



## Trabajo Fin de Grado

# Nuevas estrategias en el tratamiento del glioblastoma basadas en la regulación de la autofagia

New strategies for the treatment of glioblastoma based on the regulation of autophagy

Autora: Sandra Lagunas Corredor

Directora: Sara Oliván García

Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza

Curso 2016/2017





UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
GRADO EN MEDICINA

Ficha resumen del  
Trabajo Fin de Grado

**Datos personales:**

<b>Nombre y apellidos:</b>	Sandra Lagunas Corredor
----------------------------	-------------------------

**Datos del Trabajo Fin de Grado:**

<b>Título del TFG:</b>	“Nuevas estrategias en el tratamiento del glioblastoma basadas en la regulación de la autofagia”
<b>Lugar de realización:</b>	UNIZAR
<b>Titulación:</b>	Grado en Medicina
<b>Tutora:</b>	Prof. Dra. Sara Oliván García
Zaragoza, Junio 2017	

## Resumen:

El glioblastoma multiforme es uno de los tumores primarios más agresivos del sistema nervioso central, con una media de supervivencia que apenas supera el año a pesar del empleo de distintas modalidades terapéuticas. Se trata de un tumor que puede desarrollarse *de novo* o sobre una lesión preexistente.

El tratamiento del glioblastoma se basa en la combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia, con el empleo de temozolamida. La temozolamida es el quimioterápico de elección en este tumor, y aunque parecía un medicamento prometedor, el desarrollo de resistencias por parte de las células tumorales dificulta el objetivo de regresión tumoral.

Una de las alternativas para hacer frente a estas resistencias es la autofagia. Se trata de un proceso catabólico mediante el cual los orgánulos deteriorados son eliminados mediante su secuestro en unas vesículas denominadas autofagosomas. Este mecanismo es clave para mantener el equilibrio del medio interno y se pone en marcha ante situaciones de estrés celular, como ocurre en el déficit de oxígeno o hipoxia.

Si bien en los estadios tempranos del tumor, la autofagia constituye un mecanismo antineoplásico, una vez establecido el glioblastoma, puede favorecer la perpetuación tumoral, ya que, el elevado grado de hipoxia (característica de este tipo de tumores), pone en marcha el proceso autófago para abastecer de energía y nutrientes a las células tumorales, contribuyendo así a su subsistencia.

En relación a la regulación de la autofagia en el tratamiento del glioblastoma, se barajan varias opciones, una sería la inhibición de este mecanismo, con el empleo de bloqueadores tempranos y tardíos, como la cloroquina; y otra la inducción del mismo a través del uso de los cannabinoides.

## Palabras clave

Glioblastoma multiforme, hipoxia, autofagia, temozolamida, resistencia celular, cloroquina, *Cannabis Sativa*.

**Abstract:**

Glioblastoma multiforme is one of the most aggressive primary tumours of the central nervous system with an average survival rate that barely exceeds a year despite the use of different treatment methods. This tumour can be developed *de novo* or over a pre-existing injury and it is characterised by a high degree of hypoxia.

For the treatment of this tumour, a combination based on surgery, radiotherapy and chemotherapy with the use of temozolomide has been used. Indeed, the so-called temozolomide is a chemotherapeutic used for this tumour. However, although it seemed a promising drug, the development of resistances from tumour cells makes difficult the objective of tumour regression.

One of the alternatives to face this resistance is autophagy, that is defined as a catabolic process by which damaged organelles are removed by its kidnapping in vesicles called autophagosomes. This is a key mechanism that guarantees the balance of the internal environment and it is activated in cell stress situations, as it happens during oxygen deficiency or hypoxia.

While autophagy constitutes an antineoplastic mechanism at the primary stages of the tumour, once the glioblastoma is established, it may favour the tumour perpetuation since the high degree of hypoxia (characteristic of this type of tumours) starts up the autophagic process. This is done in order to supply energy and nutrients to the tumour cells; therefore, it contributes to their survival.

Consequently, there are different options concerning the use of autophagy in the treatment of glioblastoma. On the one hand, the inhibition of this mechanism with the use of early and late blockers, such as chloroquine, and on the other hand, the induction thereof through the use of cannabinoids.

**Key words:**

Glioblastoma multiforme, hypoxia, autophagy, temozolomide, cell resistance, chloroquine, *Cannabis Sativa*.

# Índice

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>2-3</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>6-24</b>
1. GLIOBLASTOMA MULTIFORME	7
1.1.-Histología	8
1.2.-Clasificación	
2. CONCEPTO DE AUTOFAGIA	10
2.1.-Microautofagia	10
2.2.-Macroautofagia	10
2.3.-Autofagia mediada por chaperonas	11
3. AUTOFAGIA E HIPOXIA	12
4. MUERTE MEDIADA POR AUTOFAGIA	14
5. TRATAMIENTO GLIOBLASTOMA	15
5.1.-Tratamiento actual: temozolamida	15
5.2.- Resistencias	16
5.2.1.-Mecanismo de autofagia	16
5.2.2.-MGMT	17
5.2.3.-Otros	17
5.3.-Estrategias para vencer resistencias de la TMZ	18
5.3.1.-Inhibidores	18
5.3.2.-Inductores	19
5.3.2.1.- <i>Cannabis Sativa</i>	20
5.3.2.2.-Uso de cannabinoides en terapias combinadas frente al GBM	21
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>23-25</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>27-28</b>

# Introducción

---

El glioblastoma multiforme ocupa un lugar “privilegiado” entre los tumores del sistema nervioso central, ya que se trata del tumor cerebral más frecuente en la población adulta, con un pico de incidencia entre los 45 y los 60 años.

Clásicamente, se ha venido distinguiendo entre glioblastoma primario y secundario, en virtud de si el tumor aparecía *de novo* o sobre una lesión preexistente. Actualmente, se conoce una mutación enzimática que es exclusiva del glioblastoma secundario, por lo que la nueva clasificación de la OMS utiliza este criterio para diferenciar los dos tipos de glioblastomas.

Histológicamente se trata de un tumor con elevado índice mitótico, en que confluyen áreas de tejido sano y de tejido tumoral, sobre el que se desarrolla una neovascularización defectuosa que favorece un entorno de hipoxia.

Los rasgos histológicos junto con su rápida progresión, convierten al glioblastoma en uno de los tumores más agresivos que existe hoy en día, con una media de supervivencia que apenas supera el año desde que el paciente es diagnosticado.

Este hecho justifica el gran esfuerzo que se está realizando para conseguir, si no curar, por lo menos mejorar la sombría perspectiva que plantea este tumor. A día de hoy, el tratamiento del glioblastoma se centra en la cirugía, asociada a radio y quimioterapia con administración de un fármaco denominado temozolamida.

Este abordaje terapéutico plantea grandes limitaciones, por una parte, la cirugía no siempre es posible llevarse a cabo por la delicadeza intrínseca de la anatomía cerebral, y la eficacia de la temozolamida, queda aminorada por el desarrollo de resistencias por parte de las células tumorales.

Una alternativa para controlar estas resistencias pasaría por la regulación del proceso de autofagia. La autofagia del griego *auto* - uno mismo; y *phagos* – comer o “autodigestión”, es un proceso mediante el cual las organelas defectuosas son envueltas en una vesícula de doble membrana o *autofagosoma*, para posteriormente ser degradadas por la acción de enzimas lisosómicas y así conseguir energía suficiente para asegurar la supervivencia celular y la homeostasis del medio interno.

Distintas situaciones ponen en marcha el mecanismo de autofagia: desde el propio proceso de envejecimiento celular hasta infecciones, procesos oncogénicos, situaciones de ayuno, presencia de radicales libres, hipoxia o cualquier otra situación que suponga cierto grado de estrés celular.

