

Posibilidades en el diagnóstico bioquímico del cáncer

A. Gómez Espejo, J. M. Pena Ezquerro, R.M. Ras

Resumen

Los marcadores tumorales más usados actualmente en la práctica clínica se caracterizan por su baja sensibilidad y su poca especificidad de órgano o proceso maligno. En general, tienen su mejor aplicación en el control de la terapia, no siendo útiles como método de diagnóstico. La malignización de las células tumorales se produce esencialmente por un desorden en el crecimiento celular, por ello cualquier sustancia que se encuentre implicada en este crecimiento o regulación celular puede ser un objetivo de búsqueda de nuevos marcadores tumorales. Dentro del crecimiento celular existen diferentes procesos biológicos con numerosas moléculas implicadas que podrían llegar a ser un buen marcador tumoral: el propio ciclo celular y sus reguladores, la apoptosis, angiogénesis, metástasis y otros muchos derivados del estudio genómico.

Los llamados proto-oncogenes son genes normales presentes en la célula. Cuando se produce una mutación en estos proto-oncogenes, los convierte en oncogenes que son los responsables de que una célula normal se transforme en cancerosa. Los productos de estos genes (oncoproteínas) son versiones alteradas de las proteínas implicadas en el crecimiento y diferenciación celular: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento como Her-2/neu, componentes citoplásmicos de la transducción intracelular de señales como la familia ras, factores implicados en la regulación de la transcripción génica, como myc. Posteriormente, se descubrieron ciertos factores presentes en las células normales que podían bloquear la tumorigenicidad de las células malignas y se les denominan genes supresores de tumores. Es su inactivación o pérdida de función lo que conduce al cáncer. Entre ellos se encuentran: retinoblastoma, p53, p16, APC y brca. Las investigaciones recientes del mecanismo de regulación de la apoptosis muestran una tercera categoría de genes; estos son llamados genes suicidas o genes inhibidores del suicidio o, lo que es igual, genes estimuladores o inhibidores de la apoptosis: ced, bcl-2 y ras.

El desarrollo de nuevos vasos es la base para el crecimiento maligno y favorece en gran medida la metástasis. Generalmente los tumores en su comienzo son no angiogénicos y permanecen dormidos y sin vascularización, estando limitados en una zona totalmente localizada. La conversión a un tumor invasivo depende de la interacción entre los factores angiogénicos positivos (VEGF, angiogenina, endostatina) y negativos (inhibidores de proteasas, angiostatina, TPS). La metástasis o migración de las células cancerosas a través de los tejidos, vasos sanguíneos y membranas a otro segundo lugar está ligado en gran medida a la angiogénesis. Para que una célula migre a través de los tejidos tiene que perder el contacto con sus células vecinas, cruzar la membrana basal y la matriz extracelular. Los componentes de la membrana basal, junto con las moléculas de adhesión y las enzimas que actúan en la lisis de la matriz pueden ser marcadores tumorales. El conocimiento de los mecanismos moleculares reguladores de la biología e interacción celulares va aportando nuevas estrategias de diagnóstico, pronóstico, detección precoz de recidivas junto con posibilidades de terapias más eficaces.

Palabras clave: marcadores tumorales, ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, metástasis.

Summary. Perspectives on biochemical diagnosis of cancer

In current clinical practice, most used tumor markers are characterized by their low organ or malignant process sensitivity and specificity. In general, their best application is in monitoring the therapy, not being useful as a screening method. Since cell malignancy is basically due to a disorder in cell growth, any substance related to this growth or its regulation can be an objective for research on new tumor markers. Different biological processes exist inside the cellular growth with numerous molecules involved which could become a good tumor marker: the cell cycle itself and their regulators, apoptosis, angiogenesis, metastases and many others derived from genomic studies.

So-called proto-oncogenes are genes normally present in the cell. A mutation in these genes can change them into oncogenes which are responsible for the transformation of the cell into a cancerous one. These genes will codify for mutated proteins (oncoproteins) which are implied in cell growth and differentiation: growth factors and their receptors like Her-2/neu, cytoplasmic components of intracellular signal transduction like the ras family, factors related to the regulation of genetic transcription, as myc. Later on, certain factors in normal cells, which can block the ability of malignant cells to build up a tumor, were discovered and they were called tumor-suppressing genes. For example: retinoblastoma, p53, p16, APC and BRCA. Their suppression or loss of function leads to cancer. Recent investigations on mechanisms of apoptosis show a third category of genes; these are called suicide genes and suicide-inhibiting genes, i.e. stimulating or inhibiting genes for apoptosis: ced, bcl-2 and ras.

The development of new vessels is the basis for malignant growth and it greatly helps metastasis. In general, tumors at the early stages are not angiogenic because they remain silent, located without vascularization and in a located area. Conversion to an invasive tumor depends on the interaction between positive (VEGF, angiogenin, endostatin) and negative (protease inhibitors, angiostatin, TPS) angiogenic factors. The metastases or migration of the cancerous cells through tissues, vessels and membranes to a second place is related to angiogenesis. A cell has to loosen its unions with neighbour cells, cross the basal membrane and the extracellular matrix so as to migrate through tissues. All the components of the basal membrane, adhesion molecules and enzymes which have a role in the lysis of the matrix can be candidate to tumor markers. The knowledge of molecular mechanisms that regulate cellular biology and interaction is contributing with new strategies for screening, prognosis, and early relapse detection together with the possibility of more effective therapies.

Key words: tumor markers, cell cycle, apoptosis, angiogenesis, metastasis.

