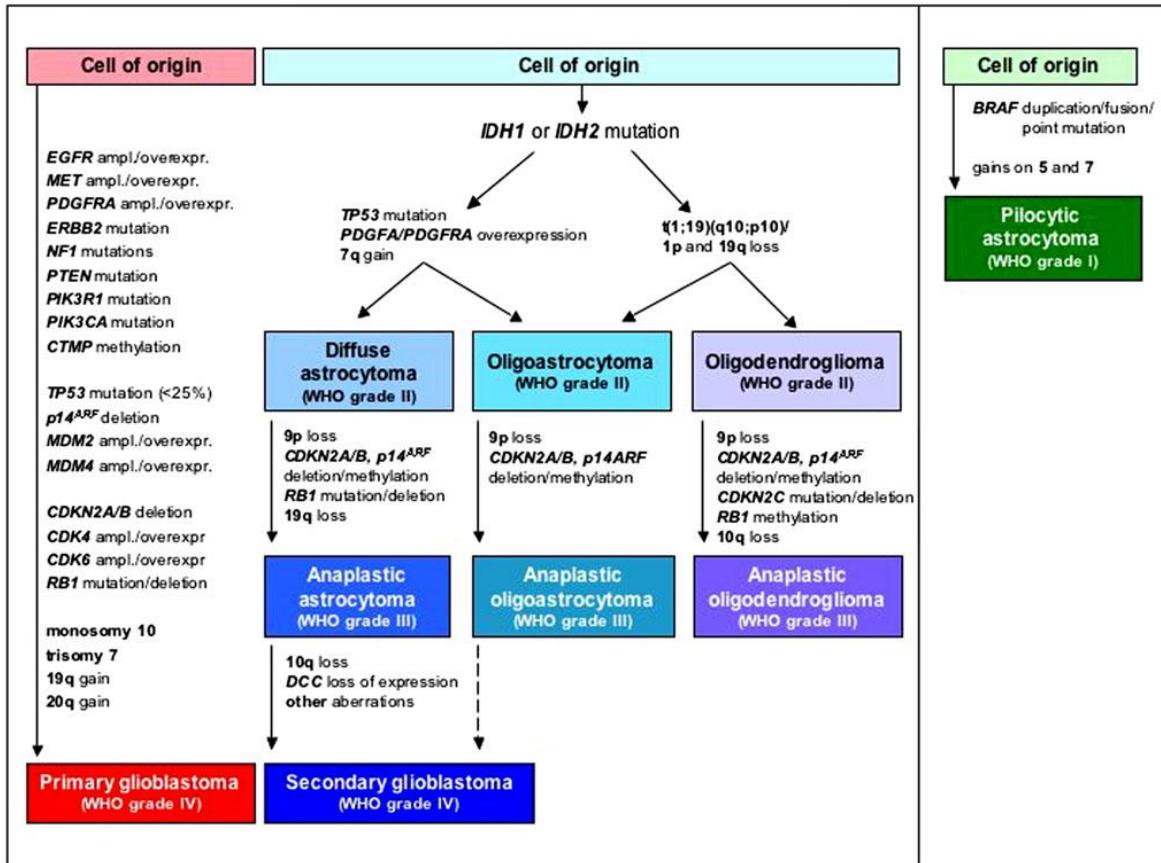


Figura 6. Alteracions moleculars més freqüents en el glioblastoma. Modificat de Riemenschneider MJ, 2010.

Les següents seccions descriuen aquestes aberracions genètiques observades en GBM i les vies de senyalització alterades.

1.3.1. Via *EGFR/RAS/NF1/PTEN/AKT/mTOR*

Receptors tirosin quinasa, com l'EGFR, esdevenen actius a través de la unió als seus lligands (p.e, EGF) al domini extracel·lular. Aquesta unió permet el reclutament de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) el qual fosforila PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfat) convertint-lo en PIP3, que activarà molècules efectores com AKT o mTOR. Aquestes cascades de senyalització faciliten la mitogènesis i angiogènesis així com la disminució de l'apoptosi. Les proteïnes PTEN i NF1 actuen com a inhibidors d'aquestes vies (Figura7) (Ohgaki H, 2009).

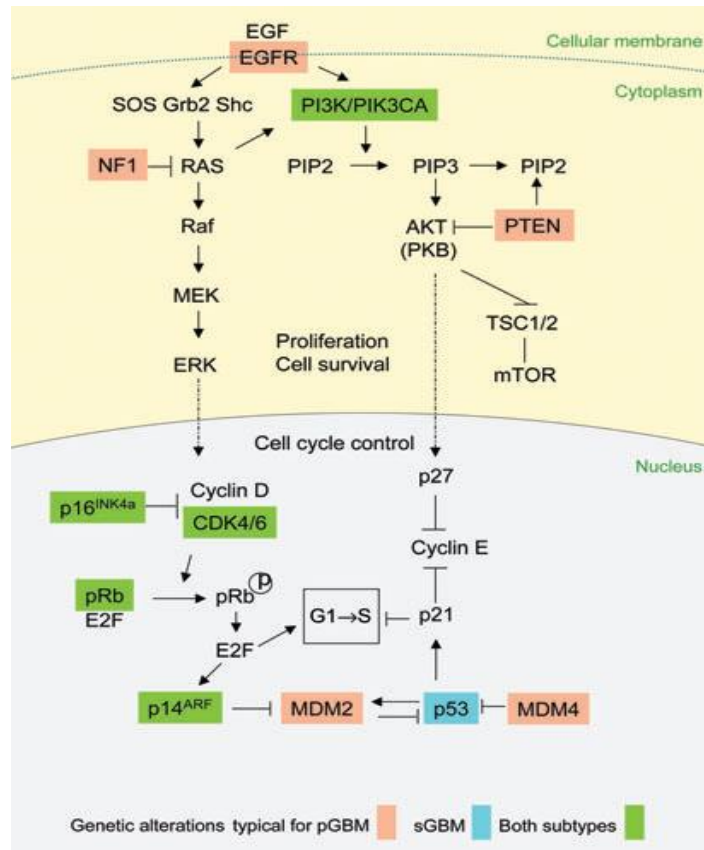


Figura 7. Via EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K involucrada en la patogènesis dels GBM. Modificat de Ohgaki H,2009.

En el desenvolupament dels GBM primaris la via de senyalització més freqüentment alterada és la via EGFR/PTEN/Akt/mTOR.

1. L'amplificació de *EGFR* s'observa en el 40% dels GBMs primaris però rarament en els secundaris. El gen *EGFR* també pot trobar-se sobreexpressat en més del 60% dels GBMs primaris i en menys del 10% del GBMs secundaris. Tots els GBMs que mostren amplifícacions en aquest gen també mostren sobreexpressió de la proteïna, mentre que entre el 70-90% dels que tenen sobreexpressió mostren simultàniament amplifícació gènica. L'amplifícació del gen *EGFR* sovint està associada amb mutacions, sent la més freqüent la deleció del exó 2 al 7 (*EGFRvIII*). Aquesta variant es troba autofosforilada el que li confereix una activitat tirosina quinasa constitutivament activada malgrat manca-li el domini extracel·lular d'unió al lligand i, per tant, promou un creixement cel·lular de forma descontrolada (Mukherjee B,2009; Gan HK,2009). A més, s'ha observat que aquesta variant confereix un augment de la resistència a la radioteràpia, ja que promou una ràpida reparació dels trencaments al DNA induïts per

les radiacions ionitzants. Aquesta variant s'observa en 1/3 dels GBMs en els quals en moltes ocasions s'associa a la amplificació de la seva forma salvatge de *EGFR* (Purrow B,2009; Ohgaki H,2007).

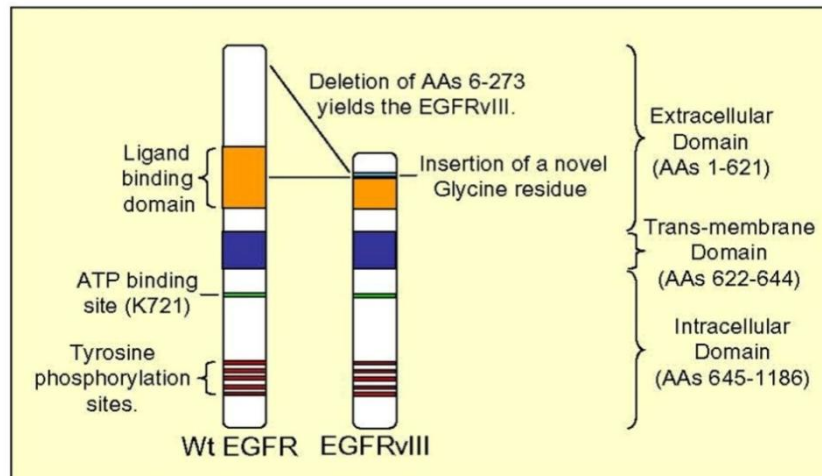


Figura 8. Estructura del Receptor de l'EGF. Formació de l'EGFRvIII per deleció. Modificat de Gan HK,2009.

2. *PTEN* (phosphatase and tensin homology), és un gen localitzat al cromosoma 10q23.3, que codifica per a una proteïna de 403 residus que actua com a proteïna tirosina fosfatasa tant en lípids com en proteïnes (Planchon SM,2007). Presenta activitat 3' fosfoinositol, regulant de forma negativa PI3K a través de la desfosforilació de fosfatidilinositols-2,4,5 trifosfats (PIP3) i fosfatidilinositol-3,4 difosfat (Adamson C,2009). La seva funció és la de controlar la migració i proliferació cel·lular mitjançant la regulació de la quinasa serina/treonina AKT (Louis DN, 2006). El gen *PTEN* es troba alterat entre el 15-40% dels GBMs primaris, i rarament en els GBMs secundaris (Ohgaki H,2009).
3. Les mutacions o amplificacions en el gen *PIK3CA* són rares tant en GBMs primaris com en secundaris, amb una incidència del 5 i 13%, respectivament. Al voltant del 63% dels GBMs primaris mostren alteracions en almenys un d'aquests gens: *EGFR*, *PTEN* i *PIK3CA*.
4. L'increment en l'expressió del mRNA de PDGFR, s'ha observat en tots els graus del tumors astrocitaris, mentre que l'amplificació gènica només es detecta en un petit nombre de GBMs (13%) (Chin L, 2008; Ohgaki H,2009).

5. A més, el gen supressor de tumors *NF1*, que codifica per a la proteïna neurofibromina, inhibeix RAS, un regulador negatiu de la via i es troba alterat en un 18% de GBMs (Ohgaki H,2009).

1.3.2. Via *TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF}*

El gen *TP53* codifica per a la proteïna p53, la qual actua regulant múltiples funcions cel·lulars com l'apoptosi, el cicle cel·lular, la senescència, la reparació del dany del DNA, el metabolisme cel·lular o l'autofàgia (Krusse JP,2009) evitant que la cèl·lula pateixi una transformació neoplàsica. La proteïna p53 controla la divisió de les cèl·lules amb genomes poc estables, bloquejant les cèl·lules en fase G1 o activant la via d'apoptosi o senescència si el dany cel·lular és molt més greu (Vogelstein B,2000).

MDM2, és una proteïna amb activitat ubiquitina ligasa E3 encarregada de la regulació de p53 mitjançant la unió al domini de transactivació N-terminal de p53, reprimint la seva activitat transcripcional. MDM2 i p53 formen un feedback, a través del qual les dues proteïnes regulen els seus nivells mútuament. La proteïna p14^{ARF} s'uneix a MDM2 i d'aquesta forma inhibeix la degradació i el silenciament transcripcional de *TP53* per part de MDM2; p14^{ARF} és regulada negativament per *TP53* (Figura 9). A més, altres proteïnes de la família MDM2 com MDM4 també regulen *TP53* (Ohgaki H,2009).

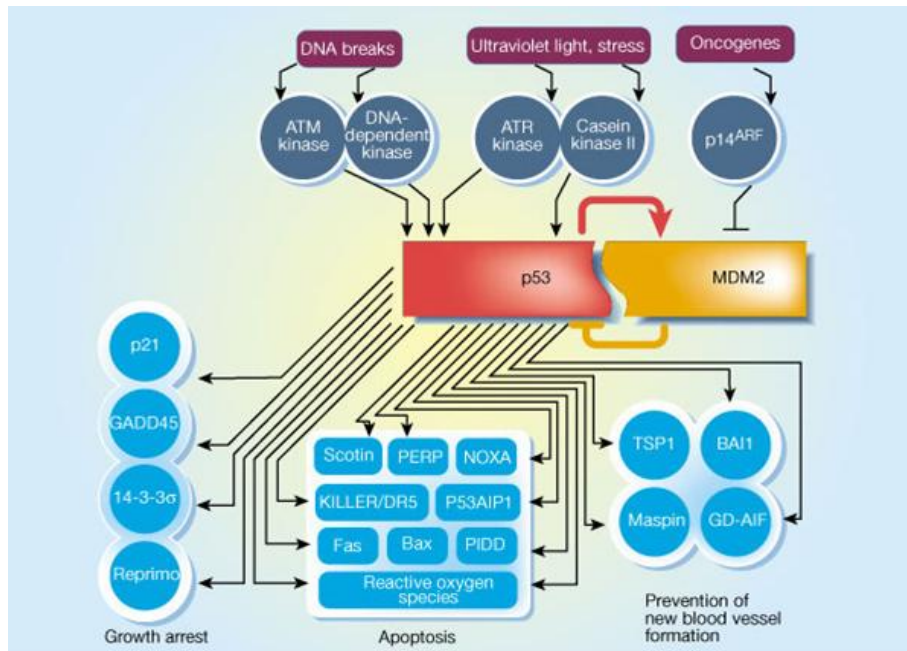


Figura 9. Activació de la via de p53. Vogelstein B,2000.

La via de *TP53* té un paper fonamental en el desenvolupament del GBMs secundaris. Les mutacions en aquest gen són detectades en 2/3 del astrocitomes difosos i en més d'un 65% dels casos de GBMs secundaris. En els GBMs primaris també s'observa la presència de mutacions en el gen *TP53*, encara que en una freqüència inferior (<30% casos) (Ohgaki H, 2007; Kanu OO,2009). En els GBMs secundaris, al voltant del 57% de les mutacions que s'han trobat es localitzen en els codons 248 i el 273 i, són transicions de nucleòtids. En el cas del GBMs primaris, les mutacions es troben distribuïdes per igual al llarg del gen *TP53* i només el 17% es troben en aquests dos codons descrits anteriorment (Figura 10) (Ohgaki H, 2007).

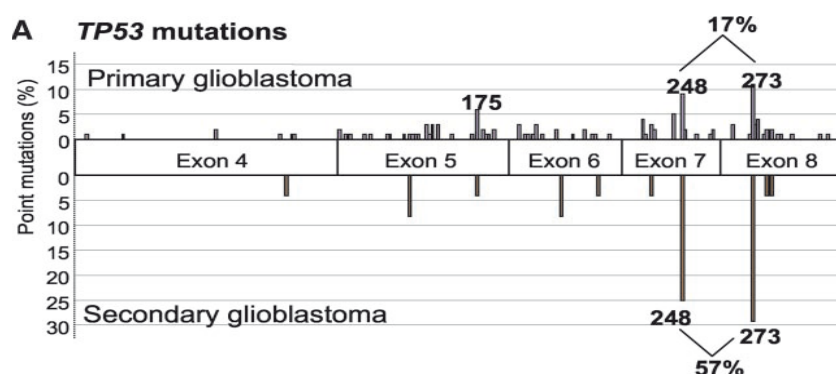


Figura 10. Distribució de les mutacions en el gen TP53 en GBMs primaris i secundaris. Ohgaki H,2004.

Amplificacions en MDM2 es troben presents en menys del 10% de GBMs, exclusivament en GBM primaris amb absència de mutacions en *TP53* (Ohgaki H, 2009).

Finalment, la pèrdua d'expressió en $p14^{ARF}$ s'observa en un 76% del GBMs, i es correlaciona amb una deleció homozigòtica de *CDKN2A* o amb la metilació gènica del seu promotor, (Purrow B, 2009). Les delecions homozigòtiques o la metilació del promotor són més freqüents en GBMs primaris observant-se en un 50% de casos (Ohgaki H, 2009).

Es important destacar que al menys una mutació en un dels gens que conformen la via *TP53/MDM2/MDM4/p14^{ARF}* es observat al voltant del 50% del GBMs primaris i en >70% dels secundaris.