En el contexto del glioblastoma, la autofagia desempeña un rol dual en función del estadío del tumor. Así, en las etapas tempranas, momento en el que comienzan a proliferar las primeras células cancerígenas, la autofagia se activa como mecanismo citoprotector eliminando dichas células tumorales. En cambio, una vez establecido el tumor, el entorno de hipoxia y de déficit de nutrientes pone en marcha la autofagia contribuyendo así al mantenimiento y proliferación tumoral.

Las investigaciones actuales están basando sus líneas de acción en la modulación de la autofagia y se trabaja sobre todo, en la forma de superar las resistencias a la temozolamida. Se definen fundamentalmente dos líneas de investigación, una basada en el bloqueo de la autofagia, ya sea en las fases más tempranas o tardías, y otra basada en la inducción la autofagia con el fin de promover una muerte celular tumoral.

Algunas de las estrategias más prometedoras son la cloroquina, antipalúdico ya comercializado mundialmente que actúa ejerciendo un bloqueo tardío sobre la autofagia; y el *Cannabis Sativa*, que actúa como inductor del proceso autofágico.

# Objetivos

---

Con este trabajo se pretende estudiar las nuevas estrategias que se están desarrollando para el tratamiento del glioblastoma multiforme y que basan su mecanismo de acción en la regulación de la autofagia.

De modo más específico se podrían definir los siguientes objetivos:

- Conocer las características del glioblastoma multiforme, sus principales rasgos histológicos, así como su evolución, comportamiento y las causas que hacen que este tumor sea tan agresivo.
- Estudiar en qué consiste el proceso de autofagia, conocer cuál es su función, su clasificación, las fases del proceso, y la actividad que desempeña en el glioblastoma.
- Analizar los distintos roles de la autofagia en el contexto tumoral, conocer qué situaciones determinan cada tipo de respuesta autofágica y averiguar cómo se puede utilizar el mecanismo de la autofagia para vencer las resistencias a las terapias antineoplásicas del glioblastoma.

# **Material y métodos**

---

Para la realización del presente trabajo, se ha llevado a cabo una revisión sistemática de la literatura disponible relacionada con el proceso de la autofagia y del glioblastoma multiforme. Para ello, se han utilizado distintas bases de datos del ámbito biomédico como Medline, PubMed y Scielo, además de consultar revistas clínicas, como la española Elsevier, libros de texto como el Tratado de Nutrición de la editorial Panamericana (segunda edición , 2010) , y páginas webs oficiales de la Sociedad Española de Neurología ([www.sen.es](http://www.sen.es)) y de la American Brain Tumor Association ([www.abta.org](http://www.abta.org) ) .

La búsqueda se ha realizado tanto en castellano como en inglés, filtrando los resultados a aquellos documentos publicados en los últimos diez años y accesibles a texto completo de manera gratuita. Se han utilizado principalmente dos operadores booleanos “AND” y “OR” para acotar la búsqueda a palabras clave en las bases de datos.

El principal criterio de exclusión fueron aquellos artículos que pese a estar relacionados con el tema de búsqueda, tenían un año de publicación que excedía los diez años.

# Resultados

---

## 1.- GLIOBLASTOMA MULTIFORME

El GBM (glioblastoma multiforme) es el tumor primario más frecuente del SNC (sistema nervioso central), se trata de un tumor altamente agresivo, de crecimiento rápido y carácter infiltrante que se origina a partir de las células de sostén del sistema nervioso, los astrocitos.<sup>1,2</sup> Presenta una mayor incidencia en el sexo masculino y es de localización supratentorial, afectando fundamentalmente a los lóbulos temporal y parietal. En los pacientes pediátricos es un tumor mucho menos habitual y la ubicación preferente es en la fosa posterior.<sup>1,3</sup>

En función del grado de malignidad, la OMS (Organización Mundial de la Salud) establece una clasificación relacionada con el pronóstico de la enfermedad. En esta clasificación, que se analiza más adelante, el GBM representa el grado IV de los astrocitomas, es decir, el grado más alto de malignidad.<sup>2</sup>

Su crecimiento infiltrativo es extremadamente rápido, de manera que puede invadir y migrar a otras áreas cerebrales en un margen de tiempo muy corto; no obstante, es importante recalcar que el GBM rara vez metastatiza fuera del SNC.<sup>2</sup>

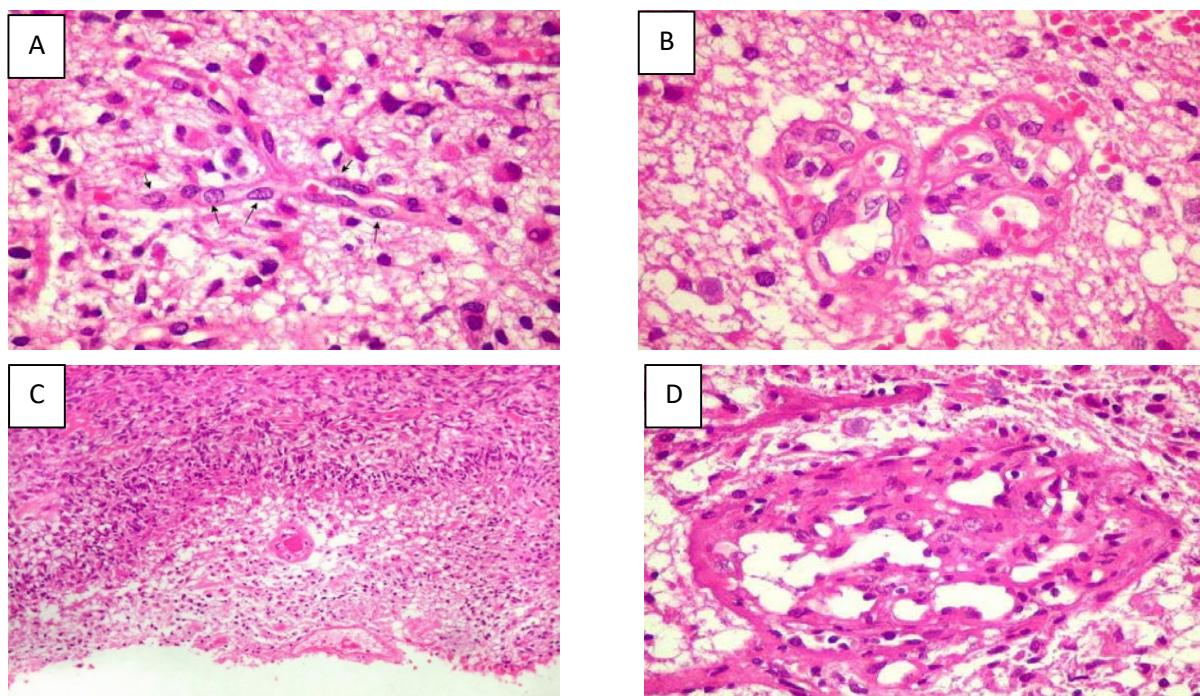
Debido a esta rápida progresión y al repentino crecimiento tumoral, se produce un aumento súbito de presión intracraneal que justifica síntomas como: cefalea de predominio matutino, náuseas, vómitos, convulsiones y somnolencia.<sup>4</sup> Sin embargo, será la localización del tumor la que determine el desarrollo de uno u otros síntomas, como hipostesias o parestesias hemilaterales, visión borrosa, cambios en la personalidad, dificultades en el lenguaje y/o la memoria.<sup>4</sup> Además, la secreción de factores procoagulantes propia del GBM, lo asocia a un elevado riesgo de trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.<sup>2</sup>