INTRODUCCIÓN

El estudio del cáncer por el laboratorio clínico ha estado ligado a un conjunto de líneas de trabajo que han proporcionado los marcadores tumorales, con gran utilidad clínica en la actualidad. Así cabe destacar:

a) **Proteínas oncofetales:** Moléculas importantes en el periodo embrionario cuya expresión queda anulada después del parto y que puede recuperarse en determinadas situaciones clínicas, como la presencia de un tumor maligno. Las más conocidas son la α 1-Fetoproteína y el Antígeno carcinoembrionario (CEA).

b) **Enzimas:** Dentro de las proteínas catalíticas presentes en tejidos y líquidos biológicos, algunas pueden elevarse significativamente en relación con la presencia de tumores malignos, como γ -Glutamyl-transferasa (GGT) (EC 2.3.2.2), L-Lactato-deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27), Glucosa-6-fosfato-isomerasa (EC 5.3.1.9), y Fosfatasa Alcalina (FAL) (EC 3.1.3.1), las cuales son poco específicas pero de gran valor sobre todo en metástasis. Otras son específicas de órgano o tejido como Antígeno específico de próstata (PSA) y otras no tanto como la Enolasa específica neuronal (NSE).

c) **Hormonas:** Se han estudiado proteínas placentarias como la gonadotropina coriónica humana (hCG); así como un grupo de hormonas ectópicas responsables de los síndromes paraneoplásicos que acompañan a determinados tumores: Corticotropina (ACTH), Vasopresina (ADH), Calcitonina.

d) **Mucinas:** Macromoléculas (mucoproteínas, glicolípidos) caracterizadas por la obtención de diversos anticuerpos monoclonales que reaccionan con proteínas de superficie de las células de determinadas neoplasias mamarias (antígeno CA 15.3), colon (antígeno CA 19.9), ovario (antígeno CA 125).

e) **Proteínas derivadas del citoesqueleto:** Las citoqueratinas son proteínas estructurales que forman las subunidades de los filamentos intermedios de los epitelios. Las moléculas intactas son por tanto muy insolubles, pero sus fragmentos, producidos en diferentes situaciones patológicas como la invasión neoplásica, pueden circular como péptidos solubles en suero. Las determinaciones de algunos de estos fragmentos tienen valor como marcadores tumorales de alta sensibilidad pero baja especificidad, así como el Antígeno polipeptídico tisular (TPA), Antígeno polipeptídico tisular específico (TPS) y CYFRA 21.1.

Actualmente, la aplicación a la clínica de estas líneas de investigación ha dado lugar a una serie de determinaciones cuyo nombre más usual es el de marcadores tumorales. Estas magnitudes han sido ampliamente estudiadas en sus diferentes usos clínicos, existiendo en la actualidad varias recomendaciones de sociedades científicas (1). En general, puede decirse que son poco útiles en cribado, algo más en diagnóstico y pronóstico, y sobretodo de gran utilidad en control de tratamiento y detección de recidivas. En este último caso, son consideradas como el método más sensible y barato comparativamente con otras pruebas no bioquímicas como por ejemplo las técnicas de imagen. Así enfocado el tema, entendemos por Marcador Tumoral un conjunto de moléculas presentes en sangre u otros líquidos biológicos cuya concentración se correlaciona con la presencia o crecimiento de tumores malignos y por lo tanto su determinación ayuda en el manejo del paciente con cáncer (2).

En general, lo ideal sería que la célula liberase estas sustancias tras su transformación maligna y solo en este caso, pero desgraciadamente los marcadores tumorales de secreción,

salvo raras situaciones, no sirven para establecer un diagnóstico, ya que existen muy pocos marcadores tumorales con una sensibilidad y especificidad del 100% o un valor cercano. Normalmente, con asociaciones entre varios de ellos se consigue entre un 65 y un 85%. Todas estas limitaciones van a condicionar u orientar la investigación en el futuro, tanto mejorando lo ya conocido como iniciando nuevas líneas en campos hasta hoy poco conocidos.

Si se considera conjuntamente las aplicaciones conocidas de los marcadores tumorales, los puntos débiles de su utilidad y los últimos avances metodológicos en Oncología Molecular cabe pensar que el futuro más inmediato puede ir más ligado a un diagnóstico precoz de la población y a un cribado de grupos de riesgo.

BÚSQUEDA DE NUEVOS MARCADORES

Como ya ha quedado reflejado, el marcador ideal sería aquel que fuese producido exclusivamente por la célula neoplásica.

Debido a que la malignidad de las células tumorales se produce esencialmente por un desorden en el crecimiento celular, cualquier sustancia que se encuentre implicada en él o en su regulación, puede llegar a ser un buen marcador tumoral. Dentro de este crecimiento hay diferentes procesos biológicos como replicación del DNA, división celular, apoptosis y numerosas moléculas implicadas en ellos, las cuales podrían ser un objetivo de búsqueda de nuevos marcadores.

Entre ellos nos encontramos con sustancias implicadas en:

– **Ciclo celular:** El objetivo de este es replicar el DNA, orgánulos y masa celular para así obtener dos células hijas idénticas a la madre. Esto está regulado por una compleja red de interacciones en la que intervienen proteínas intracelulares (nucleares y citoplasmáticas) así como receptores de membrana y sustancias extracelulares. Una alteración en ellas conlleva a que una célula se transforme en cancerosa.

– **Apoptosis:** Es un proceso natural que utiliza el organismo para reemplazar las células, y está regulado por una serie de proteínas tanto inhibitoras como inductoras de la apoptosis.

– **Angiogénesis:** Es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, el cual favorece la metástasis. El conseguir regular las sustancias implicadas en este proceso, podría ser una esperanza para nuevas terapias frente al cáncer.

– **Marcadores genéticos:** La desregulación de la expresión de protooncogenes o la inactivación de los genes supresores de tumores ayuda a la transformación de las células. Las posibles causas que pueden llevar a esta desregulación son: traslocación, inserción vírica, satélites, etc.

– Otros marcadores genéticos implicados en el cáncer son la telomerasa y el DNA mitocondrial.