1.3.3. Via $p16^{INK4a}/RB1/CDK4$

El gen *RB1*, localitzat al cromosoma 13q14.2, codifica per la proteïna *RB1* la qual controla la progressió de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular. En condicions normals, quan les cèl·lules quiescents reben estímuls mitògens es produeix un increment en l'expressió de ciclina D, la qual formarà complexos amb les ciclins dependents de quinasa (Cdk), Cdk4 o Cdk6. Aquests complexos són els encarregats d'alliberar el complex ciclina E/Cdk2 del seu inhibidor $p27^{Kip1}$. És aleshores quan els dos complexos ciclina D/Cdk4 i ciclina E/Cdk2 són susceptibles de fosforilar a la proteïna del retinoblastoma (*RB1*), la qual no podrà seguir unint-se als membres de la família dels factors de transcripció E2F. Una vegada alliberat E2F, s'iniciarà la transcripció dels gens necessaris per iniciar la fase S del cicle cel·lular. L'activació de la ciclina D/Cdk4 és controlada per la família de proteïnes *INK4*, on $p16^{INK4}$ és el membre més conegut (Figura 11) (McNeish I, 2004; Scherr CJ, 2002).

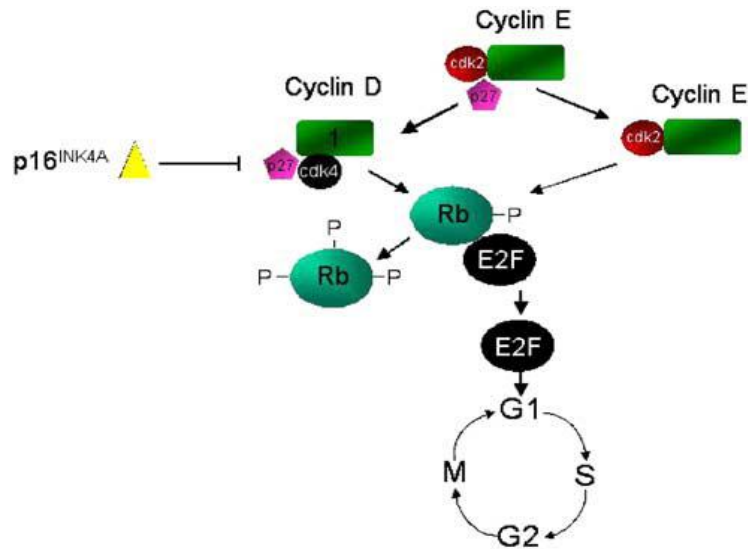


Figura 11. Activació de la via $p16^{\text{INK4a}}$ /RB1/CDK4. Modificat de McNeish I, 2004.

La pèrdua cromosòmica és un esdeveniment freqüent en els tumors i en el cas del gliomes la pèrdua del cromosoma 13q14 en el qual es localitza el gen del RB1, s'observa entre un terç i la meitat dels casos d'astrocitoma d'alt grau. Aquesta pèrdua facilita la transició cap a estadis més malignes. A més el gen *RB1* també pot inactivar-se per mutacions puntuals o per la metilació del promotor, fet que s'observa en el 43% de GBM secundaris i en un 14% en GBM primaris (Ohgaki H, 2007).

Amplificacions del gen *CDK4*, que es localitza en el cromosoma 12q13-14, són altres formes d'eludir el control del cicle cel·lular i facilitar la progressió a GBM en el 18% del casos de gliomes malignes (Louis N, 2006; Chin L, 2008). Les amplificacions en els gens *CDK4*, *CDK6* (1%) o *ciclina D1* representen una alternativa a alteracions en els gens *CDKN2A* o *RB1*, perquè aquests canvis rarament passen en el mateix tumor (Ohgaki H, 2009).

És important destacar que el gen *CDKN2A*, localitzat al cromosoma 9p21, codifica per a dos proteïnes totalment diferents: $p16^{\text{INK4a}}$ i $p14^{\text{ARF}}$ (Figura 12). Els transcrits tenen lloc per *splicing* alternatiu. Estructuralment diferents, aquestes proteïnes actuen com a supressores tumorals de dos vies clau en el desenvolupament neoplàstic (Sekulic A, 2008). Com s'ha esmentat anteriorment, $p16^{\text{INK4a}}$ regula la via del retinoblastoma, mentre que $p14^{\text{ARF}}$ participa en la via de p53. Aquestes dues vies tenen un paper fonamental en el control del cicle cel·lular, pel que una alteració en la seva funcionalitat comporta un estímul en el procés de gliomagènesis (Kanu OO, 2009).

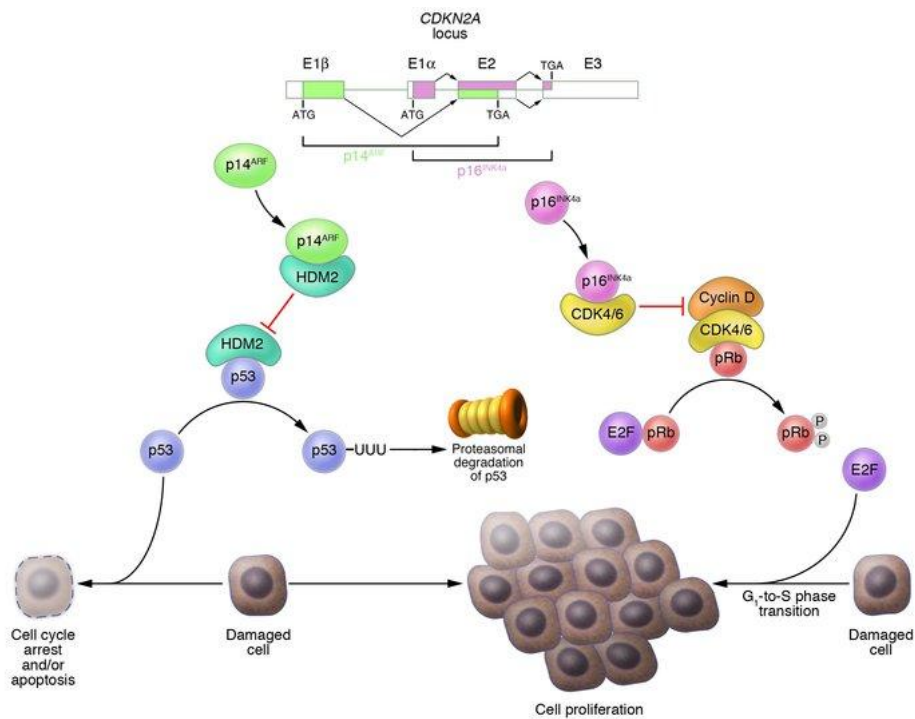


Figura 12. Locus *CDKN2A*. Modificat de Chudnovsky Y, 2005.

1.3.4. IDH1/IDH2

El gen *IDH1* es localitza en el cromosoma 2q33 i codifica per a la proteïna IDH1 (isocitrat deshidrogenasa 1) la qual catalitza la reacció de carboxilació oxidativa en el pas s'isocitrat a α -cetoglutarat donant com a resultat la producció de NADPH en el cicle de Krebs. Aquesta proteïna forma homodímers asimètrics i intervé en el control cel·lular produït a través de dany oxidatiu (Parson DW, 2008). L'IDH1 és la major font de producció de NADPH citosòlic necessari per a la regeneració del glutatió reduït el qual actua com el principal antioxidant en cèl·lules de mamífer (Ducray F, 2009). Les formes mutades de *IDH1* ocasionen que els nivells de α -cetoglutarat siguin baixos provocant un increment en els nivells del factor de transcripció HIF- α (factor induïble per hipòxia) el qual facilita el creixent tumoral (Ohgaki H, 2009).

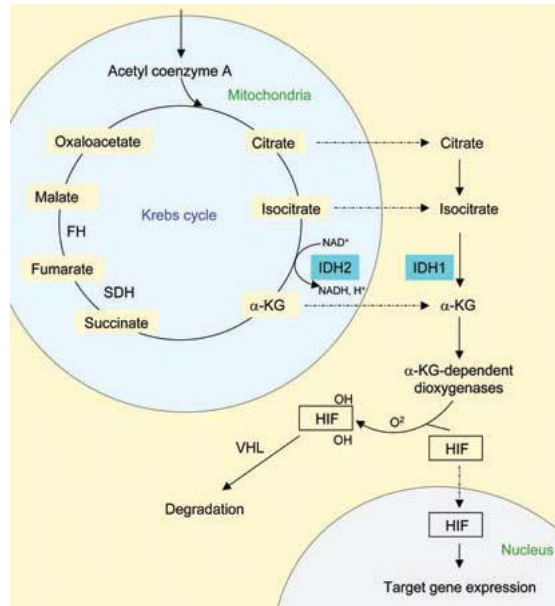


Figura 13. Via de senyalització implicada en la patogènesis del glioblastoma. Ohgaki H,2009.

En gliomes les mutacions de *IDH1* són molt freqüents, i s'observen en més del 80% dels casos, a excepció del astrocitomes pilocítics i dels GBM primaris a on la taxa de mutació es <5%. *IDH1* es troba preferentment mutat en pacients joves, amb una mitjana d'edat de 33 anys. La majoria del astrocitomes de baix grau (>60%) tenen mutacions en *TP53* juntament amb mutacions a *IDH1* (Ohgaki H,2009). En l'estudi realitzat per Parson i col·laboradors, els pacients amb GBM que presentaven mutacions a *IDH1* tenien una mitjana de supervivència de 3.8 anys en comparació amb els pacients amb la forma no mutada amb una supervivència mitjana de 1.1 anys (Parson DW,2008) Figura 14.

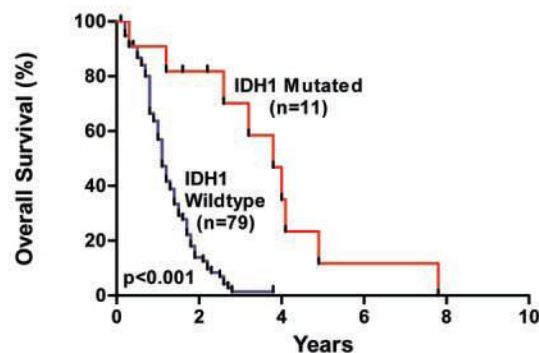


Figura 14. Supervivència d'acord amb l'estat de IDH1 en glioblastomes. Modificat de Parson W, 2008.

1.3.5. MGMT

MGMT (O6-metilguanina-DNA-metiltransferasa) és una proteïna ubiqua encarregada de reparar danys ocasionats en el DNA. MGMT es troba altament conservada evolutivament. Aquest enzim reverteix la metilació en posició O⁶ de la guanina mitjançant una transferència d'aquest grup alquil al seu centre actiu. La falta d'aquest enzim provoca una acumulació de guanines metilades en el DNA que tindrà com a conseqüència un aparellament incorrecte amb la timidina, donant lloc a *mismatch repair* que induirà l'activació de gens reguladors de la reparació al dany cel·lular i, si la lesió és irreversible, s'activaran mecanismes que ocasionaran la mort cel·lular.

El gen *MGMT* es localitza al cromosoma 10q26q. El seu promotor conté 96 illes CpG localitzades a la regió 5' de *MGMT*, les quals en teixits normals no es troben metilades (Weller M,2010). MGMT antagonitza els efectes genotòxics d'agents alquilants, pel que se l'ha associat amb una resistència del tumor a aquests tractaments. Una molècula de MGMT pot reparar únicament un adducte alquil. Per tant, la capacitat de la cèl·lula d'eliminar els grups O6-metilguanina formats dependrà del nombre de enzims disponibles i de la taxa de resíntesis de MGMT. Les molècules de MGMT inactives, perquè contenen al seu centre actiu un grup alquil, s'ubiquitinitzen i es degraden via proteasoma (Kaina B, 2007). En teixits neoplàstics, la manca d'expressió de MGMT rarament és conseqüència d'una mutació puntual, una deleció o el reordenament gènic, sent la hipermetilació de les illes CpG del promotor les que ocasionen el silenciament del gen (Esteller M,1999). La metilació en gliomes de baix grau i gliomes anaplàstics es produeix en un rang del 60-90%. L'incidència de metilació en GBM és del 40-50% (Ducray F,2009). L'estudi portat a terme per Hegi i col·laboradors va concloure que els pacients amb metilació del promotor de *MGMT* tenen una millor pronòstic i responen més a la temozolomida que aquells que no el tenen metilat (Figura 15) (Hegi ME,2009).

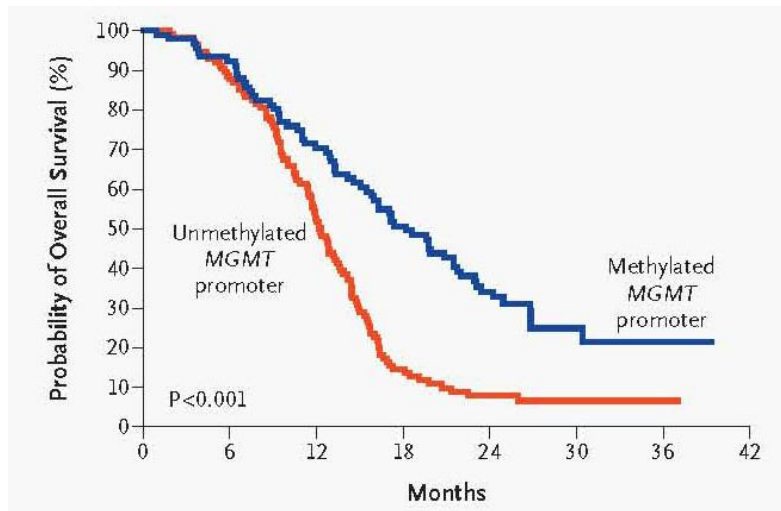


Figura 15. Probabilitat de supervivència segons l'estat del promotor de MGMT. Modificat de Hegi ME,2009.

1.3.6. Pèrdua d'heterozigositat

La pèrdua d'un fragment o el cromosoma sencer és un fet comú en molts tipus de càncers inclòs el GBM. Amb freqüències que comprenen entre el 60 i el 80%, la pèrdua de heterozigositat en la regió cromosòmica 10q, és l'alteració gènica més freqüent tant en GBMs primaris com secundaris, sent la deleció 10q25-qter la més comú. Pel contrari, la pèrdua de 10p és exclusiva de GBMs primaris al igual que la pèrdua del cromosoma sencer (Ohgaki H,2007). En GBM sembla ser que almenys 3 locis de gens supressors de tumors es localitzen al cromosoma 10 en les posicions: 10p14-ter, 10q23-24 (PTEN) i 10q25-qter. Els gens supressors de tumors situats a 10p tenen un paper important en el desenvolupament del GMB primari però no en el GBM secundari (Fujisawa H,2000)

La pèrdua de 13q, es detecta en el 12% del GMB primaris i en el 38% dels secundaris. Aquesta pèrdua inclou el locus del gen *RB1*. A més, la pèrdua de 22q és també freqüent en GBMs primaris en un 41% dels casos i s'observa en un 82% de GBMs secundaris (Ohgaki H,2009).

1.3.7. Pèrdua de 1p i 19q

La codeleció 1p/19q és la conseqüència d'una translocació no balancejada que té lloc entre el braç llarg del cromosoma 19 i el braç curt del cromosoma 1 [t(1;19)(q10;p10)]. A nivell genòmic, aquesta translocació representa la pèrdua completa dels braços 1p i 19q i la formació

d'un gen derivatiu 1q-19p, mentre que el gen derivatiu 1p-19q es perd (Riemenschneider MJ, 2010; Jeuken JW, 2010). D'acord amb d'hipòtesi de Knudson, les delecions en 1p i 19q és probable que contenguin gens supressors de tumors que s' inactiven i la pèrdua coordinada d'aquest dos fragments suggereix que els dos gens es troben involucrats a la mateixa via (Sanson M,2004).

Cairncross i col·laboradors van documentar que els oligodendrogliomes amb pèrdua del braç curt del cromosoma 1 (1p) responien millor al tractament amb agents quimioteràpics (Cairncross JC,1998). A més, pacients amb codelecions de 1p i 19q son més sensibles al tractament amb quimioteràpia (procarbazina, CCNU i vincristina) a més de tenir un temps de supervivència major. La pèrdua de 1p/19q és útil com a marcador de vulnerabilitat del tumor, així com un factor de bon pronòstic associat a la resposta a la quimioteràpia (Ohgaki H,2009)

La freqüència de codeleció en el oligodendrogliomes de grau II es troba al voltant del 80-90%, mentre que en oligodendrogliomes de grau III es del 50-70%. El gens que es localitzen en aquesta regió romanen encara desconeguts, el que si s'ha observat són correlacions amb altres alteracions molecular. Per exemple, tumors amb codeleció 1p/19q acostumen a tenir també mutacions en el gens IDH1 i IDH2 (Ducray F,2009). Finalment, es important destacar que les delecions aïllades de 1p són infreqüents en gliomes i s'associen a mal pronòstic (Ohgaki H, 2009).