Conociendo las características y la agresividad intrínseca de este tumor, cabe esperar de él una evolución enérgica e implacable con el peor de los pronósticos. De hecho, a pesar de recibir tratamiento, la media de supervivencia de los pacientes afectados no supera los 12-14 meses.<sup>2,3</sup>

### 1.1 Histología:

El GBM se caracteriza por presentar patrones celulares y rasgos citológicos muy heterogéneos con un alto grado de celularidad y con un elevado índice mitótico.<sup>1,2,3,5</sup>

Existe una significativa hiperplasia endotelial (figura 1-A) con proliferación de nuevos vasos sanguíneos (microangiogénesis) de recorrido tortuoso e incluso con la presencia de trombos en su interior (figura 1-B).<sup>2,3,5</sup> Estos vasos trombosados dan lugar a áreas de necrosis coagulativa, rodeadas de núcleos paralelos entre sí, formando las características “pseudoempalizadas” como se aprecia en la figura 1-C. Otro de los rasgos típicos del GBM, es precisamente esta hiperplasia endotelial, a veces tan intensa que hace que las células protruyan hacia la luz vascular, dándoles a los vasos un aspecto glomeruloide (figura 1-D).<sup>2,3</sup>



**Figura 1.**Histología del GBM. Universidad Estatal de Campinas (departamento de Anatomía Patológica).Disponible en: [http://anatpat.unicamp.br/npt\\_7.html](http://anatpat.unicamp.br/npt_7.html)

La alternancia de zonas de tejido con distinto grado de diferenciación constituye otra característica histológica representativa. Por un lado, existen focos integrados exclusivamente por células tumorales y vasos neoformados, donde se observa una marcada densidad celular, abundantes núcleos atípicos y un elevado índice mitótico. Y alrededor de estos focos, se encuentra un área todavía sin neo-

vascularización, donde se disponen células cancerígenas aisladas que invaden parénquima funcional y morfológicamente sano. Dichas células representan el carácter infiltrante del GBM y se caracterizan por su núcleo atípico y alargado.<sup>2, 3</sup>

## 1.2 Clasificación:

Clásicamente se ha diferenciado entre GBM primario y secundario.<sup>2</sup>

El GBM primario representa el 90% de estos tumores y se desarrolla de *novo*, sin que exista ninguna lesión de base. Afecta a pacientes en torno a los 60 años, con un debut brusco y una evolución altamente agresiva, siendo la media de supervivencia de aproximadamente un año desde que son diagnosticados.

El otro 10% lo constituyen los GBM secundarios. Estos tumores se originan a partir de astrocitomas de bajo grado (astrocitoma difuso o astrocitoma anaplásico) e inciden sobre pacientes más jóvenes, alrededor de los 45 años. Se caracterizan por un inicio más insidioso y una evolución más gradual, con mejor pronóstico que los anteriores.<sup>2, 3, 4,5</sup>

Los dos tipos de GBM son morfológicamente similares, pero presentan diferentes alteraciones genéticas. Así por ejemplo, el GBM primario se caracteriza por presentar anomalías en distintos genes implicados en el control del ciclo celular como amplificación de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) , delección de la proteína p16Ink4a o mutación de PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa). En cambio, en el GBM secundario lo más habitual es encontrar mutación de TP53, gen supresor tumoral que desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular.<sup>2, 3, 4,5</sup>

Ahora bien, con independencia de que sea primario o secundario, la alteración que más frecuentemente se identifica en el GBM es la monosomía en el cromosoma 10, que puede afectar al brazo largo 10q o al cromosoma entero.<sup>2, 3, 4,5</sup>

Recientemente, se ha descubierto una mutación en la enzima IDH (isocitrato deshidrogenasa) NADPH dependiente tipo 1 y 2, que participa en la conversión de isocitrato a alfa-cetoglutarato en el proceso de producción de NADPH. Dicha

mutación es exclusiva del GBM secundario y se recoge en la nueva clasificación de tumores del SNC de la OMS, que queda de la siguiente manera: <sup>3, 4, 5</sup>

**Tipo IDH (IDH wild-type)**, corresponden a lo que antes se denominaba GBM primario o *de novo*. Constituyen el 90% de los GBM y dentro de este grupo se incluyen los subtipos <sup>3, 4, 5, 6</sup>

- o Glioblastoma de células gigantes<sup>6</sup>
- o Gliosarcoma <sup>6</sup>
- o Glioblastoma epiteloide ( esta variante antes no la recogía la OMS 2007)<sup>6</sup>

**Mutantes IDH**, que se corresponden con los GBM secundarios y representan un 10% de estos tumores. <sup>3, 4, 5, 6</sup>

**Glioblastoma NOS**, este diagnóstico se reserva para aquellos gliomas en los que no se puede evaluar la mutación IDH.<sup>6</sup>

## 2. AUTOFAGIA

La autofagia es un tema de actualidad que despierta gran interés en el ámbito de la investigación, de hecho, el japonés Yoshinori Ohsumi recibía el año pasado el premio Nobel de Medicina por sus aportaciones a este campo.

Se trata de un proceso catabólico altamente conservado a lo largo de la evolución, que garantiza la homeostasis del medio interno mediante la degradación y reciclaje de las organelas más antiguas o dañadas<sup>7, 8</sup>. Este mecanismo se pone en marcha ante situaciones de estrés celular como ocurre durante el ayuno o déficit energético, el estrés oxidativo o ante la invasión de patógenos intracelulares, originándose distintos productos (amino ácidos, ácidos grasos y ATP), que aseguran la supervivencia celular. <sup>5, 7</sup>

Del mismo modo, la autofagia constituye una potente barrera frente a la tumorogénesis gracias a la lisis de organelas dañadas y de proteínas oncocéntricas.<sup>7, 8</sup> Sin embargo, como se comenta más adelante, la autodigestión en los estadios tumorales más avanzados, puede desempeñar un rol totalmente

opuesto, favoreciendo la proliferación de células cancerígenas y la resistencia al tratamiento antitumoral.<sup>7, 8</sup>

Además de estar implicada en el proceso cancerígeno, la autofagia también se vincula al desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, infecciones y patología gastrointestinal, especialmente se relaciona con la enfermedad de Crohn.<sup>7</sup>

En las células eucariotas existen tres tipos no selectivos de autofagia que se describen a continuación.

**2.1.- En la microautofagia**, la membrana lisosomal forma pequeñas invaginaciones, que engloban parte de material citosólico para ser degradado en el interior del lisosoma.<sup>7,9</sup>

**2.2.- La macroautofagia**, o más comúnmente conocida por el nombre genérico de autofagia, consta de cuatro fases (figura 2).