MARCADORES DEL CICLO CELULAR

El crecimiento es el balance entre la división celular y la muerte celular. El proceso de división celular comienza cuando la célula alcanza un determinado tamaño o recibe una señal apropiada. El objetivo de la división celular, es replicar el DNA total así como los orgánulos y la masa celular para obtener como producto dos células hijas capaces de asumir la misma función que la célula madre de la que proceden.

El proceso por el que una célula da lugar a dos células hijas se denomina ciclo celular, y consta de cuatro fases: G1, S, G2, M y dura una media de 24 horas (3).

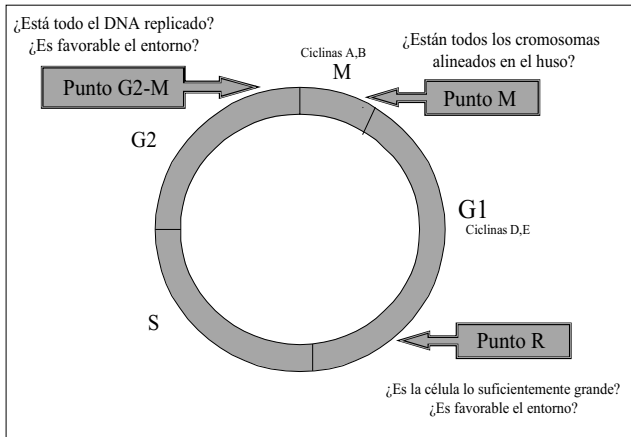


Figura 1 Control del ciclo celular.

– Fase G1: Fase previa a la síntesis de replicación del DNA. Es la fase de síntesis de los componentes de la célula, así la célula dobla tanto su tamaño como su masa. Las células en esta fase pueden detener su progresión en el ciclo celular, y entrar en una fase de reposo, llamada fase G0, en la que puede permanecer días, semanas o incluso años antes de proliferar.

– Fase S: Es la fase de síntesis o replicación del DNA.

– Fase G2: Fase previa al comienzo de la mitosis.

– Fase M: Es la fase más importante en la cual se produce la división nuclear que nos llevará hasta la división celular.

Se podría decir que las fases G1 y G2 son las fases de seguridad en la célula, y que permite a la célula comprobar si puede entrar en la fase siguiente.

El control del ciclo celular se produce esencialmente en tres puntos (figura 1):

1. Punto de restricción: Se produce en la fase S. Es el principal punto de control del ciclo. La célula comprueba que las condiciones tanto del entorno como de la célula son favorables para entrar en la siguiente fase.

2. Punto G2-M: Es el punto donde se controla la integridad del DNA antes de la mitosis, y así evitar mutaciones.

3. Punto de control M: Sólo seguirá adelante si todos los cromosomas están alineados sobre el huso.

Este control es llevado a cabo por las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La función de estas es fosforilar otras proteínas lo que las llevará a un cambio de actividad, o capacidad para formar parte de una estructura. La capacidad de fosforilar otras proteínas es dependiente de la asociación reversible de las ciclinas (4).

Entre las ciclinas más importantes nos encontramos con las ciclinas de G1(D, E) que se unen a las CDKs durante la fase G1, y las ciclinas mitóticas (A, B) que se unen a CDKs durante la fase G2; siendo esto necesario para la entrada en mitosis. Las ciclinas asociadas a determinadas CDKs permiten que la célula pase de G1 a S y las ciclinas mitóticas asociadas a otras CDKs permiten que la célula entre en mitosis (5,6).

La decisión que la célula comience el ciclo es regulado por varios factores como hormonas, citoquinas, factores de crecimiento etc. Estos últimos, al unirse al receptor de membrana (que consiste en un dominio ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular tirosina quinasa) hace que se active una cascada en la que están implicadas distintas quinasas acabando en la activación de distintos genes tales como los protooncogenes myc, fos, jun. La activación de estos genes conlleva a la formación de proteínas tempranas

nucleares que inducen la transcripción de determinados genes implicados en la regulación del ciclo celular (como genes que codifican ciclinas, entre otros) (7).

Por lo tanto, el crecimiento y la división celular es un proceso muy regulado y organizado, dependiente de una compleja red de interacciones tanto extracelulares como intracelulares. La pérdida de esta regulación o control es lo que lleva a que una célula se transforme en tumoral; y por ello las sustancias implicadas en este proceso son un buen objetivo de búsqueda de nuevos marcadores.

Activación y oncogenes

Entre 75-100 genes del código genético humano son llamados «proto-oncogenes», estos son genes normales presentes en la célula que contienen la información necesaria para sintetizar las proteínas para el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Cuando se produce una mutación en estos proto-oncogenes (traslocación, amplificación, inserción etc.) los convierte en oncogenes que son los responsables de que una célula normal se transforme en cancerosa (8). La herencia de estos genes sigue un patrón dominante.

El producto de estos genes llamados oncoproteínas son versiones alteradas de las proteínas implicadas en el crecimiento y diferenciación celular:

Entre estos oncogenes se encuentran (tabla I) :

Her-2/neu

Oncogen localizado en el cromosoma 17, que codifica un receptor transmembrana tirosina quinasa al que se unen factores de crecimiento, este receptor se encuentra localizado en células de origen epitelial (9). En los últimos años ha habido muchos estudios respecto a este oncogen y a la proteína que codifica: la oncoproteína Her-2/neu. El aumento del dominio externo de la oncoproteína es indicativo de metástasis de cáncer de mama y de peor pronóstico (10).