En GBMs les codelecions 1p/19q són infreqüents. La pèrdua en 1p en GBMs primaris és del 12%, mentre que en GBMs secundaris és del 15%, però associat amb una major supervivència del pacient. La pèrdua en 19q (la deleció més comú és 19q13.3) s'ha trobat que es més freqüent en GBMs secundaris (54%), que en GBMs primaris (6%) (Ohgaki H,2009).

2. Tractament dels pacients amb glioblastoma multiforme

El tractament dels pacients amb gliomes d'alt grau és un desafiament per a la teràpia moderna degut a que malgrat els avanços sorgits tant en la biologia molecular com en les tècniques terapèutiques, el pronòstic d'aquestos pacients continua sent dolent. La capacitat d'aquestos tumors per infiltrar les àrees cerebrals adjacents al tumor i fins hi tot migrar a àrees més allunyades, fa que els GBMs recidivin després de la cirurgia i el tractament amb radio/quimioteràpia. El tractament estàndard actual dels GBMs inclou cirurgia lo més amplia possible, seguida de radioteràpia i quimioteràpia concomitant i adjuvant amb temozolomida.

2.1. Cirurgia

La cirurgia en els GBMs ha d'intentar ser el màxim d'extensa possible, encara que degut al comportament infiltrant d'aquests tumors, l'exèresi complerta és microcòpicament impossible. No obstant, sempre que és possible cal intentar una exèresi macroscòpica complerta, intentant evitar pèrdues de funció neurològica (Lacroix M,2001), ja que estudis recents han demostrat que aquells pacients als que s'ha pogut extirpar el 98% o més del volum tumoral tenen una major taxa de supervivència amb una mitjana de 13 mesos en comparació als 8.8 mesos que s'observa en pacients amb una resecció inferior al 98% (Adamson C, 2009, Kanu OO, 2009). Per als tumors localitzats en àrees eloqüents o crítiques que poden tenir una elevada morbiditat pel pacient, s'ha d'intentar reseccions parcials lo més amples possibles amb tècniques quirúrgiques específiques per a preservar les àrees eloqüents. En els casos en que no és possible l'abordatge quirúrgic és recomanable la realització de biòpsies esterotàxiques amb l'objectiu de poder fer el diagnòstic histològic (Van Meir EG,2010).

2.2. Radioteràpia

A més de la cirurgia, la radioteràpia forma part també del tractament estàndard dels GBMs. La seva eficàcia es va demostrar entre els anys 1960s-1970s, on es va observar que duplicava la supervivència de la cirurgia sola de 4-6 mesos fins als 10-11 mesos (Adamson C,2009). La radioteràpia actua ocasionant trencaments a les cadenes del DNA d'una forma directa o bé indirecta, el que provoca alteracions estructurals que tenen com a conseqüència final la mort cel·lular.

Els acceleradors lineals són els aparells encarregats d'administrar al pacient la dosi de radiació establerta (Figura 16). Els acceleradors lineals funcionen produint i accelerant electrons que es generen en un filament per efecte tèrmic al que se li aplica una diferència de potencial que accelera els electrons. Quan als electrons se'ls fa xocar contra una placa de tungstè es generen fotons, i aquests fotons es fan servir per al tractament de tumors amb una localització més profunda, degut a que el fotó té més capacitat de penetrabilitat. Pel contrari, els electrons s'utilitzen pel tractament de tumors superficials.

Els pacients amb GBM reben 60 Gy en la zona on es localitza el tumor (radioteràpia focal), administrats en 30 fraccions de 2Gy x 5 dies /setmana durant 6 setmanes.

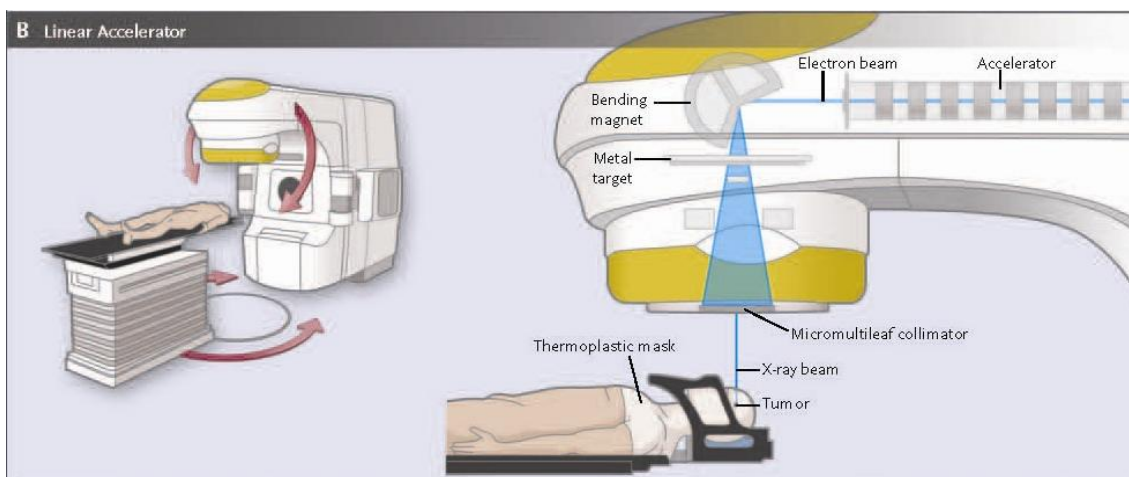


Figura 16. Accelerador lineal per el tractament amb radioteràpia. Modificat de Suh JH, 2010.

2.2.1 Mecanisme d'acció de la RDT: inducció de trencaments de doble cadena (DSB)

La radiació ionitzant produeix trencaments en les cadenes del DNA, anomenades trencaments de doble cadena (Double Strand Breaks, DSB) tant d'una manera directa com indirecta via producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Les DSB són lesions crítiques que generen talls desiguals al DNA que requereixen d'una maquinaria de reparació per eliminar-les. Una manca de reparació de DSB o una reparació inadequada pot desencadenar un gran ventall d'alteracions genètiques entre les que s'inclouen delecions, pèrdua d'heterozigositat, translocacions o pèrdues cromosòmiques. Si les lesions són massa importants per ser reparades es desencadena un procés d'apoptosi per a prevenir la propagació de les alteracions genètiques a les cèl·lules filles (Shrivastav M,2008).

2.2.1.1 Senyalització de les DSB.

Molts factors es troben involucrats en la senyalització i reparació de les DSB que s'acumulen en dominis cel·lulars anomenats focus. La forma en que la cèl·lula reconeix les DSB és encara incerta i existeixen diverses teories. Una d'elles postula que les DSB generen canvis estructurals en la cromatina les quals són suficients per a l'activació de la proteïna *ataxia telangiectasia mutated*, ATM. Una altra teoria postula que el primer complex que reconeix la lesió es MRN (format per les proteïnes Mre11, Rad50 i Nbs1) al qual s'uneix a les DSB i permet el reclutament i activació d'ATM. Per tant l'activació d'ATM en cèl·lules de mamífers després

de DSB és un fenomen constant i aquesta té lloc entre 30 segons i 5 minuts després del trencament, trobant-se totalment activa als 15 minuts i decaient la seva activitat al voltant de les 4-8 hores (Riches LC, 2008).

Quan es produeix una lesió en el DNA la cèl·lula requereix d'un temps per a poder-la reparar. Per això, es imprescindible que la cèl·lula deixi temporalment de proliferar, pel que el dany al DNA s'acompanya d'una parada del cycle cel·lular. Al llarg del cycle cel·lular hi ha diversos punts de control (*checkpoints*) que s'activen davant dany del DNA (punts de control del dany del DNA) i que tenen com a funció no tan sols aturar la progressió del cycle cel·lular sinó també activar la inducció de gens de reparació del DNA i d'inducció d'apoptosi.

2.2.1.2 Regulació del punt de control de la fase G1/S

Entre les fase G1 i S del cycle cel·lular, el punt de control s'activa en presència de dany al DNA evitant l'entrada a la fase S i impedit el inici de la replicació del DNA. Aquest punt de control està senyalitzat a través de la via ATM-p53-p21-Cdk2. Després de la inducció de dany al DNA tipus DSB, el complex MRE11/Rad50/NBS1 es reclutat als llocs amb dany i s'activa ATM, la qual fosforila diferents molècules diana com p53, Chk2 i MDM2. Aquestes fosforilacions permeten l'activació de dos vies de senyal: una que inicia i l'altre que manté l'aturada en G1/S. La reacció que inicia l'aturada de la fase G1/S és l'activació de Chk2 per ATM, el que ocasiona la fosforilació Cdc25a a la Ser123 induint la seva degradació via proteasoma. La proteïna Cdc25a és una fosfatasa encarregada d'eliminar els grups fosfats inhibidors de Cdk2 en presència de DSB. La proteïna Chk1 també es capaç d'induir la fosforilació d'aquesta fosfatasa i activar la seva degradació. Per altre part, l'activació d'aquesta via de resposta ràpida d'aturada de cycle va seguida de l'activació d'una via de manteniment de la parada G1/S que té com a mediador p53. ATM fosforila p53 directament a la Ser13 o indirectament a la Ser20 a través de Chk2. La fosforilació de p53 activa i estabilitza la proteïna i, promou la dissociació del seu inhibidor MDM2. Una vegada p53 es troba activada, pot portar a terme el seu paper d'activador transcripcional de diversos gens que permetran el manteniment de la parada del cycle cel·lular en G1/S, entre els que trobem la proteïna p21, la qual exerceix un paper important en la regulació de la fase G1/S mitjançant la unió i inhibició del complex Cdk2/ciclinaE. A més, p21 també s'uneix al complex CDK4/ciclina D evitant així la fosforilació de RB i ocasionant l'alliberació del factor de transcripció E2F, el qual participa en la transcripció dels gens necessaris per a la progressió a la fase S (Sancar A,2004; Sengupta S, 2005; Cann KL,2007).

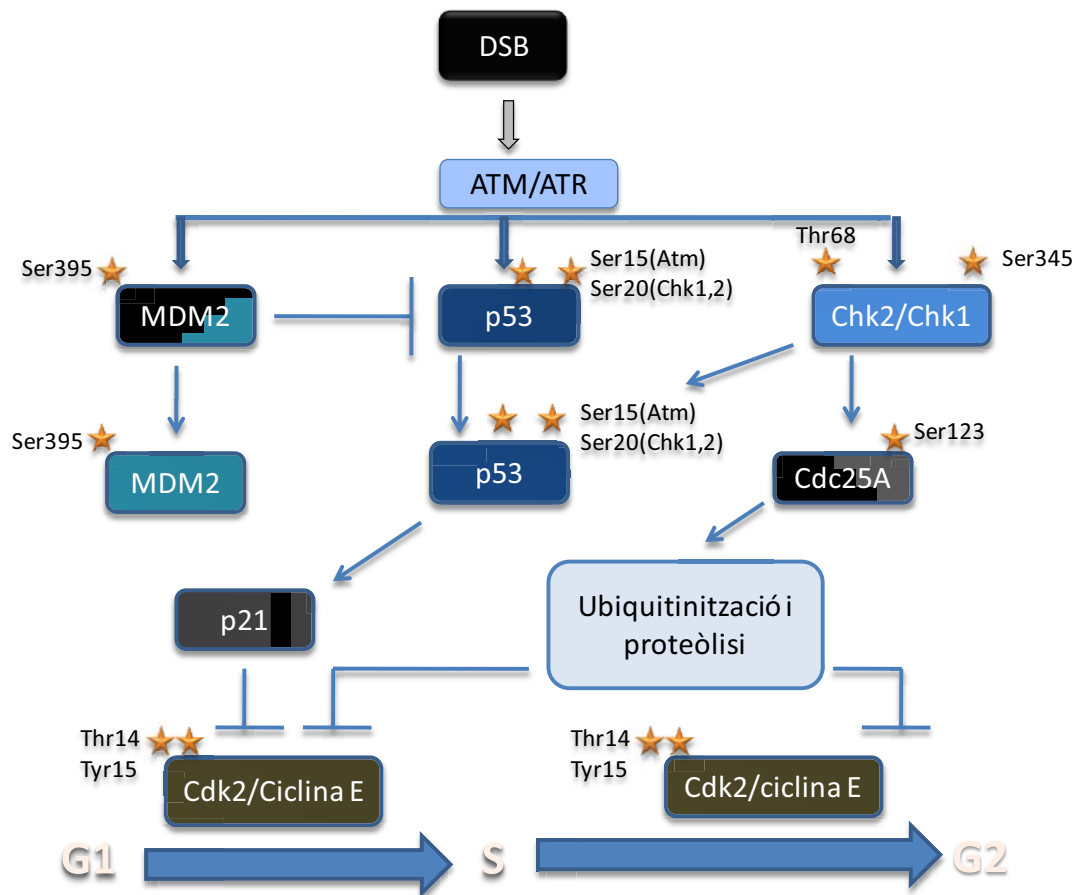


Figura 17. Regulació de la fase G1/S. Adaptat de Zhou BBS, 2004; Tanada T, 2007; Frosina G, 2009.

2.2.1.3 Regulació del punt de control de la fase G2/M

El punt de control de la fase G2/M evita que les cèl·lules inicien la mitosi en cas de dany al DNA. L'activació de ATM fosforila Chk2 i p53, estabilitzant p53. L'estabilització de p53 permet la transcripció de p21 i de 14-3-3σ i juntes poden iniciar el punt de control de G2/M, amb la inhibició de complexos Cdk/ciclina. Chk1 s'activa per via ATM-ATR just després de l'exposició a radiació ionitzant. (Zhou BBS, 2004). A més, amb l'activació de Chk1 i Chk2 també es fosforilen els membres de la família Cdc25 (Cdc25a, Cdc25b i Cdc25c), encarregats de desfosforilar i activar Cdks (Sancar A, 2004; Sengupta S, 2005; Cann KL, 2007). Després del dany al DNA induït per radiacions ionitzants, Cdc25a es la fosfatasa efectora que manté la parada en el punt de control G2/M (Boutros R, 2007; Nakabayashi H, 2006).

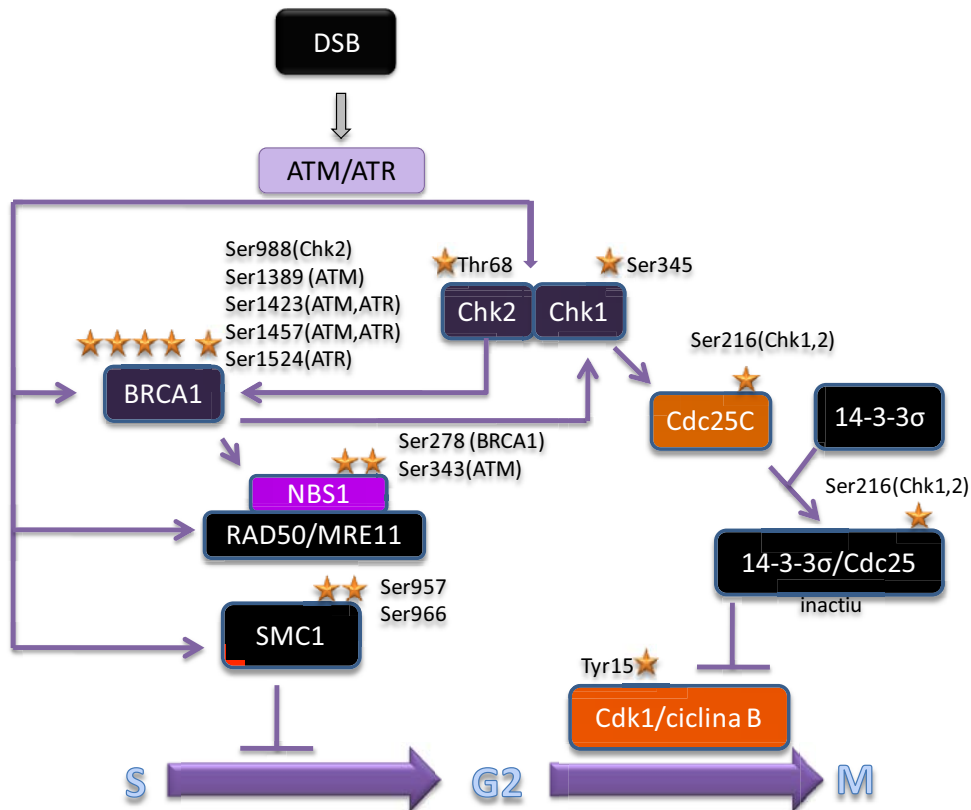


Figura 18. Regulació de la fase G1/S. Adaptat de Zhou BBS, 2004; Tanada T, 2007; Frosina G, 2009.