En la primera fase, *de inducción*, es fundamental la disociación del regulador negativo mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) del complejo iniciador, para que pueda formarse el autofagosoma.<sup>9</sup>

Seguidamente, tiene lugar la *fase nucleación* que consiste en la formación de una membrana de aislamiento a partir principalmente del RE (retículo endoplasmático) o del aparato Golgi.<sup>9</sup>

En la tercera *fase de elongación*, esta membrana inicial o fagóforo, crece en extensión hasta sellarse sobre sí misma para formar una estructura cerrada de doble membrana denominada autofagosoma, que incluye en su interior una porción del citoplasma y el material que será degradado.<sup>9</sup>

Finalmente, el autofagosoma se fusiona con los lisosomas para formar el *autolisosoma*, donde el material secuestrado será degradado por las hidrolasas acidas del lisosoma.<sup>9</sup>

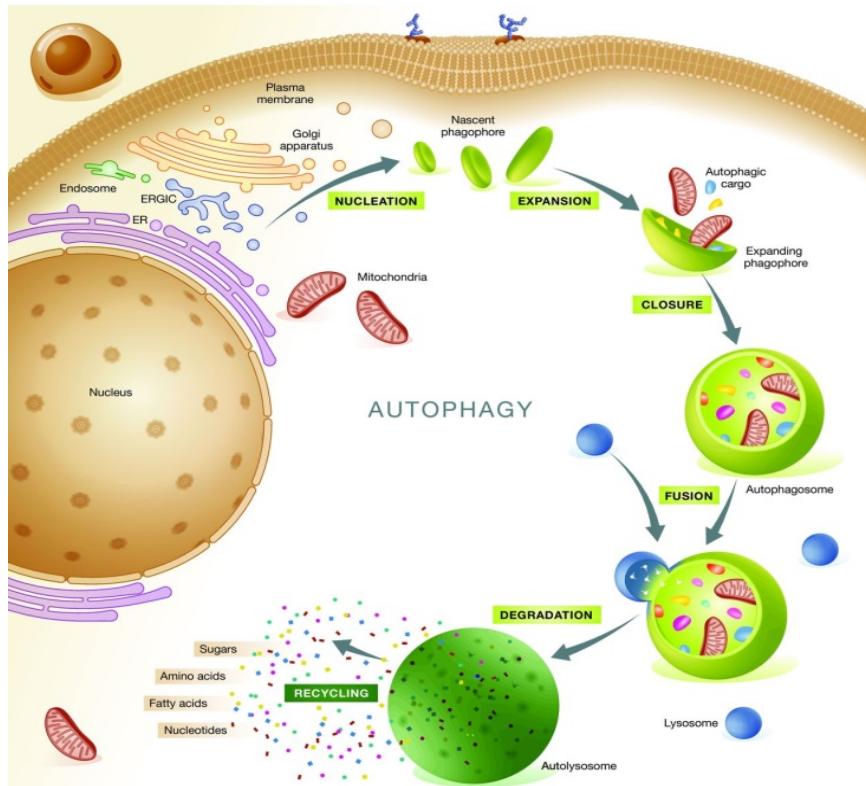


Figura 2. Fases de autofagia (Galluzzi L, et al. 2015).

**2.3.-La autofagia mediada por chaperonas** es específica de unas proteínas solubles del citosol que contienen un patrón específico de reconocimiento (KFERQ). Estas proteínas son incorporadas al lisosoma gracias a la proteína chaperona citosólica (Hsc70), que reconoce la secuencia KFERQ.<sup>7</sup>

Además de estos tres tipos, se han descrito unas rutas de autofagia altamente selectivas, acuñándose diferentes términos en función de la organela degradada, así por ejemplo si se trata de patógenos, se habla de xenofagia; en el caso de las mitocondrias, mitofagia; de los ribosomas, ribofagia; si son peroxisomas, peroxifagia...<sup>7,9</sup>

Esta modalidad de autofagia selectiva responde a alteraciones muy concretas de la homeostasis intracelular, mientras que las formas no selectivas de autofagia se desarrollan normalmente en respuesta a alteraciones celulares que suelen ser de naturaleza metabólica.<sup>7,9</sup>

Finalmente, cabe resaltar la importancia de contar con un mecanismo de degradación organela-específico ya que así se garantiza la degradación de aquellas moléculas que escapan de la acción de la macroautofagia.<sup>1,4</sup>

### 3.- AUTOFAGIA E HIPOXIA

La proliferación incontrolada de células cancerígenas conduce a la formación de extensas áreas hipóxicas. Estas regiones con bajo nivel de oxígeno son características de los tumores sólidos, y la adaptación tumoral a la hipoxia contribuye al desarrollo de fenotipos malignos. El déficit de oxígeno favorece el desarrollo de una estirpe celular muy agresiva ya que las células resistentes a la hipoxia consiguen desarrollar vías de supervivencia frente a la acción de los tratamientos anticancerígenos.<sup>5</sup>

La respuesta de las células tumorales a estas bajas concentraciones de oxígeno consiste en la secreción de VEGF (factor de crecimiento de endotelio vascular).<sup>5,7</sup> VEGF estimula la proliferación de nuevos vasos para asegurar el suministro de oxígeno y de nutrientes a estas células cancerígenas.<sup>5,7</sup> Sin embargo, esta nueva red vascular es defectuosa, los vasos neoformados son pequeños, aberrantes y tortuosos; por lo que, lejos de mejorar la perfusión tisular, contribuyen a la extensión de las áreas hipoperfundidas.<sup>5</sup>

En estas condiciones, la autofagia constituye una potente herramienta que favorece la supervivencia y proliferación tumoral.<sup>9</sup> La hipoxia junto con el déficit energético que se produce en las células tumorales, activa el proceso de autofagia consiguiendo el sustento necesario para asegurar la subsistencia de las células cancerígenas.

El nexo entre hipoxia y autofagia se establece gracias a HIF-1 (factor inducible de hipoxia).<sup>7</sup> HIF-1, está involucrado en procesos celulares que contribuyen al crecimiento y diseminación tumoral, como la regulación del pH, angiogénesis, invasión, metástasis y resistencia al tratamiento.<sup>7,10,11</sup>

Se trata de un factor de transcripción heterodimérico compuesto por una subunidad  $\alpha$ , que es lábil y sensible al oxígeno y por una subunidad constitutiva  $\beta$  o ARNT

(transportador nuclear del receptor de hidrocarburos) que no está regulada por la concentración de oxígeno.<sup>10,11</sup>

En condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado y degradado por el proteosoma. Pero, cuando disminuye la concentración de oxígeno, HIF-1 $\alpha$  es trasferido del citosol al núcleo, dónde se estabiliza mediante la unión con HIF-1 $\beta$  para formar HIF1, que activa la autofagia (figura 3).<sup>5</sup>

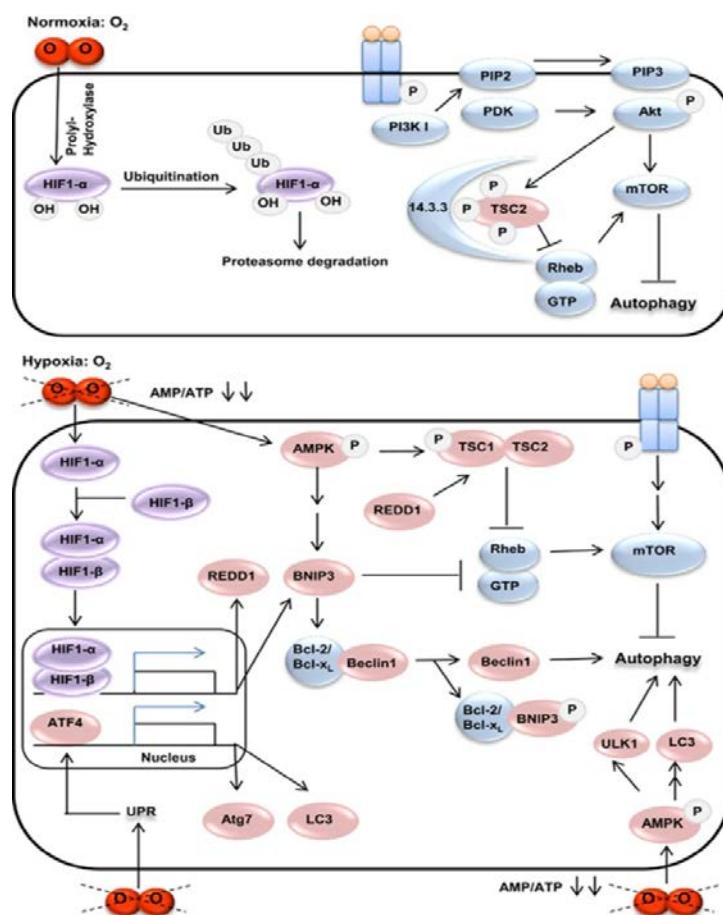


Figura 3. Inducción de la autofagia a través de la hipoxia (Jawhari S, et al 2016).