La aplicación clínica de este marcador incluye la monitorización del cáncer de mama con metástasis, factor predictivo de la respuesta frente al hormonoterapia y quimioterapia (11,12), la selección de aquellos pacientes que se podrían tratar con Herceptin™, así como la monitorización de la respuesta o resistencia a este tratamiento. Este tratamiento con Herceptin™ (Trastuzumab) fue aprobado en Europa en Septiembre del año 2000, en aquellas mujeres con cáncer de mama con metástasis y con niveles de la proteína Her2/neu aumentados (13).

ras

Comprende una familia de genes (H-*ras*, K-*ras*, N-*ras*) que codifican una serie de proteínas de 21 kD que se caracterizan por su capacidad de unir e hidrolizar GTP. Intervienen en la transmisión de señales desde la membrana al núcleo, estimulando así la proliferación o la diferenciación celular (14,15).

El mecanismo más frecuente por el cual estos genes se transforman en oncogenes es por una mutación puntual en los codones 12, 13 y 61. Existe una frecuente asociación de mutaciones *ras* con diferentes cánceres humanos, sobretodo con tumores de páncreas, colon, pulmón, vías urinarias, tiroides, melanomas y leucemias agudas (16).

c-myc

Este protooncogen esta localizado en el cromosoma 8 y codifica un factor nuclear de transcripción que interviene en la

Tabla 1. Principales oncogenes y genes supresores de tumores.

Oncogenes		
Oncogen	Función/ proteína que codifica	Cáncer
<i>Her2/Neu</i>	Codifica receptor de membrana Tirosina quinasa	Mama
<i>Ras(K-ras,N-ras, H-ras)</i>	Codifica para una proteína que se une a GTP	Pulmón, gástrico, pancreático, ovario, neuroblastoma, leucemia, mama, colon.
<i>c-myc</i>	Codifica Factor de transcripción que se une al DNA	Linfoma de Burkitt, Cáncer de pulmón, mama, cérvix, vejiga.
<i>c-abl</i>	Codifica un factor de transcripción	Leucemia
Genes supresores		
Gen supresor	Función /proteína que codifica	Cáncer
<i>Retinoblastoma</i>	Codifica para una fosfoproteína nuclear	Retinoblastoma, pulmón de células pequeñas, osteosarcoma
<i>p53</i>	Regulación del ciclo celular	Gran número de cánceres
<i>p16</i>	Inhibición del ciclo celular	Melanoma
<i>APC</i>	Proteína de la superficie celular	Colon
<i>DCC</i>	Proteína de la superficie celular	Colon
<i>Brca1 /Brca2</i>	Factor de transcripción	Mama y ovario

división celular. Este protooncogen puede inducir tanto a la progresión celular como a la apoptosis. Esta decisión depende de factores adicionales como:

- factores de crecimiento que actúan en el gen *myc*
- *p53* que inhibe la activación (17).

La traslocación recíproca con el cromosoma 14 en un punto cercano a un promotor de las cadenas de inmunoglobulinas se encuentra en la práctica totalidad de los linfomas de Burkitt de estirpe B. Dicha traslocación puede estar asociada al virus de Epstein Barr. También se asocia la amplificación de este gen con otros carcinomas gástricos, de mama, vejiga urinaria, cuello uterino y pulmón de células pequeñas.

N-myc, otro miembro de la familia, su amplificación es indicativa del mal pronóstico para los neuroblastomas.

abl

Este gen que se encuentra en el cromosoma 9 cercano a una zona frágil, que puede trasladarse a un lugar del cromosoma 22 que contiene el gen *bcr*. El híbrido *bcr-abl* codifica una tirosina quinasa que es capaz de transformar las células hematopoyéticas. Este oncogen esta implicado por lo tanto en leucemias mieloides crónicas y en linfomas.

Inhibición: antioncogenes o genes supresores de tumores

Además de los activadores del ciclo celular también existen inhibidores que bloquean el inicio de la fase S. A finales de los años 60 se descubrieron ciertos factores presentes en las células normales que podían bloquear la tumorigenicidad de las células malignas y se les llamó genes supresores de tumores (antioncogenes) (18). A diferencia de los oncogenes que transforman las células cuando su expresión aumenta, este tipo de genes protegen a las células de su transformación. Es su inactivación o pérdida de función lo que conduce al cáncer.

La herencia sigue un patrón recesivo (a diferencia de los oncogenes que sigue un patrón dominante) por lo que es necesario la alteración en los 2 alelos para que tenga efecto. Por

ello muchos de estos genes están implicados en las distintas formas de susceptibilidad al cáncer.

Entre ellos se encuentran (tabla 1):

p53

Localizado en el cromosoma 17. Codifica una fosfoproteína nuclear y su función es comprobar la calidad del DNA antes de su replicación, si la *p53* detecta algún daño activa genes que generan proteínas que inhiben el crecimiento celular, a la vez que suprime la acción de genes cuyos productos estimulan el crecimiento celular. Por lo tanto la célula no entra en la fase S hasta que las enzimas no han reparado el daño, si esta es imparable entonces se produce la apoptosis (19). Se podría decir que *p53* inhibe el crecimiento de las células tumorales.

Las alteraciones en *p53* están presentes en aproximadamente la mitad de los tumores de nuestra especie incluyendo algunos de los mas frecuentes como son el de mama, colon, pulmón y esófago (20).

Anticuerpos anti p53

Diferentes estudios afirman que la acumulación de las formas mutadas de la proteína *p53* que se acumula en el suero podría ser la causa de la formación de estos anticuerpos, y su concentración estaría relacionada con el estadio y malignidad del cáncer (21).

Se detecta en un 46% de las mujeres con cáncer de ovario, en 40% de pacientes con carcinoma escamosos de esófago y en el 32% de los portadores de tumores pulmonares (22).

Retinoblastoma

Gen situado en el cromosoma 13, la función de la proteína del retinoblastoma depende de su estado de fosforilación. Esta proteína se va fosforilando según se acerca a la fase S variando así la capacidad de unirse a los factores de transcripción. En su forma hipofosforilada la proteína del retinoblastoma inhibe la progresión del ciclo celular, sin embargo cuando es fosforilada por quinasas libera los factores de transcripción que promueven la división de la célula (23).