2.2.1.4 Activació del mecanisme d'apoptosi

En cas que les lesions en el DNA no es puguin reparar, s'inicia el procés d'apoptosi a través de la via ATM. ATM activa p53 directament i indirectament via Chk2, i p53 pot induir la transcripció de proteïnes proapoptòtiques com NOXA, PUMA o Bid, les quals actuen com a inhibidors de BCL-2 i BCL-xL. La proteïna p53 també activa la transcripció de Bax, el qual participa en la formació del porus mitocondrial que permetrà la sortida de citocrom c i l'activació de la via intrínseca. (Cann KL,2007).

2.2.1.5 Fosforilació de la histona H2AX

Una de les primeres respostes que s'iniciïn després del dany de DNA induït per radiacions ionitzants és la fosforilació de la histona H2AX, un dels subtipus de histones H2A que es troben a cèl·lules eucariotes. La histona H2AX és un membre de la família H2A, una de les 5 famílies d'histones que empaqueten i organitzen la cromatina. La subunitat bàsica de la cromatina és el nucleosoma format per 2 proteïnes H2A, 2 proteïnes H2B, 2

b Nucleosome with H2AX tail

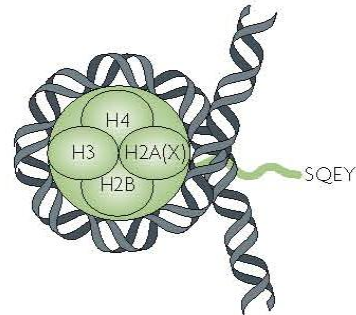


Figura 19. Estructura del nucleosoma. Adaptat de Bonner WM,2008.

proteïnes H3 i 2 proteïnes H4, a més de la histona H1, la qual fa de pont d'unió entre nucleosomes (Figura 19). Cada nucleosoma conté proteïnes H2A, de les quals entre un 2-25% són H2AX dependent del tipus cel·lular i teixit analitzat. (Bonner WM,2008; Van Attikun H,2009)

La histona H2AX posseeix una petita cua a l'extrem c-terminal que la fa diferent de les altres isoformes, i un residu serina localitzat a 4 aminoàcids del extrem COOH que la fa única, el qual ràpidament es fosforila en resposta al dany al DNA induït per radiacions ionitzants, (Fernández-Capetillo O,2004). La fosforilació a la Ser139 del domini carboxi-terminal té lloc entre 1 i 3 minuts després de la lesió del DNA, arribant al màxim als 30 minuts. El nombre de molècules de H2AX fosforilades creix linealment amb la gravetat de la lesió (Paull TT, 2000; Kinner A,2008). La forma modificada mitjançant fosforilació es anomenada YH2AX. En cèl·lules de mamífer aquesta fosforilació s'estén 2MB al voltant de la DSB. La fosforilació d'aquesta histona es un senyal pel reclutament o acoblament de proteïnes al lloc del trencament del DNA (Van Attikun H,2009).

2.2.1.6 Reparació de la DSB

L'elecció del sistema de reparació dependrà en gran mesura de l'estadi del cicle cel·lular en que es trobi la cèl·lula i el tipus de lesió produïda. Així, les DSB que es produeixen en les fases S i G2 són susceptibles de ser reparades mitjançant recombinació homòloga, ja que permet l'ús de la cromàtide germana intacta que servirà com a motlle de reparació. Però poc després de la progressió a la fase G2/M, aquest tipus de reparació resulta impossible ja que trobem els cromosomes condensats. És aleshores quan té lloc l'altre tipus de reparació anomenada reparació per unió d'extremes no homòlegs (NHEJ) (Branzei D, 2008).

2.2.1.6.1 Mecanisme de reparació per unió d'extremes no homòlegs (NHEJ- Non Homologous End Joining)

La NHEJ és la via de reparació predominant que actua sobre les fases G1 i S primerenca. El mecanisme de NHEJ s'inicia amb la unió de les subunitats reguladores de la DNA-PK, Ku70 i Ku80 que conformen un heterodímer, a cada costat dels trencaments en la molècula de DNA. Es creu que aquesta unió al DNA provoca un canvi conformacional en la regió c-terminal de les dues Ku el qual facilita l'entrada de la subunitat catalítica DNA-PKcs i altres proteïnes. La funció de la subunitat catalítica és la de capturar els dos extrems del DNA i ajuntar-los. Posteriorment la lligasa IV/XRCC4 uneix les dues cadenes. La última part del procés acostuma a provocar deletions o petites adicions de nucleòtids (Weterings E,2008; Mahaney BL,2009).

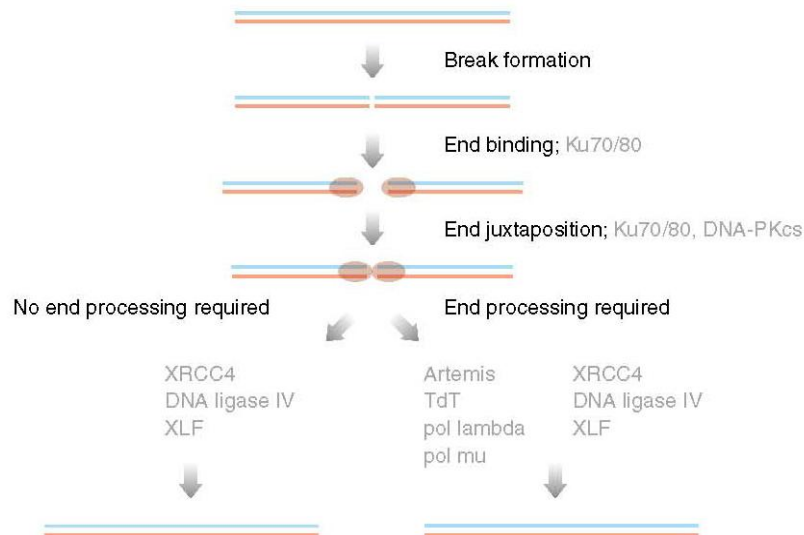


Figura 20. Representació del procés de reparació mitjançant el mecanisme de unió d'extremes no homòlegs. Modificat de Wyman C, 2006.

2.2.1.6.2 Mecanisme de reparació per recombinació homòloga

La recombinació homòloga s'ajuda de la cromàtide germana com a motlle per a la reparació. Aquest procés es porta a terme en la fase S tardana i inici de G2 quan els cromosomes no es troben compactats i la cromàtide germana poc actuar com a cadena motlle.

La DSB activa la proteïna ATM el que ocasiona l'activació d'un grup de proteïnes amb activitat exonucleasa les quals eliminen nucleòtids del trencament a l'extrem 3' i 5' de les dues cadenes trencades, produint una cua 3'. En aquest procés participen les proteïnes BRC1 i BRC2, i el complex MRN (MRE11/Rad50 i NBS1). A més, la proteïna Rad51 es reclutada i activada per membres de la família PIKK3 polimeritzant als extrems 3' de cadena simple generats, creant un filament nucleoproteic el qual s'encarregarà de buscar la zona d'homologia de la cromàtide germana. Posteriorment envairà el DNA de doble cadena per formar una molècula unida en la qual l'extrem 3' de la cadena simple sempre

estirà aparellat per les seves bases a la cadena complementaria sobre la cadena de DNA homòloga.

En el següent pas, la DNA polimerasa sintetitzarà el nou DNA a l'extrem 3' reparat utilitzant com a motlle les seqüències complementaries en el segment de DNA homòleg no malmès.

A continuació l'extrem 3' reparat s'aparellarà amb el extrem 3' de la cadena simple de l'altre extrem malmès i finalment l'espai es reomplert per la DNA polimerasa i la lligasa, la qual unirà els extrems (Lord CJ,2006; Lodish H, 2005).

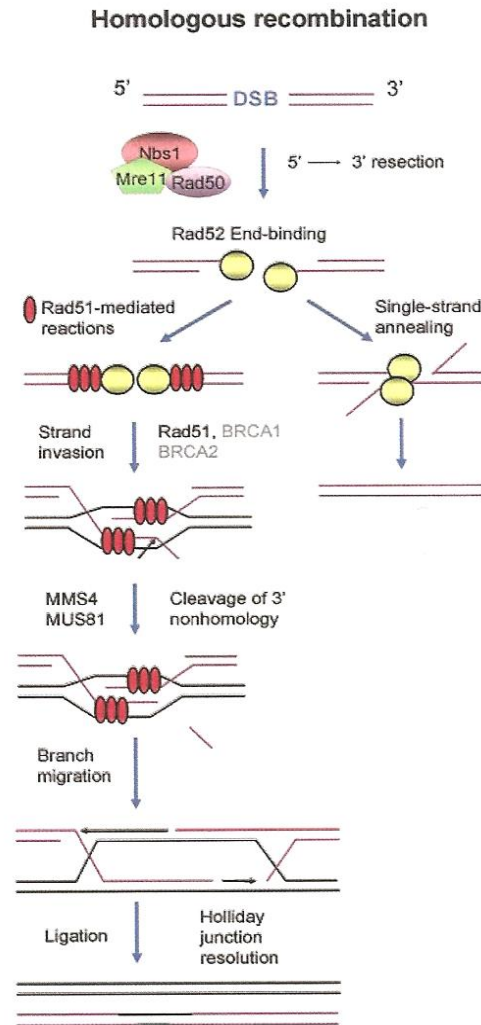


Figura 21. Representació del procés de reparació mitjançant el mecanisme de recombinació homòloga . Modificat de Sancar A,2004

2.3. Quimioteràpia

Tal com s'ha comentat, el tractament estàndard dels GBMs també inclou quimioteràpia amb temozolomida. La temozolomida és un agent alquilant que s'administra via oral gràcies a que la seva absorció és molt bona. Aquest fàrmac va ser inicialment desenvolupat per al tractament de les metàstasis cerebrals de melanoma maligne (Dresseman G, 2010). La temozolomida (TMZ) va ser aprovada per la FDA a l'any 1999 per al tractament dels astrocitomes anaplàstics recurrents i a l'any 2005 es va ampliar el seu us al tractament adjuvant dels GBMs en primera línia (Mrugala MM, 2008).

El volum mitjà de distribució de la temozolomida es de 17 l/m^2 , i la vida mitjana de 1,8 hores (Barker SD,1999). El transport del fàrmac inclou el pas de la barrera hematoencefàlica (BHE), a més del transport a cèl·lules peritumorals i tumorals (Villano JL, 2009). Després de la seva absorció, la TMZ és hidrolitzada a pH fisiològic a metil-triazè-imidazol-carboxamida (MTIC). Aquesta conversió de TMZ a MTIC té lloc de forma espontània i el MTIC ràpidament es converteix a 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC), una forma inactiva, i a metildiazol una forma activa alquilant que transfereix un grup metil a la cadena de DNA (Villano JL, 2009).

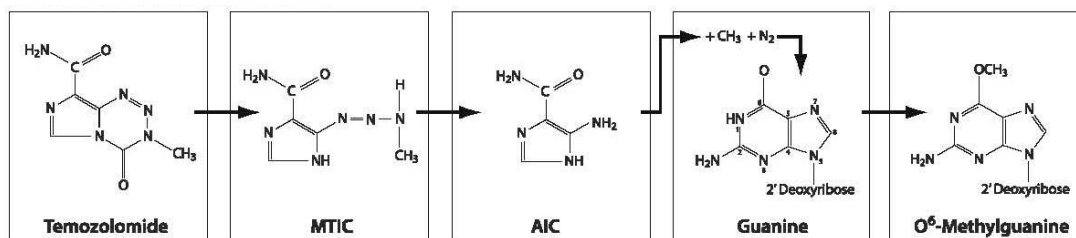


Figura 22. Conversió química a pH fisiològic de la Temozolomida. Modificat de Villano JL,2009.

La alquilació de la guanina en posició O^6 és un esdeveniment que només es produeix amb una freqüència del 5%, encara que és el responsable primari dels efectes citotòxics de la TMZ. Normalment la majoria dels adductes que es formen al DNA es produeixen en posició N^3 de l'adenina i en posició N^7 de la guanina. Les lesions produïdes en la posició O^6 de la guanina són les causants de les DSB i per tant de la inducció del dany al DNA que es pot traduir en apoptosi i autofàgia (Roos WP, 2007, Kanzawa T,2004).

Les lesions produïdes en la posició O^6 de la guanina poden ser revertides per l'enzim reparador del DNA MGMT (veure apartat 1.3.5 de la Introducció), de tal manera que nivells

elevats d'aquest enzim confereixen resistència al tractament amb TMZ. Cada molècula de MGMT sols pot reparar un adducte alquil, fet que condiciona que la reparació del DNA ocasioni la inactivació irreversible de MGMT, per la qual cosa serà necessari sintetitzar-la *de novo* per a reparar nous adductes. La restauració de la activitat de MGMT es un procés que té lloc en qüestió d'hores (Villano JL, 2009).

A més del seu efecte directe sobre el DNA, diversos grups han demostrat que el tractament amb TMZ produeix també una parada de cicle cel·lular en G2/M (Hirose Y,2001).

La TMZ incrementa les taxes de supervivència en pacients amb GBM quan es combina amb radioteràpia. La combinació de radioteràpia i TMZ incrementa la supervivència en comparació a la radioteràpia sola, augmentant la mitjana de supervivència de 12.1 fins a 14.6 mesos. La supervivència als 2 anys en pacients que reben radioteràpia i TMZ és superior que en pacients que només reben la radioteràpia, sent les taxes de supervivència als 2 anys del 26.5% i del 10.4%, respectivament (Stupp R,2005).

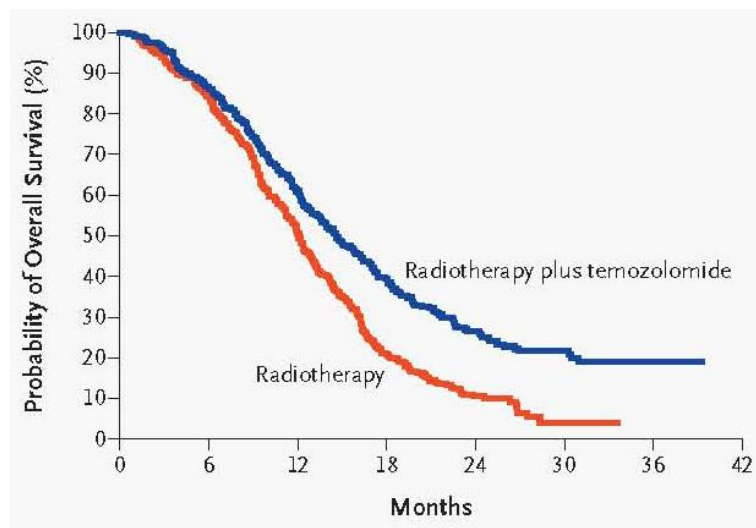


Figura 23. Corba de supervivència estimada d'acord amb el tractament amb radioteràpia o en combinació amb temozolomida. Modificat de Stupp R,2005.

Kil i col·laboradors va demostrar que la TMZ té també un efecte radiosensibilitzador tan *in vitro* com *in vivo* com a conseqüència d'una inhibició en la reparació del DNA el que desencadena una catàstrofe mitòtica (Kil WJ,2008).

2. 4. Resistència al tractament

La biologia cel·lular i molecular dels gliomes és complexa i caracteritzada per un fenotip agressiu i invasiu que confereix resistència als tractaments actuals. La resistència al tractament pot ser intrínseca del propi tumor o bé pot ser adquirida en el decurs de la malaltia com a conseqüència de la selecció que exerceixen els tractaments antineoplàstics. Diversos mecanismes participen en la resistència dels GBMs als diferents tractaments, entre els que s'inclouen:

- Alteració del transport del fàrmac
- Disminució de la retenció cel·lular del fàrmac
- Eficiència i capacitat de reparació del DNA
- Pèrdua de la capacitat d'activació del mecanisme d'apoptosi
- Presència de *glioma stem cells* o cèl·lules iniciadores de tumors (TIC).