Por si esto no fuese suficiente, el déficit de energía generado por la hipoxia, produce un incremento de la ratio AMP/ATP, favoreciendo también la activación del proceso de la autofagia.<sup>5</sup>

Por último, es conveniente hacer una distinción entre los términos hipoxia (3-0,1%) y anoxia (<0,1%).<sup>10</sup> La autofagia inducida bajo condiciones de hipoxia, sin déficits de nutrientes ni alteraciones de pH, asegura la supervivencia celular.<sup>11</sup>

Sin embargo, condiciones de hipoxia severa o anoxia acompañada de bajos niveles de glucosa y pH disminuido, inducen una respuesta autofágica masiva que se asocia a la muerte celular.

#### **4- MUERTE MEDIADA POR AUTOFAGIA**

Además de la hipoxia, existen otros factores que también van a activar la autofagia en el GBM, como ocurre en situaciones de déficit energético, déficit proteico o alteraciones en el pH, que ponen en marcha este proceso con el fin de obtener la energía suficiente para asegurar la supervivencia celular.<sup>13,14</sup>

En ocasiones, se alcanza un grado de estrés celular demasiado intenso y se generan unos niveles de autofagia intolerables para la célula que dan lugar a un tipo de muerte celular conocida como “Muerte Celular Programada Tipo II” o muerte autofágica.<sup>13,14</sup>

Por un lado, se producen unos niveles de digestión citoplasmática inapropiados para la célula, con la formación de estructuras “Stone-like”, que es como se denomina a las células que han digerido por completo su citoplasma, y lo han sustituido por una sustancia amorfa y densa formada por proteína LC3 no digerida.<sup>13</sup> Pero además, como se generan tantos autofagosomas, llega un punto en el que se bloquea la unión lisosomal, produciéndose una acumulación excesiva de organelas y proteínas dañadas que no se pueden degradar.<sup>13</sup>

Por tanto, se puede considerar el mecanismo de autofagia como una balanza que puede ir a favor de la renovación celular y suministro energético, o bien, puede inclinarse hacia el lado contrario y mediar la muerte celular, en función de la intensidad de los estímulos que reciba.<sup>13,14</sup>

Este doble juego, puede convertir a la autofagia en un aliado antitumoral muy efectivo y a la vez constituir un potencial mecanismo de resistencia a los tratamientos.<sup>14</sup>

En los estadios más tempranos de la tumorogénesis, la autofagia constituye un potente mecanismo de eliminación de células anómalas. Sin embargo, estímulos nocivos como son la quimio y radioterapia también pueden poner en marcha el proceso autofágico, favoreciendo la resistencia al tratamiento. Aunque esta es una cuestión que se abordará más adelante, se propone el mecanismo de muerte autofágica para resolver este conflicto, es decir, aumentar la intensidad del daño que genera la terapia antitumoral para conseguir un colapso autofágico, que produzca la muerte de las células tumorales.<sup>15</sup>

## 5.-TRATAMIENTO DEL GLIOBLASTOMA

### 5.1 Tratamiento farmacológico actual: temozolamida

La TMZ (temozolamida) junto con la cirugía y la RT (radioterapia), constituye uno de los pilares básicos en el tratamiento del GBM, por lo que merece la pena detenerse a analizar con más detalle su mecanismo de acción.

Se trata de un agente aquilante de la familia de las imidazotetracinas que sufre una hidrolización espontánea a pH fisiológico dando lugar a su metabolito activo, MTIC (monometil triazenoimidazol carboxamida).<sup>17,20</sup>

El MTIC, a su vez, reacciona con el agua y genera un catión metildiazonio que es altamente reactivo. Este catión inestable transfiere el grupo metilo al ADN, concretamente a las posiciones O<sup>6</sup> y N<sup>7</sup> de la guanina y N<sup>3</sup> de la adenina.<sup>17</sup>

El efecto antitumoral de TMZ es atribuido, principalmente, a la metilación del ADN en la posición O<sup>6</sup>-guanina.<sup>17,20,21</sup> De esta forma, la guanina, con un grupo metilo en la posición O<sup>6</sup>, no puede unirse con su base complementaria, la citosina. En su lugar, se une a la tiamina, formándose una combinación aberrante que es reconocida por el sistema de reparación del ADN, que separa la cadena defectuosa que contiene tiamina. Con este mecanismo se evita la replicación del ADN, induciendo la apoptosis.<sup>21</sup>

El equipo de Stupp *et al.* en 2005 constataba un aumento en términos de supervivencia de 2,6 meses cuando se aplicaba TMZ de forma concomitante con RT.<sup>13</sup> No obstante, aunque la RT ejerce un efecto potenciador sobre la actividad de

la TMZ, este tandem queda muy lejos de conseguir la curación del GBM, en parte por el desarrollo de resistencias frente a la TMZ.<sup>17,18</sup>

## 5.2 Resistencias a la temozolamida

El fracaso terapéutico de la TMZ viene determinado por la capacidad de las células tumorales para eludir su acción citotóxica, de hecho, como se expone a continuación, son varios los mecanismos de resistencia que han desarrollado. <sup>14,17</sup>

### 5.2.1.-Mecanismo de autofagia

En función de las características del entorno celular, la autofagia puede desempeñar roles muy opuestos. Existen distintas circunstancias que ponen en marcha la respuesta autofágica y todas ellas coinciden en generar algún tipo de estrés celular, sin embargo, hay situaciones en las que el mecanismo de autofagia actúa a modo de barrera terapéutica favoreciendo la perpetuación tumoral.

Así, en respuesta a dosis iniciales de RT o TMZ, o incluso si las dosis no son lo suficientemente potentes, el mecanismo de autofagia se activará para intentar frenar el daño celular que generan estos agentes. Concretamente, lo que se pretende con la TMZ es inducir un daño en el ADN celular que acabe con las células cancerígenas, pero la autofagia actúa intentando paliar este efecto lesivo, disminuyendo la eficacia terapéutica del fármaco.

Para solucionarlo se activa la vía de la muerte autofágica. Al incrementar la dosis de TMZ, se consiguen alcanzar niveles de autofagia más intensos, hasta el punto de resultar intolerables para la célula, que al final acaba agotándose y claudica<sup>14</sup>. De esta manera, el objetivo es encontrar una dosis de TMZ que no supere los límites de toxicidad, pero sea capaz de inducir muerte autofágica. <sup>13, 14, 19</sup>

### 5.2.2.- MGMT o O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN-metiltransferasa

Existe un número importante de pacientes, que de forma constitutiva presentan unos niveles de expresión de la enzima MGMT mucho más elevados que el resto, prediciéndose un fracaso seguro al tratamiento con TMZ.