Una alteración en esta proteína se relaciona con: retinoblastoma, cáncer de células pequeñas de pulmón, osteosarcoma y de mama.

brca

Las proteínas codificadas por *brca1* y *brca2* están implicadas en procesos fundamentales de la célula, como reparación del DNA, y transcripción. Las mutaciones en estos genes predisponen a padecer principalmente cáncer de mama y ovario entre otros (24).

De todos cánceres de mama hereditarios el 50% se deben a mutaciones en *brca1* y *brca2*. Hay diferentes estudios realizados y podría ser que los datos estén sobrestimados en función de la población analizada (25).

brca1

Gen supresor de tumores implicado en ciertos casos de susceptibilidad al cáncer de mama, se localiza en el cromosoma 17. La proteína que codifica este gen posee varios dominios «*zinc finger*» próximos a su porción terminal, lo que sugiere que se trate de un factor de transcripción. Una mutación en este gen explicaría el 45 % de los cánceres de mama hereditarios, y la mayoría de los cánceres de mama y de ovario (26).

brca2

Gen supresor de tumores localizado en el cromosoma 13 y una mutación en este gen explicaría el 35 % de los cánceres de mama hereditarios (27).

APC

Gen supresor de tumores que se encuentra en el cromosoma 5. Su mutación se asocia con el cáncer de colon con la poliposis adenomatosa familiar, aumentando la predisposición a este cáncer (28,29).

Este gen codifica una proteína que juega un papel importante en la adhesión celular, en la transducción y en la regulación del ciclo celular (30). La mutación de la proteína que codifica hace que se pierda la acción de ésta sobre los microtúbulos alterando así la traducción de señales intracelulares.

p16

Gen que se encuentra en el cromosoma 9, la proteína que codifica inhibe específicamente la progresión a G1. Este gen se ha encontrado mutado en diversos cánceres especialmente en melanomas.

DCC

Localizado en el cromosoma 18. No se conoce bien la función de la proteína que codifica aunque parece estar implicada en la diferenciación final de las células y la expresión de esta está ausente en el 90% de los cánceres de colon.

MARCADORES DE APOPTOSIS Y GENES RELACIONADOS

La muerte celular se puede producir de dos maneras: por necrosis y por apoptosis. Son dos procesos muy diferenciados.

La necrosis es un proceso patológico, la célula se deteriora y acaba rompiéndose su membrana con la consiguiente lisis y liberación al medio de sustancias que causan edema y reacciones inflamatorias.

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso natural que utiliza el organismo para reemplazar a las células

dañadas, para la regulación fisiológica de la cantidad de células, así como la embriogénesis normal. A diferencia de la necrosis no causa edema ni reacciones inflamatorias.

El proceso apoptótico se caracteriza por alteraciones morfológicas, condensación nuclear, rotura del DNA en fragmentos pequeños por endonucleasas, y formación de prolongaciones del citoplasma que acaban por separarse de la célula formando los llamados cuerpos apoptóticos, que son fagocitados rápidamente. Todo este proceso está regulado por una serie de proteínas tanto inhibitoras como inductoras de la apoptosis.

Las investigaciones recientes del mecanismo de regulación de la apoptosis muestran una tercera categoría de genes; estos son llamados genes suicidas o genes inhibidores del suicidio o lo que es igual genes estimuladores o inhibidores de la apoptosis (31,32).

Genes estimuladores de la apoptosis

p53

Como ya se ha comentado anteriormente, este gen codifica una fosfoproteína nuclear y su función es comprobar la calidad del DNA antes de su replicación.

La alteración de este gen también se ha visto relacionado junto con otros en los linfomas de células B, en los que hay una desregulación del ciclo celular. También este gen junto a *Bcl2* y *bax* se ha asociado a tumores tiroideos (33).

c-myc

Gen situado en el cromosoma 8 y que codifica un factor de transcripción que está implicado en varios procesos celulares (crecimiento celular, diferenciación y apoptosis). Como se ha comentado anteriormente, su desregulación se asocia a un gran número de cánceres y a menudo con mal pronóstico, destacando el Linfoma de Burkitt (34).

Fas

La proteína que codifica este gen (cromosoma 19) es un receptor de membrana que induce a la apoptosis tras la unión de su ligando específico (35). Cuando se produce esta unión hay una activación secuencial de caspasas y la liberación de citocromo C por parte de la mitocondria, acabando en la apoptosis celular (36).

La alteración del gen *fas* es una de las causas de los síndromes linfoproliferativos como los sarcomas.

Genes inhibidores de la apoptosis

bcl-2

Gen situado en el cromosoma 18 y que se asocia con el Linfoma de Burkitt. Cuando este es traslocado al 14 en algún precursor linfocítico, se sitúa cerca de un promotor de los genes de las inmunoglobulinas, lo que conlleva a un aumento de la expresión de las células B. Este gen no induce la proliferación celular sino que previene de la muerte celular programada.

Con posterioridad se han encontrado otros genes como *Bax* que codifica la proteína Bax, la cual contrarresta la acción de *Bcl2* (37). Ambas pueden formar homo-dímeros como *Bcl2/Bcl2*, los cuales promueven la supervivencia de la célula, y *Bax/Bax*, que promueve la muerte celular, y los hetero-dímeros que tienen efectos intermedios.

v-ras, v-raf, v-abl, v-rel

Son genes inhibidores de la apoptosis y lo hacen produciendo señales antiapoptóticas. Hasta ahora no está claro si ejercen su función a través del oncogen *bcl-2* o no.