2.4.1 Alteració del transport i disminució de la retenció cel·lular dels fàrmacs en GBMs

La barrera hematoencefàlica (BHE) és un mecanisme selectiu que s'oposa al pas de la majoria dels composts de molècules grans de la sang al líquid cefaloraquídi i al teixit cerebral, permetent el pas selectiu de substàncies com la glucosa, ions, O₂, i molècules lipofíliques de baix pes molecular. La BHE representa un dels factors responsables que molts tractaments amb quimioteràpia siguin poc efectius en gliomes. Està composta per cèl·lules endotelials que es troben rodejades per pericits, extrems neuronals i d'astròcits. En els tumors aquesta barrera pot trobar-se alterada (Dauchy S,2008).

Malgrat que molts fàrmacs antineoplàstics compleixen els requisits per poder travessar la BHE, el pas al seu través és limitat. Això pot explicar-se, en part, per l'expressió de proteïnes de la família de transportadors ABC, anomenats així perquè es caracteritzen per uns dominis d'unió a ATP altament conservats, o caixes d'unió a ATP (ATP-binding cassetes). Aquestes proteïnes contribueixen en gran mesura a la adquisició d'un fenotip resistent mitjançant l'extrusió de molècules de les cèl·lules endotelials fins a la circulació, donant lloc a la disminució de la concentració intracel·lular del fàrmac (Cooper GM,2002). Un altre explicació per la baixa eficiència de transport és el fet que sovint la cèl·lula tumoral mostra sobreexpressió d'aquestes proteïnes a la membrana.

Les proteïnes ABC utilitzen l'energia derivada de l' hidròlisi de l'ATP per transportar els diversos fàrmacs del citosol fins al medi extracel·lular. Entre els membres d'aquesta família ABC trobem la P-glycoprotein (Pgp), i membres de la família de proteïnes MDR (Multidrug resistance-associated), on el membre més ben estudiat és MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein 1). La gran majoria d'aquestes proteïnes s'ha observat que es troben altament expressades en gliomes. (Lu C,2008).

La proteïna MRP1 pot ser la causant de l'adquisició d'un fenotip resistent en gliomes ja que es troba altament expressada. En astròcits normals els nivells d'aquesta proteïna també són elevats, però difereixen en la localització en relació a les cèl·lules tumorals. Mentre que l'expressió en astròcits es troba restringida a certes àrees, en les cèl·lules dels gliomes la localització és al voltant de tota la membrana plasmàtica.(Spiegel-Kreinecker S,2002).

2.4.2 Eficiència i capacitat de reparació del DNA i pèrdua de la capacitat d'activació de l'apoptosi en gliomes

Una altre de les possibles causes de resistència al tractament està relacionada amb la reparació de les lesions produïdes al DNA durant el tractament. Molts estudis han indicat que l'enzim MGMT (veure apartat 1.3.5 de la Introducció) pot ser un factor de resistència a la quimioteràpia amb agents alquilants. Diversos estudis posen de manifest que la metilació del promotor d'aquest gen i el tractament amb TMZ són beneficiosos pel pacient (Hegi ME,2009).

Un altre de les proteïnes involucrades en el mecanisme de resistència al tractament per disminució de la capacitat de reparació del DNA es el receptor de l'EGFR (figura 24). Aquest receptor es troba sobreexpressat en GBM, en algunes ocasions com a conseqüència d'amplificació del mateix i també per mutacions activadores com EGFRvIII (deleció que compren de l'exó 2 fins al 7 mancant-li el domini de regulació). Diversos estudis posen de manifest les propietats resistents que la presència de EGFRvIII confereix al tumor, ja que l'EGFRvIII fa augmentar la supervivència cel·lular després del tractament amb radioteràpia. Aquest receptor incrementa la hiperactivació de proteïnes implicades al procés de reparació com la DNA-PKcs (Mukjerjee B,2009), i a més estimula l'activació de la recombinació homòloga i la NHEJ (Golding SE,2009). Aquest receptor té la capacitat de translocar-se al nucli, on interaccionarà i estimularà la activitat quinasa de la DNA-PKsc (Hatanpaa KJ,2010). A més, tan el receptor del EGFR en la seva forma salvatge com el EGFRvIII són capaços de unir-se a la

proteïna PUMA, implicada en l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi. Això fa que PUMA quedi segrestada al citoplasma, i no pugui translocar-se al mitocondri (Zhu H,2010).

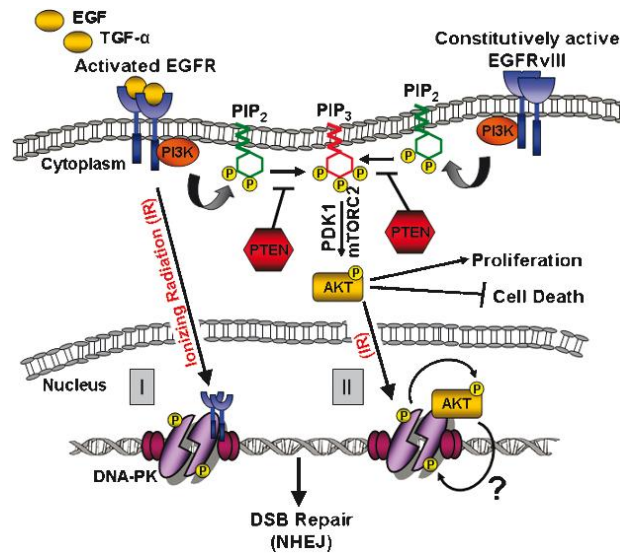


Figura 24. Senyalització de l'EGFR i translocació al nucli per estimular la reparació a través del mecanisme d'unió d'extremes no homòlegs. Hatanpaa KJ, 2010.

La proteïna ATM regula la reparació de les DSB produïdes a través del control al cicle cel·lular, i la seva absència comporta un increment en la radiosensibilització cel·lular. A més, sembla que ATM pot interaccionar amb vies de senyalització activades per factors de creixement (PI3K-AKT/RAS-RAF-MEK-ERK) (Golding SE,2009). Així mateix, s'ha observat en un model de glioma en ratolí, que la pèrdua de components de la maquinaria de reparació ATM/CHK2/p53 accelera la formació tumoral. A més, la proteïna Chk2 és important per a la sensibilització de la cèl·lula front a la radioteràpia (Squatrito M,2010).

El membre de la família de les IAPs, Survivina està implicat en la resistència a la radioteràpia, possiblement en relació a un augment de la reparació (Chakravarti A,2004).

2.4.3 *Glioma stem cells* o cèl·lules iniciadores de tumors (TIC)

Les característiques biològiques de les cèl·lules de glioblastoma, així com la resistència a quimioteràpia i radioteràpia, la seva naturalesa invasiva i el comportament proliferatiu, suggereixen la presència de cèl·lules amb característiques de cèl·lules mare tumorals o cèl·lules iniciadores de tumors (TIC) entre les cèl·lules des glioblastomes. Les TIC comparteixen característiques de cèl·lules mare embrionàries, com resistència a drogues a través de l'expressió de transportadors ABC, alta capacitat per reparar el dany produït al DNA, resistència a l'apoptosi i una manca d'estat quiescent. Dins la massa tumoral s'engloben cèl·lules tumorals clonals i per altra banda TIC (Altaner C,2008; Singh SK,2004). Es coneix que les TIC depenen de les mateixes vies moleculars que les cèl·lules mare embrionàries, que sovint es reactiven durant el inici i progressió tumoral (Galli R, 2007).

Les TIC mostren a la superfície de la membrana plasmàtica una proteïna de 120 kDa, anomenada CD133, que és a la vegada un marcador per a precursors neurals normals en humans. Aquesta proteïna pot ser utilitzada com a marcador de TIC en tumors cerebrals. (Vescovi AL,2006). El grup de Bao i col·laboradors va demostrar que la supervivència en les cèl·lules CD133+ després de irradiar-les era superior que en les cèl·lules CD133- i aquesta major supervivència estava relacionada amb una menor activació de proteïnes inductores de mort cel·lular per apoptosi, com ara la caspasa 3. Aquesta baixa inducció de mort semblava ser deguda a la gran eficiència a l'hora de reparar el dany al DNA ocasionat per la radiació (Bao S, 2006).

3. Apoptosi i gliomes

L'apoptosi o mort cel·lular programada, és un procés bioquímic que es troba altament organitzat i regulat. Es tracta d' un procés actiu programat genèticament i conservat evolutivament, que resulta essencial pel desenvolupament normal d'òrgans, la remodelació de teixits, la resposta immune i la supressió tumoral. Com a exemple, durant l'embriogènesi les cèl·lules de les regions interdigitals entren en apoptosi i això ocasiona la formació de dits en mans i peus. Per tant, és un procés crucial pel manteniment de l'homeòstasi corporal. (Iannolo G,2008).

3.1 Canvis morfològics i bioquímics durant l'apoptosi

L'apoptosi es caracteritza per distints canvis a nivell cel·lular. Per una part es produeixen **canvis morfològics** que inclouen l'arrodoniment de la cèl·lula, la formació de *blebs* a la membrana plasmàtica, el desacoblament del citoesquelet, la condensació del cromatina, la reducció del volum cel·lular i nuclear i, la formació de cossos apoptòtics (Kroemer G, 2009; Korokawa M, 2009; Steinbach JP, 2004). L'eliminació del cossos apoptòtics té lloc per fagocitosis (Figura 25).

Els canvis morfològics són conseqüència de **canvis bioquímics** característics de la cèl·lula apoptòtica. En la cèl·lula apoptòtica es produeix una translocació del fosfolípid fosfatidilserina a la cara externa de la membrana cel·lular per a facilitar-ne el reconeixement per part dels macròfags i la posterior eliminació cel·lular. Per altre part, el DNA genòmic es fragmenta a través d'una exonucleasa que tallà entre els espais internucleosomals que donarà lloc a fragments de 180 parells de bases o múltiples. A més, nombrosos senyals provoquen canvis en el potencial de membrana mitocondrial i en la permeabilitat d'aquesta que dona lloc a la sortida de citocrom c al citoplasma. També s'observa una activació de proteïnes membres de la família de Bcl-2 com Bak o Bax així com la degradació de proteïnes de la família de les IAPs per via proteasomal. (Kroemer G, 2009; Hotchkiss RS, 2009; Bader M, 2009). Els canvis bioquímics s'utilitzen com a marcadors de les diferents etapes de l'apoptosi.

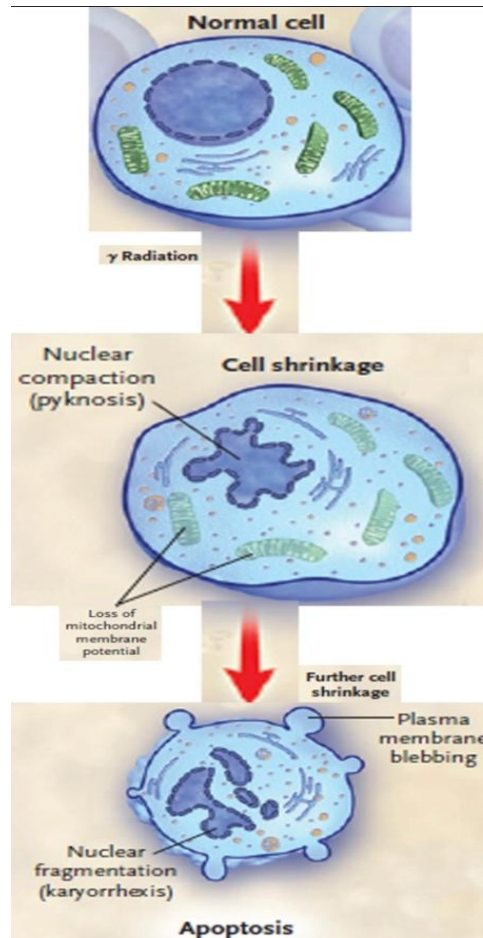


Figura 25. Canvis morfològics i bioquímics produïts durant l'apoptosi. Modificat de Hotchkiss RS, 2009.

3.2 Fases de l'apoptosi

En el procés d'apoptosi podem distingir 3 fases. En la **fase iniciadora** factors o bé fisiològics o bé estímuls externs a la cèl·lula, com la pèrdua de contacte amb l'entorn, la detecció de dany intracel·lular, o la contradicció de senyals de divisió cel·lular, poden desencadenar el procés d'apoptosi. Aquesta fase va seguida de la **fase integradora**, moment en el qual es produeix l'activació de les caspases, i el procés es torna irreversible. Per últim, la **fase executora**, en la qual apareixen els canvis morfològics i bioquímics característics de l'apoptosi (Hengartner MO, 2000).

3.3 Maquinaria efectora de l'apoptosi: les caspases

Les caspases són una família de proteases conservada evolutivament que tenen un residu de cisteïna al seu nucli catalític el qual permet el trencament d'altres proteïnes que contenen residus d'àcid aspàrtic (Fuentes-Prior P, 2004; Lamkanfi M,2007; Chowdhury I,2008). La primera proteasa membre d'aquesta família que es va identificar va ser la proteïna ICE (interleukine-1 β - converting enzyme; enzim convertidor de la interleuquina 1 β) anomenada també caspasa 1 i que és la responsable de la maduració de la pro-IL-1 β (Black RA,1989). En l'actualitat s'han descrit 11 caspases en humans i 15 membres en mamífers (Earnshaw WC,1999).

Dins de la cèl·lula totes les caspases es troben en forma inactiva com zimògens inerts o procaspases. Les procaspases són proteïnes de cadena simple que consten d'un prodomini N-terminal, anomenat també domini de mort (DD), el qual precedeix als dominis catalítics. El prodomini participa en la transducció del senyal apoptòtic servint com a plataforma de reclutament i unió de proteïnes activadores (Korokawa M,2009). El DD pot tenir dos tipus de dominis, el domini efector de mort (DED) i el domini de reclutament de caspases (CARD). Els dominis catalítics consten d'una subunitat llarga (p20) de 17-21 kDa i una curta (p10) d'una mida de 10-13 kDa, situada a la regió C-terminal (Chowdhury I,2008).

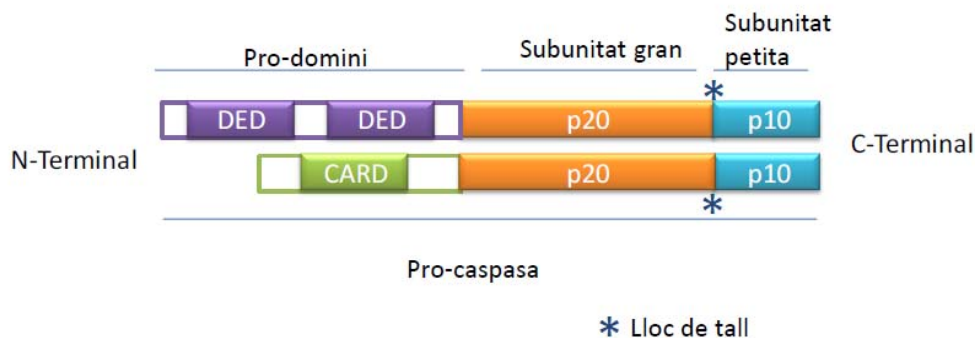


Figura 26. Representació esquemàtica dels dominis de les caspases. Modificat de Chowdhury I,2008.

En els vertebrats, les caspases es poden classificar segons la seva funcionalitat, la qual està relacionada amb la seva estructura, en: caspases iniciadores (caspases 2, 8, 9 i 10), caspases efectores o executores (caspases 3, 6 i 7) i caspases inflamatòries (caspases 1, 4, 5 i 12).

1. **Caspases iniciadores: activació per dimerització.** Són les primeres en activar-se després de l'estímul apoptòtic. Normalment es troben en forma de monòmers inerts els quals requereixen de l'homodimerització per la seva activació. La dimerització està facilitada per la presència a l'extrem N-terminal de les caspases iniciadores d'unes plataformes o dominis que faciliten la interacció a altres proteïnes relacionades amb la senyalització de la cascada apoptòtica: domini CARD a les caspases 2 i 9 i domini DED a les caspases 8 i 10. En tots dos casos, aquests dominis interaccionen amb adaptadors que condueixen a l'activació de les caspases iniciadores per mecanisme de proximitat o per auto processament (Pop C, 2009; Bao Q, 2007).
2. **Caspases executores: activació per ruptura:** Les caspases executores es troben en forma de dímers inactius que disposen d'un petit prodomini que necessita ser tallat perquè la caspasa esdevingui activa. El processament proteolític permet el reordenament dels loops afavorint la formació del lloc catalític. Són les responsables de la majoria de proteòlisi de la fase executora de l'apoptosi (Pop C, 2009).
3. **Caspases inflammatòries:** la majoria d'elles s'activen per mecanismes de dimerització i no estan implicades en l'apoptosi.