Indudablemente, uno de los principales mecanismos de resistencia a TMZ está vinculado a esta enzima. MGMT actúa retirando los grupos metilo de la guanina O<sup>6</sup>, y de este modo repara la lesión provocada por el agente quimioterápico.<sup>14, 17,21</sup>

Muchos autores catalogan el mecanismo de esta enzima como “suicida” porque actúa fijando el grupo metilo que retira de la guanina a la cisteína de su bolsillo catalítico, induciendo así su propia inactivación.<sup>17</sup>

Varios ensayos clínicos han probado la eficacia de moléculas inhibitorias de MGMT, como la O<sup>6</sup>-benzil guanina (O<sup>6</sup>-BG) o la O<sup>6</sup>-4-bromotrienil-guanina. Estas enzimas interaccionan con MGMT y le transfieren su grupo benzilo o bromotrieno al residuo activo de la cisteína, provocando la inactivación irreversible de MGMT.<sup>14, 17</sup>

Pero, desafortunadamente, la elevada toxicidad de estas moléculas, especialmente a nivel de medula ósea, hace inviable su utilización.<sup>17</sup>

### 5.2.3.- Otras moléculas relacionadas mecanismos de resistencia

**Sobreexpresión EGFR.** EGFR estimula la proliferación y la migración celular, la angiogénesis y la resistencia tumoral a la quimioterapia.<sup>17</sup> Aunque se han desarrollado varias moléculas para inhibir la vía de este receptor (cetuximab, gefitinib, erlotinib entre otras), ninguna de ellas ha demostrado mejoras significativas en términos de supervivencia.<sup>17</sup>

**Galectina-1.** Esta proteína también se halla implicada en la progresión tumoral y en la resistencia a la quimio-radioterapia pero, además, su producción está estimulada por la hipoxia, de ahí su importancia en el GBM.<sup>17</sup>

Se ha propuesto el uso de las β-galactosidasas y de galactomanan (Davanat®), como estrategias contra la Galectina-1, aunque se necesitan estudios más minuciosos para valorar su efectividad.<sup>17</sup>

**p53 y Mdm2.** p53 es una proteína supresora que puede inducir un cese temporal o permanente del crecimiento celular en respuesta al estrés, como el que producen las alteraciones del ADN.<sup>17</sup>

Las mutaciones de p53 son una de las alteraciones más constantes en los GBM secundarios, generando la pérdida de su función supresora, así como acumulación de estas proteínas p53 mutadas que no pueden ser reconocidas por Mdm2.

El pool de p53 nuclear actúa induciendo la expresión de diferentes genes implicados en la autofagia.<sup>22</sup> Si se altera la funcionalidad de p53, se inhibe la inducción de un gran número de reguladores positivos de la autofagia, y por consiguiente se frena la muerte autofágica.

Por otro lado, Mdm2 es un gen que suele estar amplificado en el GBM. Su expresión aumentada provoca pérdida de función de p53 lo que permite el crecimiento celular y la resistencia a la quimiorradioterapia.

Debido a las importantes consecuencias que tiene la deficiencia de p53 en el desarrollo de GBM y la resistencia al tratamiento antitumoral, se han propuesto varias estrategias para restaurar el efecto de p53. Una de las más aceptadas actualmente, es la nutilina-1, una molécula que se une a Mdm2, evitando que ésta inhiba a p53 y permitiendo que la autofagia siga activa.

**PTEN.**PTEN es una enzima con función antitumoral, frecuentemente mutada en el GBM, que produce un aumento de la proliferación de células neoplásicas.<sup>17</sup>

Esta enzima protege a p53 de su inactivación y degradación con lo que la asociación entre PTEN y p53 puede aumentar la sensibilidad del tumor a las terapias anticancerígenas, especialmente a la TMZ.<sup>17</sup>

### **5.3 Estrategias para vencer resistencias de la TMZ**

A pesar de los avances terapéuticos que se han venido realizando hasta ahora, el desarrollo de resistencias por parte de las células tumorales, determina un pronóstico devastador para aquellos pacientes con GBM.

Se ha propuesto como posible solución, además de la combinación de RT y TMZ, el uso de agentes inductores o inhibidores de la autofagia con el fin de incrementar la efectividad del tratamiento antineoplásico.<sup>12, 20</sup>

**5.3.1.-Inhibidores de la autofagia.** En función de la fase autofágica sobre la que actúan podemos diferenciar entre bloqueadores tempranos y tardíos:

**Los bloqueadores tempranos** actúan en las primeras etapas de la autofagia, evitando la formación del autofagosoma, suprimiendo así un importante suministro energético y citoprotector para la célula.

Este hecho, de por sí, genera la muerte celular de una importante fracción de células tumorales.<sup>13</sup> Pero además, al bloquear la formación de autofagosomas se genera un importante déficit energético, que unido a la actividad lesiva ocasionada por TMZ y RT, potencia la muerte autofágica.<sup>13</sup>

Algunos ejemplos de bloqueadores tempranos de los que se tiene más experiencia son 3-MA (3-metiladenina) o shARN Beclin- 1 (ARN silenciador de Beclin-1).<sup>21</sup>

**Los bloqueadores tardíos** intervienen en fases más avanzadas. En este caso permiten la formación del autofagosoma, pero evitan su fusión con los lisosomas. De esta manera, estas sustancias, impiden que se genere energía para el aprovechamiento celular y cargan a la célula con organelas dañadas que no serán degradadas.<sup>13</sup>

Por tanto, al igual que ocurría con los anteriores, estos bloqueantes consiguen activar la apoptosis de un porcentaje de células malignas a través del déficit energético generado; pero, además, sobrecargan a la célula de “desechos”, generando una situación de gran estrés celular.<sup>13</sup>

La CQ (cloroquina) e hidroxicloroquina son agentes antipalúdicos que actúan a este nivel como bloqueantes “tardíos” de la autofagia y se han propuesto como potentes candidatos al tratamiento combinado con TMZ.<sup>13, 14</sup>

La administración de CQ genera un aumento de pH intralisosómico e inactiva a esta organela, lo que se traduce en el bloqueo de la degradación del autofagosoma.<sup>24</sup> Concretamente, la CQ actúa inhibiendo los niveles de mitofagia (o autofagia mitocondrial), aumentando los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que son una de las principales causas de daño y disfunción mitocondrial.<sup>14,21</sup>

El efecto antitumoral de la TMZ, junto con la administración conjunta de CQ aumenta la respuesta al tratamiento antineoplásico. Por otro lado, la combinación

del análogo, hidrocloroquina y TMZ aumenta notablemente en número de autofagosomas aberrantes (“*Stone-like*”) en sangre periférica, sin embargo, hay que tener cuidado con este compuesto por su posible toxicidad.<sup>14</sup>

### **5.3.2.-Los inductores de la autofagia**

Actúan potenciando esta vía como mecanismo de muerte celular. Así, en combinación con el tratamiento clásico del GBM, los inductores de la autofagia consiguen elevar los niveles de autodigestión hasta conseguir inclinar la balanza hacia muerte celular a través del agotamiento lisosomal y la degradación citoplasmática (formación de estructuras “*Stone-like*”).<sup>13</sup>

Dentro de este grupo, los cannabinoides cobran especial protagonismo al inducir la muerte autofágica a través de la vía de estrés del RE, con unos niveles de toxicidad realmente bajos.