Genes estimuladores e inhibidores de la apoptosis.

ced (*ced-3*, *ced-4*; *ced-9*)

Estos genes *ced* (*Cell death genes*), fueron estudiados en el nemátodo «*Caenorhabditis elegans*». Hay una gran similitud entre los programas de muerte celular de este nematodo y los mamíferos. Los genes homólogos en mamíferos codifican las siguientes oncoproteínas:

Bcl-Bx (en el caso del gen homólogo de *ced-9*), *apopain* (que es una proteinasa codificada por el homólogo de *ced-3*) y *APAF1* (que es un factor de transcripción, codificado por el homólogo de *ced-4*).

Estas proteínas tienen actividad tanto proapoptótica como antiapoptótica.

La función de *ced-9* es proteger a la célula de la apoptosis; por ello cuando este se activa inhibe la apoptosis al inactivar a *ced-4* y *ced-3*. Si por lo contrario *ced-9* está activado se induce la apoptosis; ya que *ced-3* y *ced-4* se activan (38).

MARCADORES DE ANGIOGÉNESIS

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos es la base para el crecimiento maligno y favorece en gran medida la metástasis (39,40). El que el tejido esté vascularizado es básico para el crecimiento maligno, pudiendo llegar incluso a ser esencial para que se produzca la metástasis, ya que si al tejido no le llegan nutrientes, oxígeno, ni factores de crecimiento el tejido llega a necrosarse. Generalmente los tumores en su comienzo no son angiogénicos y permanecen dormidos y sin vascularización, estando limitados en una zona totalmente localizada. La conversión a un tumor angiogénico depende de la interacción entre los factores angiogénicos positivos y negativos (41).

Para que se formen nuevos vasos tienen que darse los siguientes procesos: degradación de la membrana basal que reviste las vénulas, migración endotelial con alineamiento y proliferación, formación del endotelio de los vasos y por último anastomosis de estos vasos nacientes y que la sangre fluya. Estos vasos son diferentes respecto a los sanos: más densidad de vasos por área y variaciones de diámetro, contorno, dirección, interconexiones y fragilidad (42).

Mediadores de la angiogénesis (tabla II)

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

Es el mayor inductor de la angiogénesis tumoral y muchas hormonas estimulan o inhiben su síntesis en líneas celulares tumorales. Recientemente se han descrito elevaciones séricas en numerosos tumores. Así por ejemplo en los de mama son mayores en los ductales que en los lobulillares, se correlacionan directamente con el estadio y la diseminación a distancia e inversamente con la respuesta a la quimioterapia y a la radioterapia. Su comportamiento es distinto según los tumores (43,44).

Angiogenina

Mediador de la angiogénesis que aumenta sobre todo en los tumores de cérvix uterinos con invasión tisular. No parece tener interés en los tumores mamarios (45).

Endoestatina

Es un fragmento antiangiogénico del colágeno XVIII y aumenta notablemente en el suero de los pacientes con sarcoma de partes blandas y cifras mayores a 55 pg/mL se aso-

Tabla II. Marcadores de la angiogénesis y metástasis tumorales.

Mediadores de la angiogénesis	
MEDIADOR	CÁNCER RELACIONADO
VEGF	Diferentes tumores. Estadío y diseminación.
Angiogenina	Tumor de cérvix
Endoestatina	Osteosarcoma
FGFB	Tumores de células pequeñas
Endoglina	Metástasis de cáncer de mama y colon
Metástasis y sustancias relacionadas	
SUSTANCIA	CÁNCER RELACIONADO
Colagenasa	Tumores gastrointestinales y mamarios
Catepsina	Displasias vaginales
Heparinas	Envuelta en el proceso de invasión
E-cadherina	Cáncer gástrico

cián con mayor riesgo de recidivas tras la resección quirúrgica (46).

Factor de crecimiento fibroblástico (FGFβ)

Se relaciona inversamente con la supervivencia en el derrame pleural de los mesoteliomas. En los tumores pulmonares de células pequeñas, se relaciona con el pronóstico y la respuesta terapéutica. También se han descrito aumentos en pacientes con cáncer de mama, pero no parece correlacionarse con el CA 15.3 (47,48).

Endoglina

Glucoproteína de membrana cuya expresión aumenta notablemente en las células endoteliales proliferativas. El aumento se asocia con metástasis en cáncer de colon y de mama, y en la quimioterapia efectiva disminuyen los valores (49).

Otros: TNF-alfa, EGF, PDGF, IL-8.

Entre los inhibidores de la angiogénesis se encuentran:

– inhibidores de la colagenasas, metaloproteasas y serinproteasas.

– angiestatina

– glicoproteínas trombospondinas (TSP)

Esta multifactorial regulación de la angiogénesis podría ser una esperanza para las nuevas estrategias terapéuticas frente al cáncer.

MARCADORES DE METÁSTASIS

La metástasis o migración de las células cancerosas a través de los tejidos, vasos y membranas a otro segundo lugar está ligado en gran medida a la angiogénesis (50). Para que una célula migre a través de los tejidos tiene que perder el contacto con sus células vecinas, cruzar la membrana basal y la matriz extracelular (51,52).

La membrana basal esta formada por colágeno tipo IV, heparina sulfato proteoglicano, laminina, fibronectina y entactina. Cambios en su estructura, organización y cantidad están relacionados con la invasión del cáncer. También están implicadas moléculas de adhesión como integrinas, selectinas, cadherinas y receptores de laminina

La degradación de las membranas así como la lisis de la matriz es llevada a cabo por enzimas secretadas por las células tumorales y células del huésped (Tabla II) :

– Colagenasa: Las colagenasas tumorales destruyen el intersticio celular y el colágeno tipo IV de la membrana basal. La colagenasa IV aumenta en tumores gastrointestinales y mamarios, pero no diferencia enfermedad localizada de diseminada (53).

– Catepsina: actúa predominantemente en las proteínas de la membrana basal y los proteoglicanos. La catepsina B1 aumenta en displasias vaginales.

– Heparinasa: Proteína también envuelta en el proceso de invasión.