3.4 Vies de regulació de les caspases: IAPs

La família de les IAP (inhibitor of apoptosis proteins) està formada per un grup de proteïnes inhibidores fisiològiques de les caspases que actuen com a guardaespalles cel·lular de l'apoptosi. Les IAP es van descobrir per primera vegada com a proteïnes de baculovirus capaces d'inhibir el procés d'apoptosi en cèl·lules d'insectes infectades per aquest patogen (Crook NE, 1993) i posteriorment es varen descriure homòlegs a invertebrats i vertebrats (Gimenez-Bonafe P, 2009).

Els membres principals d'aquesta família són XIAP, IAP1, IAP2 i Survivina. Les IAPs es caracteritzen per posseir tres motius d'unió a zinc d'uns 70 residus aproximadament anomenats *baculovirus IAP repeat* (BIR), que permeten la interacció proteïna-proteïna i serveixen per al reconeixement de motius d'unió a IAP (motius IBM) situats a la regió N-terminal de la caspasa iniciadora 9 i la caspasa efectora 7 (Altieri D, 2010). També contenen un domini a la posició C-terminal anomenat RING el qual participa en el marcatge de proteïnes per a la seva degradació per ubiquitinització, ja que actuen com a E3 ubiquitina ligases. A més,

IAP1 i IAP2 tenen també un domini CARD o domini d'interacció proteïna-proteïna el qual afavoreix el reclutament de caspases (Zangesmeister-Wittle U,2004).

A la figura 27 es mostren els membres de la família IAP en humans i els dominis més característics.

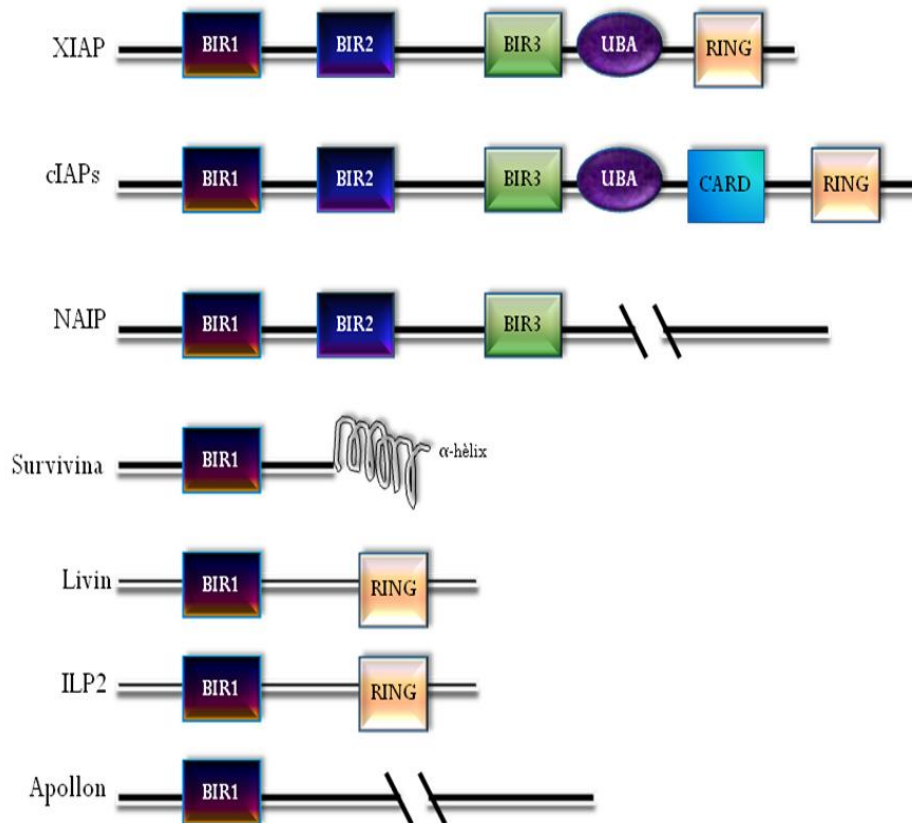


Figura 27 Diagrama esquemàtic dels dominis representatius en les IAPs. Adaptat de Altieri DC,2010 i Dubrez-Daloz L,2008.

S'han descrit proteïnes amb capacitat per a inhibir a la majoria de les IAP o antagonistes de les IAPs. Els antagonistes de les IAP es troben segrestats al mitocondri (Smac / DIABLO, o OMI/HTRA2) o al reticle endoplasmàtic (GSPT1/eRF3) i, davant d'un estímul apoptòtic, són alliberats al citosol on bloquegen l'accés de les IAP a les caspases mitjançant la unió als dominis BIR (Ziegler DS, 2009).

3.5 Vies d'activació de les caspases

Existeixen diferents mecanismes de senyalització a través dels quals es pot iniciar el mecanisme d'apoptosi: la via extrínseca i la via intrínseca.

3.5.1 Via extrínseca

L'activació de les caspases per la via extrínseca s'inicia amb la unió de lligams específics a receptors de mort (*death receptor*, DR) de la membrana cel·lular (DC95/Fas/Apo1 (CD95), TNF receptor 1(TNFR1 or DR1/CD120a), TNF receptor 2(TNFR2), TRAILR1 (DR4/APO-2), TRAIL2 (DR5/KILLER/TRICK2) i DR3-6,). Els lligams que poden unir-se als DR inclouen TNF α , Fas, i el *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). (Chowdhury, Tharakan et al. 2008). Una vegada s'ha unit el lligam al receptor, el senyal produït es transmet intracel·lularment, mitjançant l'acoblament del *death-inducing signaling complex* (DISC). L'agregació d'aquests complexos provoca canvis conformationals a les molècules que el componen i desencadenen l'activitat catalítica de la caspasa iniciadora 8 la qual promourà la cascada d'activació de les caspases efectores 3 i 7 (Figura 28) (Hotchikiss RS, 2009; Ziegler DS,2007).

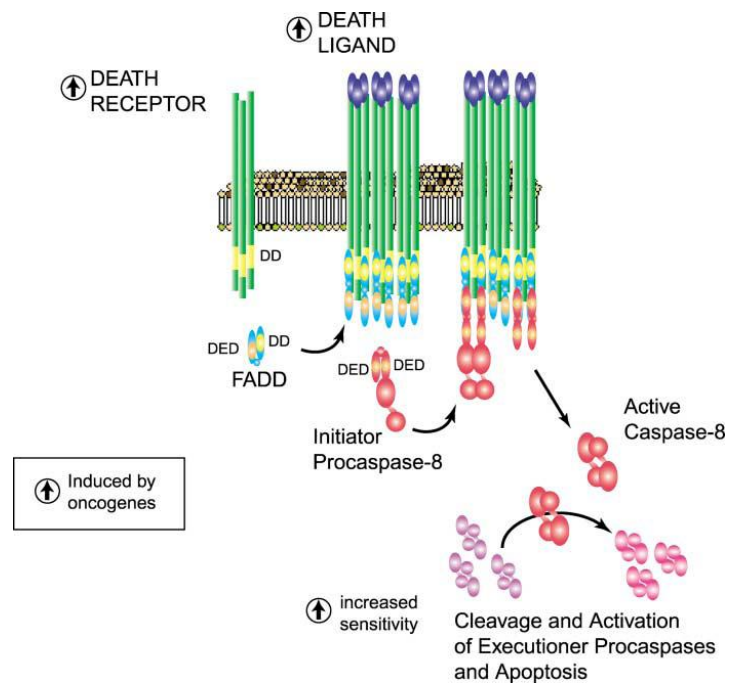


Figura 28 Green DR,2002 Activació de la via extrínseca.

3.5.2 Via intrínseca o mitocondrial

La principal via d'activació de les caspases és la via intrínseca, en la qual el mitocondri hi té un paper fonamental (Tait SW, 2010). La via intrínseca esdevé activa per múltiples estímuls externs o interns com agents citotòxics, hipòxia, radiació UV, molècules d'estrès (espècies reactives d'oxigen (ROS) i nitrogen) i factors de creixement. De forma general, la via intrínseca de l'apoptosi s'activa en resposta a estrès cel·lular. Aquests estímuls proapoptòtics modifiquen diversos components cel·lulars el qual actuen com a sensors i transmeten el senyal d'inici de mort al mitocondri. El pas crític en aquesta cascada es el procés conegut com la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (MOMP, de mitochondrial outer membrane permeabilization) que comporta la sortida de proteïnes proapoptòtiques des de l'espai intermembrana mitocondrial les quals activaran les caspases iniciadores i l'apoptosi. Degut a d'importància d'aquest pas, es troba altament regulat per una família de proteïnes anomenada BCL-2.

La membrana externa del mitocondri conté canals aniònics dependents de voltatge, mentre que l'espai intermembranós conté diverses molècules com citocrom c, certes procaspases, les proteïnes Smac/Diablo i el factor inductor d'apoptosi (AIF). Una vegada activat el MOMP, s'alliberen una gran quantitat de substrats del mitocondri al citoplasma, un dels més importants és el citocrom c, el qual s'unirà als dominis autoinhibitoris de la proteïna APAF1 (apoptotic protease activating factor), activant-la. La unió de tots dos permet l'exposició del domini d'oligomerització. El domini CARD (caspase recruiting domain, o domini de reclutament de caspasa) de l'oligòmer s'uneix als dominis CARD de la procaspasa 9. Les 3 molècules (citocrom c, APAF1 i procaspasa 9) formaran l'apoptosoma, un complex heptamèric format per varies molècules de citocrom c, APAF1 i procaspasa 9. L'apoptosoma indueix la reorganització del centre actiu i activació de la caspasa 9, la qual actua com a activadora de les caspases efectores 3 i 7. En aquest pas el procés de mort cel·lular és irreversible (Figura 29) (Gupta S,2003).

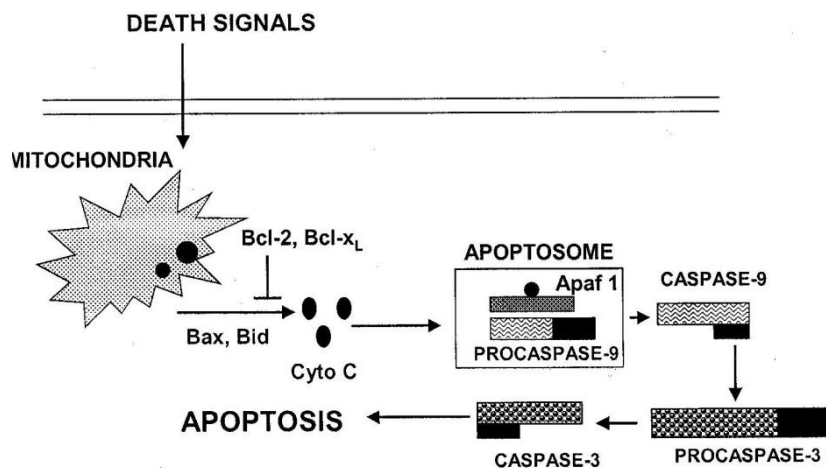


Figura 29. Esquema de la via intrínseca o mitocondrial. Modificat de Gupta S, 2003.

3.5.2.1 Reguladors de la via intrínseca: família de Bcl-2:

Els membres de la família BCL-2 regulen la via intrínseca mitjançant la regulació de la formació del MOMP (Green DR, 2002). A la família BCL-2 es distingeixen membres amb funció antiapoptòtica i membres amb funció proapoptòtica. Les cèl·lules expressen tant membres proapoptòtics com antiapoptòtics i el balanç entre tots dos dictaminarà la supervivència o la mort cel·lular (Figura 30).

Les proteïnes BCL-2 antiapoptòtiques contenen quatre dominis d'homologia amb BCL-2 (BH1-4) i entre els membres principals d'aquesta família trobem, Bcl-2, Bcl-xL (isoforma llarga), Bcl-w, i Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1). Actuen prevenint la integritat de la membrana mitocondrial, inhibint directament als membres proapoptòtics (Danial NN, 2004).

Els membres proapoptòtics es divideixen en proteïnes efectores i les proteïnes *BH3-only*. Les proteïnes efectores BAK (BCL-2 antagonist killer 1) i BAX (BCL-2 associated X protein), contenen 3 dominis BH (BH1-3). Aquestes dues proteïnes homo-oligomeritzen als porus proteolípids de la membrana mitocondrial, facilitant la seva permeabilització (MOMP) i la sortida de molècules al espai intermembranós. En situacions produïdes per estrès cel·lular, actuen preferentment les proteïnes *BH3-only*, les quals es subdivideixen basant-se en la seva habilitat per interactuar amb proteïnes antiapoptòtiques o per altra banda, amb proteïnes antiapoptòtiques i proteïnes efectores (Danial NN, 2004). Entre els membres *BH3-only* que només s'uneixen a membres antiapoptòtics trobem les proteïnes BAD (BCL-2 antagonist of cell death) i Noxa. Per altra part, la proteïna BIM (BCL-2 interacting mediator of cell death) pot actuar tant amb proteïnes antiapoptòtiques com amb proteïnes efectores, induint

l'oligomerització de BAK i BAX. Finalment, BIM i BID tenen la capacitat d'activar directament la funció de proteïnes efectores.(Chipuk JE, 2010).

a) Proteïnes antiapoptòtiques: BH1-4 –BCL-2, BCL-xL, MCL-1, A1, BCL-w



b) Proteïnes proapoptòtiques: BH1-3 –BAX, BAK, BOK



**c) Proteïnes proapoptòtiques BH3-only:
BIK, BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, HRK etc**



Figura 30. Membres de la família BH3. Modificat de Lomonosova E,2009.

3.6 Apoptosi en glioblastomes

Un dels grans trets que caracteritzen als gliomes malignes és la resistència intrínseca envers als tractament amb quimioteràpia i radioteràpia. Diversos estudis il·lustren que molts dels passos que condueixen a la cèl·lula a una mort programada es troben alterats. En el gliomes malignes, la balança entre proteïnes proapoptòtiques i proteïnes antiapoptòtiques es troba desnivellada afavorint la supervivència cel·lular. A continuació es detallen les alteracions més rellevants del mecanisme d'apoptosi que s'han descrit en gliomes malignes.

3.6.1 Receptors de mort (DR, death receptors)

Els receptors de mort més importants associats als GBMs inclouen TNFR1 (DR1/CD120a), TRAILR1 (DR4/APO-2), TRAIL2 (DR5/KILLER/TRICK2) i CD95 (DR2/Fas/APO-1). Diversos estudis han demostrat la importància d'aquests receptors en el procés de gliomagènesis. Els nivells d'expressió d'aquests receptors, en concret aquells que es corresponen amb receptors antagonistes es correlaciona amb una major susceptibilitat de les cèl·lules de glioma a una mort induïda per lligam. Un exemple d'això es el receptor antagonista

per al lligam CD95L, DcR3, l'expressió del qual en gliomes es correlaciona amb el grau de malignitat. (Roth W,2001) Per altra banda, en relació al sistema de receptors inductors d'apoptosi TRAIL, s'ha descrit que la seva expressió es correlacionava positivament amb la supervivència en pacients amb GBM primari (Kuijlen JM, 2006).

3.6.2 Família BCL-2

En els pacients amb GBM, s'ha observat una expressió preferent de proteïnes antiapoptòtiques *versus* proapoptòtiques de la família BCL-2, fet que podria ser el responsable de la inhibició de l'activació de caspases. En GBM s'ha descrit un increment en la expressió de proteïnes com Bcl-2 i Bcl-xl amb funció antiapoptòtica i una disminució dels nivells de Bax amb funció antagonista a les anteriors, el que suggereix un pressió a l'hora de desenvolupar un fenotip resistent a la mort per apoptosi, i no només això, sinó que a més afavoreix l'augment de la motilitat de la cèl·lula tumoral (Steinbach JP,2004). A més, els GBMs portadors de la mutació EGFRvIII indueixen l'expressió descontrolada de la proteïna antiapoptòtica BCL-xl. Aquesta sobreexpressió s'ha observat que, a més, confereix quimioresistència al cisplatí (Nagane M, 1998).

Així mateix, el grup de Zhu i col·laboradors, va demostrar que els receptors EGFR i EGFRvIII, regulen negativament l'apoptosi que s'inicia al mitocondri a través de la unió a PUMA, una proteïna BH3-only amb funció proapoptòtica altament expressada a GBM (Zhu H, 2010).