#### **5.3.2.1.-*Cannabis Sativa***

El THC ( $\Delta^9$ - tetrahidrocannabinol), uno de los principios activos del *Cannabis Sativa* ejerce distintas funciones biológicas a través de su unión a receptores cannabinoides específicos CB-1 y CB-2, mimetizando la acción de sustancias endógenas.<sup>19,25</sup>

La mayoría de los efectos de los cannabinoides (endógenos y exógenos) en el SNC se deben a la activación del receptor CB-1. No obstante, la expresión de CB-1 no está limitada al SNC, sino que este receptor se expresa ampliamente en distintas localizaciones, como sistema nervioso periférico, retina, testículos, corazón, intestino delgado, próstata, vejiga y útero.<sup>19, 25,26</sup>

Los receptores CB-2 están especialmente vinculados con el sistema inmunitario y se encuentran principalmente en macrófagos y en el bazo, aunque actualmente también se han identificado en astrocitomas y otras poblaciones neuronales.<sup>18,24,25</sup>

Los cannabinoides presentan una actividad pro-apoptoica limitada a las células tumorales, pero además, son capaces de evitar la angiogénesis y la invasión metastásica<sup>25, 26,27</sup>

Su actividad anticancerígena bien dada por la vía de estrés de RE (vía de señalización de p8), a través de la cual se induce la muerte autofágica.<sup>19, 25, 27,29</sup>

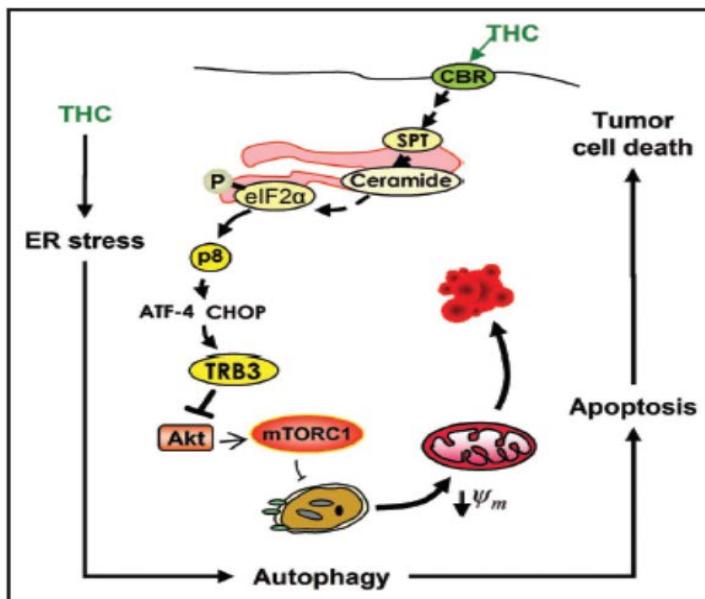


Figura 4. Mecanismo de acción antitumoral de los cannabinoides (Salazar M. et al., 2009).

### 5.3.2.2.-Uso de cannabinoides en terapias combinadas frente al GBM

El uso concomitante de TMZ y THC ha demostrado una fuerte acción sinérgica en el tratamiento antitumoral de modelos experimentales. De hecho, se ha comprobado que la combinación de estos dos agentes inhibe el crecimiento tumoral de una forma mucho más potente que cuando actúan por separado e incluso son eficaces en aquellos GBM resistentes a TMZ.<sup>19,25</sup>

Ciertamente, existe un porcentaje muy elevado de pacientes con GBM que muestran resistencia innata a la TMZ. Esta resistencia se relaciona con el aumento de expresión de la enzima MGMT, que cataliza la remoción de los grupos metilo añadidos a la posición 6 de la guanina, neutralizando el efecto citotóxico de la TMZ.<sup>19,25</sup>

Cabe destacar, que el efecto concomitante de THC y TMZ consigue vencer estas resistencias, pero, sin modificar la expresión de MGMT. Este hecho viene a reafirmar que el mecanismo de actuación de este tandem se basa en fuerte estímulo

que ejercen al inducir la muerte autofágica, que incluso consigue vencer la acción de esta enzima.<sup>19</sup>

Existen otras líneas de investigación que ponen su atención en el CBD o cannabinidol. El CDB es un compuesto no-psicoactivo, que al administrarlo junto con THC incrementa el efecto antitumoral de este agente y además, disminuye la dosis necesaria de THC para conseguir los mismos efectos antitumorales y antiangiogénicos.<sup>19,25</sup>

Por tanto, al ser necesaria una dosis menor de THC para conseguir el mismo efecto terapéutico se reduce el número de efectos secundarios de esta sustancia: descoordinación, convulsiones, síntomas psicóticos aumentando la tolerancia a este agente.<sup>25</sup>

En definitiva, la combinación de TMZ, THC y CBD que muestra unos niveles de toxicidad prácticamente nulos, se plantea como una potente estrategia terapéutica para el tratamiento del GBM.<sup>19, 25,29</sup>

# Discusión

---

La inclusión de la TMZ en el tratamiento del GBM ha supuesto un gran avance, sin embargo, apenas se ha conseguido mejorar su pronóstico en términos de supervivencia. El fracaso terapéutico radica principalmente, en la existencia de diferentes mecanismos de resistencia celular frente a la TMZ.

Tras la administración de TMZ, la autofagia se pone en marcha al detectar daño celular para intentar deshacer el efecto lesivo generado por el fármaco. De este modo disminuye la eficacia del tratamiento.

Una posible solución a este problema pasaría por aplicar una dosis más elevada de TMZ para inducir una muerte por autofagia. Sin embargo, desde el punto de vista clínico habría que valorar riesgo – beneficio de cada paciente, ya que quizás no compense asumir los efectos secundarios (náuseas, vómitos, cefalea...) de un fármaco que además no garantiza la curación.

Las nuevas estrategias terapéuticas utilizan la doble funcionalidad de la autofagia en el GBM y “moldean” este proceso en función de lo que se necesita en cada momento de la enfermedad. Se perfilan, fundamentalmente, tres líneas de acción; una basada en el bloqueo temprano de la autofagia; otra que ejerce un bloqueo tardío sobre la autofagia inhibiendo la fusión lisosomal, y una tercera estrategia consistente en la inducción de muerte autofágica.

Dentro de los distintos compuestos que se están estudiando, la CQ como bloqueante tardío, es una de las opciones que más fuerza están tomando. Al igual que los cannabinoides, que actúan como inductores, y también auguran resultados prometedores.

Llegados a este punto, y con la información expuesta, la pregunta que cabría hacerse es la siguiente: ¿De todas las opciones que se plantean, cuál es la mejor de todas?

El punto de partida para plantear un buen abordaje terapéutico es asumir de entrada, el carácter recidivante del GBM. Hay que tener claro desde el principio, que pese a conseguir una exéresis quirúrgica completa, existe una probabilidad muy alta de que el tumor reaparezca.

Sabiendo esto, lo más útil tras la cirugía sería contar con un mecanismo de autofagia potenciado, capaz de eliminar aquellas células cancerígenas residuales. El planteamiento posquirúrgico a día de hoy, consiste en administrar varias sesiones de radio-quimioterapia adyuvante para eliminar los restos tumorales que hayan podido quedar, estos agentes lo que consiguen al final es inducir una muerte autofágica con lo que eliminan por completo la función citoprotectora de la autofagia, que es la que interesaría potenciar en este momento.

Una vez que el GBM ya se ha establecido, el planteamiento cambia. En este contexto la autofagia ejerce un papel enemigo, al favorecer la perpetuación de las células malignas y la resistencia al tratamiento radio-quimioterápico.

La CQ se plantea como potencial candidata para el tratamiento del GBM porque además de bloquear el proceso autofágico, cuenta con la ventaja de ser un antipalúdico comercializado, por lo que ya se tiene conocimiento de su perfil de seguridad.

El empleo de la CQ induce la apoptosis de las células cancerígenas al provocar un bloqueo tardío de la autofagia. Pero a la vez, ejerce un efecto sinérgico al combinarlo con TMZ, de modo que si las células escapan de su acción finalmente será la TMZ la que consiga inducir sobre ellas una muerte autofágica. Al bloquear la unión lisosomal, la CQ corta una importante vía de suministro energético y además carga a las células con residuos tóxicos que no pueden ser eliminados, generando un entorno de elevado estrés celular, el idóneo para potenciar la acción de la TMZ.