– E-cadherina: Molécula de adhesión que aumenta en pacientes con cáncer gástrico, a la vez que aumenta con el tamaño del tumor y se correlaciona con el incremento de CEA (54).

Todas estas sustancias pueden ser útiles marcadores tumorales, pero además de ellas a finales de los años 80 se descubrió un gen supresor de metástasis: *MM23* (No metastático 23). Parece ser que la pérdida de su expresión induce la progresión del tumor hacia un estado metastático (55,56).

MARCADORES GENÉTICOS

Gracias a la investigación del genoma humano se sabe que el cáncer es un proceso en el que se ven implicadas diferentes mutaciones. Lamentablemente una mutación sola no se asocia con un cáncer determinado, y las alteraciones en esta enfermedad maligna son generalmente múltiples.

Proto-oncogenes y genes supresores de tumores

En general todo lo que regula la expresión de protooncogenes o inactiva la función de los genes supresores de tumores ayuda a la transformación de las células.

Las causas que llevan a esta desregulación son variadas:

–Traslocación: Se producen roturas y posteriores recombinaciones de fragmentos cromosómicos que sitúan protooncogenes próximos a la acción de un promotor que aumenta la expresión. Este es el caso de la leucemia mieloide crónica en la que se produce la traslocación del gen *c-abl* del cromosoma 9 a la región *bcr* del cromosoma 22.

–Amplificación: Consiste en el aumento de copias de un protooncogen normal. Como sucede en algunos neuroblastomas que pueden llegar a tener varios cientos de copias del gen *myc*.

–Mutación puntual: Una mutación en un solo nucleótido puede dar un producto anómalo tal como una oncoproteína, que es lo que sucede en los genes de la familia *ras*.

–Inserción vírica: Alteración de la célula por inserción vírica como en hepatocarcinomas asociados a virus.

Satélites

Son secuencias repetidas de DNA no codificantes que se encuentran al final y centro de los cromosomas. Estas porciones están implicadas en la estabilidad del DNA y regulan la expresión genética. Mutaciones en estas zonas del DNA como puede ser la pérdida o ganancia de una de estas secuencias, se les llama satélites inestables y están asociadas con el cáncer (58,59).

Telómeros y telomerasa

Los telómeros están relacionados con el número de veces que una célula se multiplica. Están localizados al final de los cro-

mosomas y están formados por múltiples repeticiones de una unidad de 6 bases (TTAGGG) (60). Cuanto más dividida esté una célula más corto es el telómero (61).

Algunas células, como los precursores hematopoyéticos y la mayoría de las células cancerosas, poseen un mecanismo que reconstruye el fragmento perdido en cada división. La enzima responsable es la telomerasa, que es una ribonucleoproteína (59). Altas concentraciones y aumentos de actividad de esta enzima se ha visto en 80-90% de los cánceres humanos (62,63).

Esta enzima se ha convertido en una diana molecular muy prometedora en la investigación oncológica ya que su bloqueo farmacológico podría revertir el fenotipo maligno de las células tumorales.

DNA mitocondrial

La molécula de DNA mitocondrial es una única molécula circular de 16.569 pares de bases que codifican 22 RNA de transferencia, 2 RNA ribosómicos y 13 proteínas mitocondriales involucradas en la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa celular.

Desde que se ha descubierto el genoma mitocondrial varias mutaciones del DNA mitocondrial se han asociado con malignidad. Aunque la función mitocondrial en la tumorigénesis está todavía por definir, hay estudios que han asociado cambios en el DNA mitocondrial con carcinomas gástricos, renales y con el cáncer colorectal (64,65).

La liberación de citocromo C mitocondrial al plasma parece tener un papel importante en la vía apoptótica. Alteraciones en esta vía pueden llevar a la formación de un tumor. El proceso de la apoptosis celular viene determinado por el núcleo, pero el control se lleva a cabo en la mitocondria, por lo que la apoptosis y la mitocondria están altamente relacionadas (66).

El desarrollo metodológico y práctico que se está produciendo aumentará las indicaciones de uso de los marcadores tumorales. Entre ellas la predisposición a un determinado tipo de cáncer, diagnóstico diferencial, cribado en poblaciones de alto riesgo, detección precoz de recidivas y elección de terapias adecuadas junto con nuevas opciones terapéuticas.

Correspondencia:
José Manuel Pena Ezquerro
Servicio de Bioquímica.
Hospital Valle de Hebron
Paseo Vall d'Hebron 119-129
08035 Barcelona
mpena@hg.vhebron.es

BIBLIOGRAFIA

1. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. *Clin Chem* 2002; 48: 1151-9.
2. Thomas CM, Sweep CG. Serum tumor markers: past, state of the art, and future. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 73-86.
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. En: *Biología Molecular de la célula*. Ed. Omega S.A. Barcelona (España);1996. p. 926-33.
4. Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147: 545-60.
5. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of the cell cycle events. *Science* 1989; 246: 629-34.
6. Murray AW, Kirschner MW. Domains and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 1989; 246: 614-21.
7. Druker BJ, Mamon HJ, Roberts TM. Oncogenes, Growth Factors and Signal Transduction. *N Engl J Med* 1989; 321: 1383-91.
8. Bishop JM. Oncogenes. *Investigación y Ciencia* 1982; 68: 52-64.