3.6.3 Família IAPs

S'ha observat que membres de la família de IAPs com XIAP, c-IAP1, c-IAP2 i Apollon es troben sobreexpressades en un gran nombre de línies cel·lulars de glioma. Per altra part, la presència de Survivina, un altre membre de la família de IAPs s'ha relacionat amb un temps de supervivència més curt. A més, Survivina pot provocar resistència a la radioteràpia de forma independent a la seva activitat inhibidora de caspases (Chakravarti A,2004).

3.6.4 Altres estímuls inhibidors de l'apoptosi

En cèl·lules tumorals, la inactivació de la proteïna p53 paralitza la resposta proapoptòtica perquè no es podrà dur a terme l'activació de gens proapoptòtics com Bax, Fas, PUMA, Noxa etc. A més, també s'ha descrit en gliomes la presència d'una inactivació de caspases.

Per altre banda, dins de les cèl·lules tumorals s'hi poden trobar proteïnes sobreexpressades amb una funcionalitat antiapoptòtica, com és el cas del NFκB, que es coneix que a part de mediador en processos immunològics o d'inflamatoris, té la capacitat d'activar la transcripció de membres de la família de les IAPs com c-IAP, XIAP i Survivina. A més també es capaç d'induir la expressió de BCL-2 i BCL-XL (Van Meir EG,2010).

4. Via de p53. Nutlines

En un 35% del total dels gliomes malignes s'observa alteració molecular del gen TP53 (per mutacions puntuals o per delecions del cromosoma 17). La proteïna p53 també s'anomena "el guardià del genoma" perquè es l'encarregada de coordinar la resposta cel·lular enfront un gran ventall d'estímuls tan diversos com l'estrès produït per un trencament en una cadena de DNA, o per radiacions UV o per activitats oncogèniques, entre altres. Depenen del tipus i el nivell de l'estímul, p53 pot funcionar activant mecanismes d'apoptosi, senescència, parada de cicle cel·lular, reparació del dany al DNA, metabolisme cel·lular o autofàgia (Vogelstein B,2000). Per portar a terme qualsevol d'aquestes accions, p53 actua com a factor de transcripció activant o reprimint la transcripció de gens essencials per a cada tipus de resposta. La proteïna p53 es troba molt ben regulada per una sèrie de modificacions postraduccionals durant l'homeòstasi en cèl·lules normals i en resposta a una estímul d'estrès (Kruse JP,2009).

4.1 Estructura i funció de p53

El gen *TP53* es localitza al braç curt del cromosoma 17 i conté 11 exons amb dos llocs alternatius de traducció, un situat a l'exó 2 i l'altre a l'exó 11. La proteïna p53 consta de 393 aminoàcids, i mitja dotzena de dominis que participen en la seva funció. El domini N-terminal té 2 dominis de transactivació (TAD, Transactivation domain) imprescindible per a l'activació

transcripcional de gens diana. El segon domini TAD es troba al costat d'un domini ric en prolines que facilita la interacció proteïna-proteïna. És en el domini N-terminal on MDM2 s'uneix i no li permet dur a terme la seva activitat transcripcional. En la regió central es troba el domini d'unió al DNA, el qual és molt susceptible a patir mutacions durant el procés de carcinogènesis (>90% de les mutacions de p53 es concentren en aquesta zona). A continuació, trobem el domini d'oligomerització que permet la formació de tetràmers de p53. Una proteïna p53 funcional actua de forma tetramèrica, constituïda per dos homodímers de p53. En aquest domini a més, es localitza un senyal d'exportació nuclear (NES, Nuclear Exportation Signal). Finalment, a la regió C-terminal, es troben 3 senyals de localització nuclear de la proteïna (NLS, Nuclear Localization Signal) (Figura 31) (Shu KX,2006, Olsson A,2007).

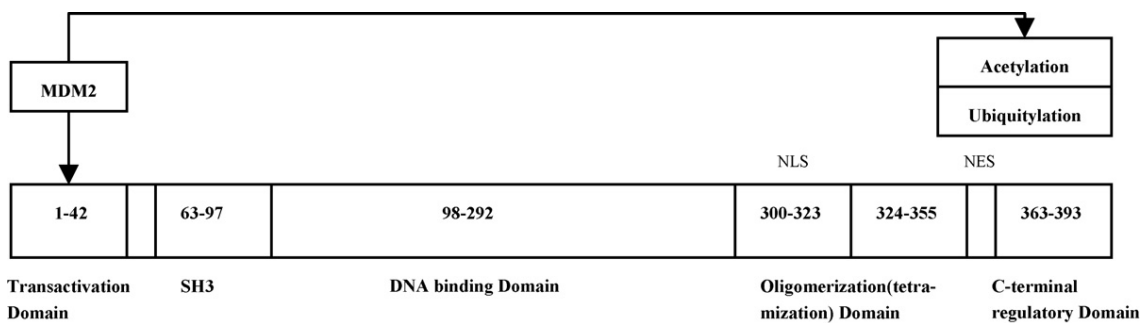


Figura 31 Estructura proteica de p53. Shu KX, 2006.

4.2 Regulació de p53 a través de la interacció amb MDM2

Els nivells i l'activitat de p53 han d'estar estretament regulats perquè la seva activació atura la proliferació cel·lular el que condueix a una parada de cicle o a la mort per apoptosi. En cèl·lules normals en absència d'estrès i de mutacions de *TP53*, la proteïna p53 presenta una vida mitja molt curta. El mecanisme principal que explica aquesta vida mitja curta consisteix en un bucle de retroalimentació autorreguladora, en el qual MDM2 hi participa de forma molt important (Barak Y, 1993). Quan els nivells de p53 nuclear són alts, la pròpia proteïna p53 activa la transcripció del gen *mdm2*. MDM2 actua inhibint l'activitat de p53 mitjançant: a) la unió al domini de transactivació de p53; b) Exportant p53 del nucli al citoplasma, promovent-ne la seva degradació; c) MDM2 té activitat E3 lligasa, inductora de la degradació de p53 via proteasoma (Vassilev LT,2005). El lloc d'interacció entre les dues proteïnes es troba en el

domini N-terminal de MDM2 i en el domini de transactivació a la part N-terminal de p53, també anomenat domini BOX1. En la interacció MDM2-p53 s'ha observat que participen un nombre limitat de residus d'aminoàcids que són fonamentals per a la interacció entre les dues proteïnes. De fet únicament 3 aminoàcids de p53 són essencials per a la unió a MDM2: Phe19, Trp23 i Leu26 són inserits a una butxaca hidrofòbica que es troba a la superfície de la molècula de MDM2. (Figura 32) (Klein C,2004; Sangary S,2008).

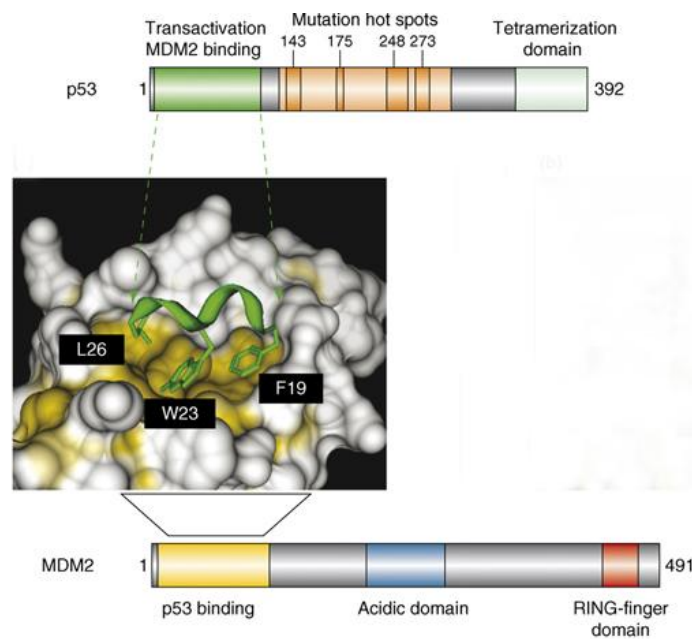


Figura 32. Aspectes estructurals de la interacció p53-MDM2. Modificat de Vassilev LT,2007.

4.3 Mecanisme d'estabilització i activació de p53

L'activació de p53 a través de senyals d'estrès (llum UV, hipòxia, privació de nutrients, senyals oncogèniques, etc) depèn de les modificacions postraduccionals que es produeixen a molècula de p53. Aquestes modificacions poden donar-se a diferents llocs i impliquen fosforilacions, acetilacions, metilacions, sumolitacions, a més de modificacions a MDM2 que poden potenciar la seva autoubiquitinització i degradació (Figura 33). (Harris SL, 2005; Lavin MF,2006).

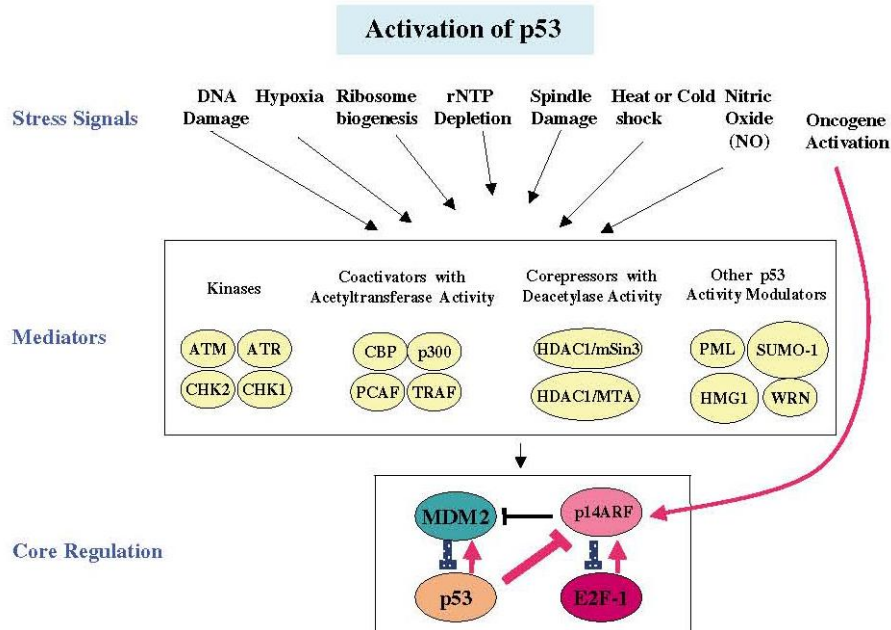


Figura 33. Diversitat de senyals que porten a l'activació de p53. Harris SL,2005.

Entre les modificacions més estudiades es troben les fosforilacions de p53, les quals realitzen un paper important en la estabilització i posterior activació de la proteïna. La fosforilació de p53 pot ser realitzada per un gran nombre de quinases com ATM/ATR/DNA-PK Chk1, Chk2, JNK (Jun NH2-terminal kinase), p38, i altres (Lavin MF, 2006). La fosforilació més freqüent és la que es produeix en la Serina 15. Aquesta fosforilació té lloc de forma ràpida en resposta a trencaments en les cadenes de DNA i depèn de ATM. Els residus Thr18 (trencaments al DNA i estrès replicatiu) i Ser20 situats a la regió N-terminal de p53 on es troba el lloc d'unió a MDM2, són importants en la interacció entre p53-MDM2 i amb les fosforilacions induïdes per estrès la afinitat entre les dues proteïnes disminueix. També es poden observar desfosforilacions de p53 com la de la Ser376, que crea un lloc per a la unió de la proteïna 14-3-3, contribuint a que p53 tingui una major afinitat per seqüències específiques en el DNA. (Thompson T, 2004; Harris SL, 2005; Lavin MF, 2006).

4.4 Dianes moleculars de p53

Existeixen gens diana de p53 implicats en l'aturada del cicle cel·lular com els que codifiquen per a les proteïnes p21, 14-3-3 σ i GADD45 (Vogelstein B,2000). Altres estan implicats en apoptosi, ja sigui la via extrínseca (*CD95/Fas/Apo1, DR4, DR5, APAF-1*) o la

intrínseca (*Bax*, *Bid*, *Noxa* i *PUMA*), i altres que ajuden a l'apoptosi encara que per mecanismes desconeguts (*Perp*, *Scotin*, *p53 AIP* i alguns *PIG*) (Lavin MF,2006).

4.5 Inhibició de la interacció entre p52 i MDM2: les Nutlines

4.5.1 Introducció

El gen *mdm2* es troba amplificat o sobreexpressat en molts tipus tumorals com osteosarcoma, glioma, mama, i limfomes (Chen L,1998). La sobreexpressió de MDM2 condiciona que la proteïna p53, malgrat ser funcional en molts casos, es trobi inhibida per aquesta interacció, i es promogui el procés de carcinogènesi. Diversos estudis mostren que la disrupció de la interacció entre les dues proteïnes mitjançant l'ús d'oligonucleòtids (Chen L,1998; Tortora G,2000) o petits pèptids (Chène P,2003), poden desencadenar l'activació de p53 i la inhibició del creixement tumoral. S'han descrit una sèrie de molècules de petita mida que actuen inhibint de forma específica aquesta interacció. Entre aquests destaquen uns compostos anàlegs a les cis-imidazolines anomenats Nutlines. Les Nutlines poden actuar desplaçant a la proteïna p53 i evitant la interacció amb MDM2 (Vassilev LT, 2004)

Les Nutlines es sintetitzen com a racèmics on els enantiòmers poden ser separats a través de l'ús de columnes. Hi ha descrites 3 classes de Nutlines: Nutlina-1; Nutlina-2 i la Nutlina 3 (Figura 35) la qual es pot subdividir en Nutlina 3a i 3b. S'ha demostrat que les Nutlines actuen en un rang entre 100-300nM però amb diferències d'afinitat entre enantiòmers de 150-200 vegades. La Nutlina 3a és la forma més activa mentre que la Nutlina-3b es 150 vegades menys activa (Vassilev LT,2005).

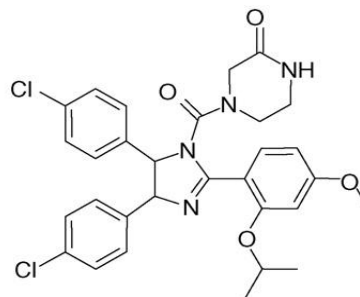


Figura 34. Estructura molecular de la Nutlina-3. Modificat de Vassilev LT, 2004.

4.5.2 Mecanisme d'acció

Les Nutlines penetren a la membrana cel·lular i actuen desplaçant la interacció de p53 amb MDM2, degut a que la molècula de Nutlina imita els 3 residus aminoàcids de p53 essencials per a la interacció entre MDM2-p53 (Figura 35). Les Nutlines permeten activar la via

de p53 en cèl·lules amb una proteïna p53 salvatge i per tant inhibir el creixement tumoral a concentracions molt baixes.

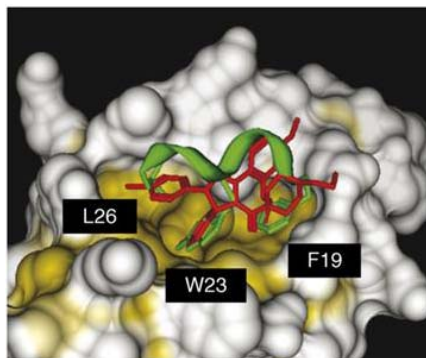


Figura 35. Mecanisme d'acció de la Nutlina. La molècula de Nutlina 2(vermell) unida a la butxaca de p53 a la superfície de MDM2, imitant els 3 residus aminoàcids crucials de p53 per a la interacció entre MDM2-p53. Modificat de Vassilev LT,2007.

Les Nutlines poden induir diferents tipus de resposta en funció del tipus cel·lular tractat per mitja d'una aturada en el cycle cel·lular, apoptosi, o senescència. La resposta ve donada a través de la activació transcripcional dirigida per p53 (Vassilev LT,2007).

Un dels primers mecanismes per a l'activació de p53 són les modificacions postraduccional que pateix la molècula, on les fosforilacions són les més estudiades. En un estudi de Thomson i col·laboradors on van tractar cèl·lules de càncer de colon humà amb Nutlina-3 i van analitzar 6 residus de serina claus per a la activació de p53, van demostrar que la Nutlina-3 a diferència d'altres compostos no indueix fosforilacions. No obstant, la nutlina és capaç d'induir la transactivació de gens diana de p53, i la inducció d'apoptosi, igual o millor que altres agents quimioteràpics (Thompson T,2004).