Aunque el *Cannabis* se emplea desde hace tiempo en procesos oncológicos y terminales, su potencial curativo es algo que se ha conocido recientemente. Por ello, todavía no se tiene demasiada experiencia con el empleo de esta sustancia a dosis terapéuticas.

Se ha comprobado que administración concomitante de THC y TMZ permite inducir una muerte autofágica utilizando una dosis menor de ambos compuestos, lo que supondría una disminución de los efectos secundarios de la quimioterapia. Además, para contrarrestar los efectos alucinógenos del *Cannabis*, contamos con

el CBD, un cannabinoide no psicoactivo que potencia el efecto de THC permitiendo usar una dosis menor *Cannabis* para conseguir el mismo efecto terapéutico.

Retomando la cuestión que se planteaba antes, en primer lugar, recalcar que la TMZ sigue siendo el fármaco de elección en el tratamiento del GBM, de hecho, casi todas las alternativas se plantean en combinación con este medicamento. En esta área todavía queda mucho camino por recorrer, con la búsqueda de nuevos tratamientos que eliminen las resistencias a la TMZ.

Por último y para concluir, subrayar la actividad de la CQ en combinación con TMZ, que se plantea como una de las estrategias más sólidas y seguras para el tratamiento del GBM.

# Conclusión

---

La resistencia a la TMZ, principal y único fármaco para el tratamiento del GMB, es una de las principales limitaciones que plantea el manejo de este tumor. La regulación del proceso de la autofagia se plantea como una alternativa novedosa para combatir la resistencia a la TMZ que se produce en las células tumorales.

En este sentido, se está trabajando en la búsqueda de compuestos que puedan modular dicho proceso. Dos estrategias son las que están tomando fuerza, una que propone el uso de compuestos que bloquen dicho proceso, con el fin de inducir la muerte por apoptosis, y otra que juega en sentido opuesto buscando una activación del mismo que conduzca a la muerte mediada por la autofagia.

# **Bibliografía**

---

- 1.- González Trujillo F, Castro Noriega C, Castro Ramírez OJ, Olaya N, Penagos González PJ, Zubieta Vega C, et al. Glioblastoma multiforme: actualidad en marcadores biomoleculares como factores de pronóstico a propósito de una serie de casos con sobrevida mayor a 2 años en el Instituto Nacional de Cancerología. INC- Colombia. *Acta Neurol Colomb.* 2014; 30(4):282-9.
- 2.- Karsy M, Gelbman M, Shah P, Balumbu O, Moy F, Arslan E. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. *Folia Neuropathol.* 2012; 50 (4): 301-21.
- 3.- Castañeda CA, Casavilca S, Orrego E, García-Corrochano P, Deza P, Heinike H, et al. Glioblastoma: análisis molecular y sus implicancias clínicas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2015; 32 (2):316-25.
- 4.-American Brain Tumor Association (ABTA). Chicago.
- 5.-Jawhari S, Ratinaud MH, Verdier M. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone ménage-à-trois'. *Cell Death and Disease.* .2016; 7(10):e2434.
- 6.-Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A , Figarella-Branger D, Cavenee WK, et all. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.*2016. 131:803-820
- 7.- Peña-Sanoja MJ, De Sanctis JB. Autofagia y respuesta inmunitaria. *Invest. Clín.* 2013; 3(54):1-13
- 8.- Xue H, Yuan G, Guo X, Liu Q, Zhang J, Gao X, et al. A novel tumor-promoting mechanism of IL6 and the therapeutic efficacy of tocilizumab: Hypo xia-induced IL6 is a potent autophagy initiator in glioblastoma via the p-STAT3-MIR155-3p-CREBRF pathway. *Autophagy.* 2016; 12(7): 1129–52.
- 9.-Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK ,Baehrecke EH,Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal.* 2015; 34(7):856-80.
- 10.- Boticario Boticario C, Cascales Angosto M. Hipoxia y cáncer. *An.R.Acad.Nac.Farm.* 2010 ; 76(3):379-408.
- 11.- Mazure N, Pouysségur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Current Opinion in Cell Biology.* 2010; 22(2): 177–180.
- 12.-Lizarbe Iracheta MA. El suicidio y la muerte celular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp).* VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica. 2007; 101(2).
- 13.- Koukourakis MI, Mitrakas AG, Giatromanolaki A. Therapeutic interactions of autophagy with radiation and temozolomide in glioblastoma: evidence and issues to resolve. *British Journal of Cancer.* 2016 ; 114: 485–96 .
- 14.- Yuanliang Y, Zhijie X, Shuang D, Long Q, Lunquan S, Zhicheng G. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment.. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2016; 35:23.
15. - Zhineng JY, Cheng EC, Shengbing H, Sinicrope FA. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther.*2011; 10(9): 1533–4.
- 16.- Zhaocai L, Xingang X, Yong H, Li D, Zhisheng W, Gaoshui Y, et all. Swainsonine Activates Mitochondria-mediated Apoptotic Pathway in Human Lung Cancer A549 Cells and Retards the Growth of Lung Cancer Xenografts. *Int J Biol Sci.*2012; 8(3):394-405.
- 17.- Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. *Drug Discovery Today.*Mar 2015; 20(7): 899-905.
- 18.- Moscote Salazar LF, Meneses García C, Sáenz Amuruz M, Penagos P, Zubieta C, Romero Rojas AE. Manejo actual del glioblastoma multiforme. *Rev.cienc.biomed [Internet]* 2010[citado 24 mar 2017]; 1 (2): 237–45.
- 19.- Torres S, Lorente M, Rodríguez-Fornés F, Hernández-Tiedra S, Salazar M, García-Taboada E, Barcia J, Guzmán M, Velasco G. A Combined Preclinical Therapy of Cannabinoids and Temozolomide against Glioma. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10(1).

**20.-** Anexo I: Ficha técnica o resumen de las características del producto. En: Harvoni 90mg/400mg comprimidos recubiertos con película. Vademedicina. [Actualizado 30 nov 2015].

**21.-** Aoki T, DM, DP, Hashimoto N, Matsutani M. Management of glioblastoma. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2007; 8 (18): 3133-46.

**22.-** Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Oliver Kepp O, Malik SA, Kroemer G. Autophagy regulation by p53. Current Opinion in Cell Biology. 2010; 22(2): 181–5.

**23.-** Chenguang L, Yaohua L, Huailei L, Weiguang Z, Chen S, KenKa C, *et al*. Impact of Autophagy Inhibition at Different Stages on Cytotoxic Effect of Autophagy Inducer in Glioblastoma Cells. Cell Physiol Biochem. 2015; 35:1303-16.

**24.-** Pascolo S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. European Journal of Pharmacology. Dic 2015; 771: 139-144.

**25.-** Velasco G, Hernández-Tiedra S, Dávila D, Llorente M. The use of cannabinoids as anticancer agents. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 2016; 64(4):259–66.

**26.-** Duran M, Laporte JR, Capellà D. Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el Sistema cannabinoide. Med Clin.2004; 122(10):390-8.

**27.-** Salazar M, Carracedo A, . Salanueva IJ, Hernández-Tiedra, S, Egia A, *Et al*. TRB3 links ER stress to autophagy in cannabinoid anti-tumoral action. Autophagy. Oct 2009; 5(7):1048-9.

**28.-** Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews Cancer*. Jun 2012; **12**: 436-44.

**29.-** Velasco G. Hacia la utilización de cannabinoides en terapias antitumorales. SEBBM. 2013.