El tractament *in vitro* amb Nutlina-3 de cèl·lules tumorals amb p53 wt, com per exemple, limfoma de cèl·lules de mantell (Tabe Y, 2009), limfoma de Hodgkin (Drakos E,2007), càncer de pròstata (Logan IR,2007), leucèmia linfoblàstica aguda (Gu L,2008) i leucèmia linfocítica crònica (Coll-Mulet L, 2006; Hasegawa H,2009) pot induir, depenent del tipus cel·lular, diversos fenòmens entre els que s'inclouen aturada en el cycle cel·lular, disminució de la proliferació cel·lular, inducció d'apoptosi i en alguns casos senescència. En molts dels estudis anteriors també s'ha observat que la combinació de Nutlina-3 amb un altre agent antineoplàstic potencia el seu efecte per un mecanisme sinèrgic.

Les cèl·lules tumorals amb mutacions a p53 són resistents al tractament amb Nutlina-3, però en un estudi de Ambrosini i col·laboradors mostren que la Nutlina-3 pot induir citotoxicitat en cèl·lules amb un p53 no funcional a través de l'estabilització i activació d'E2F1 (Ambrosini G,2007).

4.5.3 Nutlines i radioteràpia

Tal com s'ha comentat prèviament en aquesta secció (apartat 2.2) moltes neoplàsies, entre les que s'inclouen els gliomes, són resistents al tractament amb radioteràpia. Degut a això s'estan realitzant grans esforços per a la recerca de noves molècules que permetin sensibilitzar aquests tumors enfront al tractament i aconseguir millorar la supervivència del pacient així com la seva qualitat de vida.

Diversos estudis mostren que uns nivells baixos de p53 en la cèl·lula indueixen resistència després del tractament amb quimioteràpia o radioteràpia. La inhibició de p53 per part de MDM2 pot ser unes de les causes que explicarien aquesta resistència (Chen J,1996). La inducció de dany al DNA provocada per exemple per les radiacions ionitzants indueix l'activació de p53, però a la vegada també activa MDM2 el que provoca una disminució en l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi (Cao C,2006) . Per tant, la inhibició de MDM2 pot ser un mecanisme per induir radiosensibilització cel·lular .

Estudis previs han demostrat que el tractament amb Nutlina-3 sensibilitza enfront a les radiacions ionitzants induint diferents mecanismes en funció del tipus cel·lular tractat. En un estudi realitzat en cèl·lules tumorals de pulmó es va observar que la combinació de Nutlina-3 seguida de radioteràpia sensibilitza a les cèl·lules tumorals induint parada de cicle, disminució de la viabilitat cel·lular i inducció de apoptosi a través de l'activació de la via de p53 (Cao C, 2006). Així mateix, en línies cel·lulars de càncer de pròstata o carcinoma de laringe, la sensibilització de Nutlina-3 a la radioteràpia pot induir un estat de senescència cel·lular dependent de p53 (Lehmann BD,2007; Arya AK,2010).

5. Survivina

5.1 Estructura

La Survivina és el membre més petit de la família de les IAPs o inhibidors de l'apoptosi, estructuralment es caracteritza per tenir un domini BIR (Baculovirus IAP repeat) a la regió central, però li manca el domini RING-finger present en altres membres de la família. La Survivina existeix principalment com a homodímer (Sah NK,2006; Capalbo G,2007). El gen humà de la Survivina pot patir de splicing alternatiu i donar 5 isoformes diferents: la forma salvatge de la Survivina, Survivina-2B, Survivina- Δ Ex3; Survivina-3B i Survivina 2A (Duffy MJ, 2007). La Survivina pot localitzar-se subcel·lularment en el nucli i el citoplasma, i són regulades independentment durant la progressió del cicle cel·lular. Recentment, s'ha trobat en cèl·lules tumorals que la Survivina pot estar també localitzada al mitocondri, i que al produir-se l'estímul que desencadena el procés d'apoptosi pot ser alliberada al citoplasma, conferint citoprotecció a través d'un bloqueig de l'activació de la caspasa 9 (Dohi T,2004).

5.2 Regulació de la Survivina

Un dels mecanismes de regulació de Survivina té lloc a nivell transcripcional. El promotor de la Survivina és regulat a través de β -catenina el qual indueix al factor de cèl·lules T o TCF. A més, la transcripció també pot ser induïda per Stat 3, EGFR, PI3K/AKT i Sp1. El mateix promotor conté 2 llocs de reconeixement per Sp1. El factor de transcripció p53 pot reprimir l'activació del promotor de la Survivina mitjançant la inhibició de Sp1. La Survivina té una vida mitja de 30 minuts, que és regulada per mitjà de la degradació pel proteasoma després de ser poliubiquitinada (Yamamoto H,2008).

A més de la regulació transcripcional, la Survivina pot patir modificacions postraduccionalmentals com la fosforilació a la Thr34 la qual ocasiona una pèrdua d'expressió proteica de la Survivina que comporta l'activació de l'apoptosi (Wall NR,2003).

5.3 Funcions de la Survivina

La Survivina juga un paper multifuncional dins de la cèl·lula ja que pot actuar en diferents mecanismes fisiològics a més de participar en la regulació de l'apoptosi. Survivina

intervé en múltiples funcions cel·lulars relacionades amb el cicle cel·lular com la divisió cel·lular, la resposta a l'estrès i la vigilància dels punts de control del cicle cel·lular, mitosis i reparació del DNA (Altieri D, 2008; Gimenez-Bonafe P,2009). A nivell de l'apoptosi, Survivina actua com a inhibidor mitjançant la unió amb les caspases 3, 7 i 9 evitant la seva activació. A més, Survivina pot interaccionar directament amb la proteïna proapoptòtica Smac/DIABLO per així reduir l'antagonisme de Smac/DIABLO per altres IAPs (Song Z,2003). A nivell de regulació de la divisió cel·lular, Survivina actua durant la metafase i l'anafase a on té dues localitzacions diferents, una associada a la polimerització de la tubulina, que inclou centrosomes i microtúbuls, suggerint que participa en la regulació del moviments dels microtúbuls. L'altra localització té lloc al cinetocor del cromosomes a la metafase on participa en la correcta segregació cromosòmica. (Mita AC, 2008) Finalment, s'ha descrit que la Survivina localitzada al nucli pot desenvolupar un paper dins del procés de reparació del dany al DNA, ja que s'ha observat que interacciona amb membres de la maquinaria de reparació i es capaç de regular l'activitat de la DNA-PKsc. (Capalbo G,2010).

5.4 Survivina i resistència al tractament

Els nivells d'expressió de la Survivina en teixits normals adults són molt baixos. Únicament s'expressa de forma abundant i ubiqua durant el desenvolupament. En la majoria de les cèl·lules la seva expressió queda restringida a la fase G2-M seguida d'una ràpida disminució en G1 (Andersen MH,2007).

La Survivina és troba sobreexpressada en la majoria de tumors en comparació als teixits normals. Es coneix que el promotor de Survivina està bàsicament silenciada en les cèl·lules normals, però altament expressat en cèl·lules tumorals. L'expressió diferencial de Survivina entre cèl·lules normals i tumorals sembla estar relacionada no tan sols amb una hiperactivitat de determinades vies oncogèniques (STAT3 y NFκβ, entre altres), sinó també amb la pèrdua de gens supressors de tumors (p53 i PTEN) que de forma constitutiva silencia el gen de la Survivina (Altieri D,2008).

La sobreexpressió de Survivina s'ha relacionat amb resistència a un gran ventall d'agents quimioteràpics així com a la radioteràpia. La supressió de l'expressió de la proteïna podria conferir sensibilització als diferents tipus de tractament. La radiosensibilització observada després de la inhibició de Survivina es de caràcter multifactorial i inclou mecanismes dependents i independents de les caspases (Pennati M,2007; Chakravarti A, 2004).

Finalment és important destacar que la radiosensibilització per inhibició de Survivina també podria estar relacionada amb una alteració en els mecanismes de reparació del DNA (Capalbo G,2010).

S'han desenvolupat múltiples estratègies per inhibir l'expressió i/o la funció de la Survivina com la inhibició de la transcripció a través del bloqueig del promotor (molècules com YM155), inhibició de la traducció proteica (ús de siRNA o de Oligonucleòtids) o interferència en la seva funció (mutants doble negatius) (Ryan BM,2009). L'ús d'un siRNA de Survivina en cèl·lules de càncer de recte sensibilitza les cèl·lules tumorals a la radioteràpia, ocasionant una parada de cicle cel·lular en G2-M, induint l'activació de caspases 3 i 7 que desencadenarà l'apoptosi, a més de fer augmentar el marcatge amb YH2AX després del tractament amb radioteràpia (Rödel F,2005).

5.5 Petites molècules inhibidores de Survivina: YM155

Com que Survivina no és una proteïna de membrana i no té una activitat enzimàtica intrínseca, trobar tractaments que tinguin com a objectiu inactivar les funcions de Survivina ha estat una tasca complexa. A més, estudis cristal·logràfics han demostrat la presència de pocs llocs potencials per actuar amb fàrmacs. Malgrat això, s'han descrit múltiples estratègies que tenien com objectiu disminuir l'expressió o funció de Survivina, ja sigui per unió al seu promotor (YM155), o per inhibició translacional mitjançant siRNA o interferint la funció de Survivina amb mutants dominat-negatius.

Una de les primeres molècules de baix pes molecular utilitzades per inhibir Survivina és YM155 monobromo (1-(2-metoxietil)-2-metil-4,9-dioxo-3-(piracina-2 ymetil)-4,9-dihidro-1H-nafto[2,3-d]bromuro de imidazolium), un petit compost que específicament inhibeix el promotor de Survivina. YM155 va ser seleccionat mitjançant un cribratge d'alt rendiment com supressor específic de l'expressió de Survivina per inhibició del seu promotor. La inhibició del promotor ocasiona una inhibició del mRNA i de la proteïna de forma temps i dosi depenent, donant lloc a una activació de l'apoptosi, sense afectar els nivells d'expressió d'altres IAPs tant *in vitro* com *in vivo*.

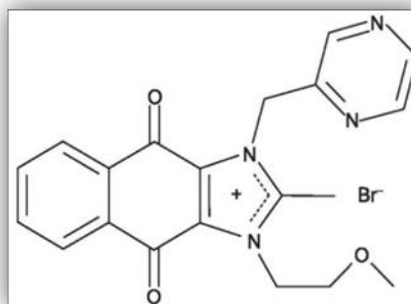


Figura 36 Estructura química del YM155
Modificat de Minematsu T, 2008.

Aquesta molècula, inhibeix el creixement cel·lular independentment de l'estat de p53 (Nakahara T,2007).

Els estudis de farmacocinètica revelen que la distribució en els teixits tumorals és 20 vegades més alta que en plasma, i aquesta diferència entre les dues localitzacions podria ser explicada per la estructura de la molècula (Nakahara T,2007).

Els seus efectes antitumorals s'han analitzat en una bateria de 119 línies tumorals humanes, observant-se una major activitat en les línies derivades de limfoma no Hodgkin, càncer de pròstata hormono-depenent, càncer d'ovari, sarcoma, càncer de pulmó de cèl·lula gran, càncer de mama, leucèmia i melanoma. La mitjana del valor d'inhibició de creixement del 50% de les cèl·lules GI_{50} avaluat per l'assaig de sulforhodamina B va ser de 15nM (Nakara T, 2011).

Actualment, YM155 està en estudis fase I/II. En estudis de fase I , YM155 ha estat testat en pacients amb tumors sòlids en un estat avançat i en limfomes. Les conclusions de l'estudi permeten afirmar que YM155 pot ser administrat de forma segura, sense aparició d'una toxicitat severa. En alguns pacients es mostra reducció tumoral analitzada per tomografia computeritzada (Tolcher AW, 2008; Satoh T, 2009).

Fins ara, s'han portat a terme 2 estudis de fase II, un amb pacients diagnosticats de càncer de pulmó de cèl·lula petita i un altre amb pacients amb melanoma, els resultats dels quals has demostrat que en monoteràpia YM155 té una modesta activitat antitumoral, però es probable que en combinació amb altres tractaments pugui tenir una acció quimio o radiosensibilitzant (Giaccone G,2009; Lewis KD,2011). El que s'ha observat és que el tractament en cèl·lules tumorals de càncer de pulmó de cèl·lula petita *in vitro* i *in vivo* amb la combinació de YM155 i radioteràpia, té un efecte additiu que sensibilitza les cèl·lules a la radiació, induint apoptosi i inhibint el procés de reparació del DNA (Iwasa T,2008).

Actualment hi ha 3 estudis clínics en fase I/II (<http://clinicaltrials.gov>) per analitzar l'eficàcia de YM155 associat a altres substàncies en limfoma no Hodgkin (NCT01007292), càncer de mama (NCT01038804) i en tumors sòlids (NCT01100931).

6. Noves estratègies terapèutiques pels pacients amb glioblastoma

Degut al mal pronòstic que presenten els gliomes, i que malauradament acaben presentant recurrència i resistència als tractaments actuals es fa necessari trobar noves molècules que permetin millorar el tractament, i amb això augmentar la supervivència i la qualitat de vida del pacient.

S'han portat a terme nombrosos treballs, que finalment no han donat els resultats esperats, no obstant, aquestos estudis han permès conèixer més profundament la biologia molecular del GBM, facilitant nous camins per a futurs estudis clínic. Els treballs que es porten a terme inclouen teràpies antiangiogèniques, teràpia gènica, immunoteràpia, teràpies per millorar la resposta a la radiació, o fàrmacs que vencin la resistència.

A més, avui en dia es fan servir molècules petites que permetin l' inhibició de dianes com poden ser: Akt (perifosina), EGFR (erlotinib), histones desacetilases (varinostat), mTOR (sirolimus), proteasoma (bortezomib),etc. Moltes d'aquestes molècules s'estan provant a diversos assajos clínics amb combinació amb les teràpies actuals (Kanu OO,2009).

La teràpia gènica fa servir virus, nanopartícules, plàsmids d'expressió o preparacions liposomals per el transport i entrega de gens suïcides directament al tumor. En canvi, la immunoteràpia inclou l'ús de vacunes ja sigui amb cèl·lules detrítiques, o amb pèptids específics de tumor o anticossos monoclonals per al tractament (Kanu OO,2009).

Actualment, hi ha diversos estudis clínics (<http://clinicaltrials.gov>) per al tractament de GBM recurrents o en primera línia, com a monoteràpia o en combinació (Taula 2).

Tipus terapèutica	d'estratègia	Diana	Agent
Teràpia amb molècules petites			
		Inhibidor d'Akt	Perifosina
		Inhibidor d'activitat TK d'EGF	Erlotinib, gefitinib, cetuximab, etc.
		Inhibidors de factors de creixement	Suramina, leflunomina
		Inhibidors de histones deacetilases	Varinostat, depsipèptid, panobinostat, etc.
		Inhibidor de proteasoma	Bortezomib
		Inhibidors de mTOR	Everolimus, sirolimus, rapamicina, etc.
		Inhibidors de topoisomerasa	Etopòsid, Irinotecan, Topotecan, etc.
Teràpies antiangiogèniques			
		Anti-integrina $\alpha\beta 5$	Cilintigida, ATN-161
		Anti-factor de creixement d'hepatòcits	AMG-102
		Anti-VEGF	Bevacizumab
		Anti-VEGFR	Sorafenib, sunitinib, cediranib, etc.
Immunoteràpia			
		Anticossos biespecífics	MDX447 (EGFR i CD64)
		Mediadors de citoquines	Aldesleuquina (anàleg IL2), etc.
		Vacunes amb cèl·lules dendrítiques	Pèptid EGFRvIII (CDX-110), mRNA de cèl·lules mare tumorals
		Inmunotoxines	Transferrina-CRM107 (transferrina + diftèria)
		Inmunoestimuladors	GM-CSF+PEP-3-KLH (pèptid EGFRvIII)
		Radioimmunoteràpia	Anticòs I-anti-tenascina (81c6)
Teràpia gènica			
		Vectors adenovirals	Adenovirus recombinat-hIFN β , Ad5CMV-p53, etc.
		Gens de citoquines	Transferència gènica de IFN β
		Virus oncolítics	G207 (herpes símplex I)
Molècules per resistència a TMZ			
		Inhibidors de MGMT	O6-Benzilguanina
		Inhibidors de PARP	BSI-201, ABT-888

Taula 2. Selecció de dianes moleculars que actualment es troben en desenvolupament de assaig clínic per al tractament de gliomes (Modificat de de Groot JF,2007; Adamson C,2009; Okada H,2009 i Van Meir EG,2011.