9. Maguire HC, Greene MI. The neu (c-erb-2) oncogene. *Semin Oncol* 1989; 16:148-55.
10. Suhaill MA, Leitzel K. Relationship of serum Her-2/neu and serum 15.3 in patients with Metastatic Breast Cancer. *Clin Chem* 2002; 48: 1314-20.
11. Leztel K, Tremoto Y, Sampson E, Maurci J, Langton BC, Derrers L. Elevated serum c-erb-2 antigen levels and decreased response to hormone therapy of breast cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1129-35.
12. Fehm T, Gebauer G, Jager W. Clinical utility of serial serum c-erbB-2 determinations in the follow-up of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75: 97-106.
13. Arteaga CL, Trastuzumab B. An appropriate first-line single-agent therapy for HER2- overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 96-100.
14. Downward J. Ras regulation: putting back the GTP. *Curr Biol* 1992; 2: 329-31.
15. Shirasawa S, Furuse M, Yokohama M, Sasazuki T. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted as activated Ki-ras. *Science* 1993; 260: 85-8.
16. Lowly DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rv Biochem* 1993; 62: 851-91.
17. Reisman D, Elkin NB, Roy B, Beamon J, Rotter V. C-Myc transactivates the p53 promoter through a required downstream CACGTC motif. *Cell Growth and Diff* 1993; 5: 57-65.
18. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64: 319-26.
19. Perry ME, Levine AJ. Tumor suppressor p53 and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 50-4.
20. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
21. Lutz W, Nowakowska-Swirta E. Gene p53 mutations and anti p-53 antibodies as biomarkers of cancer process. *Int J Occup Med Environ Health* 2002; 15: 209-18.
22. Cioffi M, Vietri MT, Gazzero P, Magnetta R, D'Auria A, Durante A. Serum anti p53 antibodies in lung cancer: comparison with established tumor markers. *Lung Cancer* 2001; 48:113-22.
23. Hollingsworth RE, Chen PL, Lee WH. Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 194-200.
24. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BCRA1 and BCRA2. *Am J Hum Genet* 2002;108: 171-82.
25. Szabo CI, King Mc. Population genetics of BCRA1 and BCRA2. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1013-20.
26. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast Cancer Linkage Consortium. Breast and ovarian cancer incidence in BCRA1- mutation carriers. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 265-71.
27. Couch FJ, Farid L, DeShamo ML, Tavtigian SV, Calzone K, Campeu L. BCRA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 1996; 13: 123-5.
28. Baba S. Recent advances in molecular genetics of colorectal cancer. *World J Surg* 1997; 21: 678-87.
29. Glaser EM. Inherited predisposition to colon cancer. *Cancer Nurs* 1998; 21: 377-83.
30. Thomas G, Oschlang S. Genetic predispositions to colonorectal cancer. *Pathol Biol* 1995; 43: 159-64.
31. Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 1993; 14: 582-90.
32. Green DR, BissonnetteRP, Cotter TG. Apoptosis and Cancer Important. *Adv Oncol* 1994; 12: 37-52.
33. Farid P, Gomb SZ, Peter I, Szende B. Bcl2, p63, and bax in thyroid tumors and their regulation to apoptosis. *Leukemia* 2001; 15: 515-22.
34. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992; 359: 552-4.
35. Rouvier E, Luciani MF, Goldstein P. Fas involvement in Ca2+ independently T-cell mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 1993; 177: 195-200.
36. Kavurma MM, Khachigian LM. Signaling and transcriptional control of Fas ligand gene expression. *Cell Death Differ* 2003; 10:36-44.
37. Otvál ZN, Milman CL, Korsmeyer SJ. Bcl2 heterodimers in vivo with a conserved homolog bax wich accelerates cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.
38. Marietta V, Mathias MM. Tumor Markers: review and clinical applications. *IFCC Series*. 2002; 24: 37-8.
39. Alghire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park H. Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo.I. Vascular reactions of mice to wound and to normal and neoplastic transplants. *J Nat Cancer Ins* 1992; 6: 73-85.
40. Shuterland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1998; 240: 177-84.
41. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7.
42. Skinner SA, Tutton PJM, O'Brien PE. Microvascular architecture of experimental colon tumors in the rat. *Cancer Res* 1990; 50: 2411-7.
43. Linderholm BK, Lindhal T, Holmberg L, Klaar S, Lennestrand J, Henrijsson R, et al. The expression of vascular endothelial growth factor correlates with mutant p53 and poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2256-60.
44. Foekens JA, Peters HA, Grabehtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurst-Moespot A, et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5407-14.
45. Boedner-Adler B, Hefler L, Bodner K, Leodorler S, Frischmuth K, Kainz C, et al. Serum levels of angiogenin (ANG) in invasive cervical cancer and in cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Anticancer Res* 2001; 92: 663-9.
46. Feldman AL, Pak H, Yang JC, Alexander HR Jr, Libutti SK. Serum endostatic levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma. *Cancer* 2001; 91: 1525-9.
47. Strizzi L, Vianale G, Catalano A, Muraro R, Mutti L, Procopio A. Basic fibroblastic growth factor in mesothelioma pleural effusions correlation with survival and angiogenesis. *Int J Oncol* 2001; 18: 1903-8.
48. Ueno K, Inoue Y, Kawaguchi T, Hosoe S, Kamahara M. Increased serum levels of basic fibroblastic growth factor in lung cancer patients: relevance to response of therapy and prognosis. *Lung Cancer* 2001; 31: 213-9.
49. Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, et al. Association of serum endoglian with metastasis in patients with colorectal, breast and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 524-32.
50. Liotta LA, Stetler-Stevensonnn WG. Principles of molecular cell biology of cancer. *Cancer metastases*. En: Devitta VT, Hellman S, Rosenberg SA, ed. *Cancer principles and practice oncology*. Philadelphia JB Lippincot 1993.
51. Barsky SH, Siegal BP, Jannotta F, Liotta LA. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not their benign counterparts. *Lab Invest* 1983; 49: 140-8.
52. Rao CN, Margulies IM, Tralken S. Isolation of a subunit of laminin and its role in molecular structure and tumor attachment. *J Biol Chem* 1982; 257: 9740-50.
53. Ruibal MA. Marcadores tumorales: situacion actual. *Med Clin* 2002; 118: 750-6.
54. Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, et al. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 2001; 48: 808-11.
55. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper I, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, et al. Evidence of a novel gene associated with low tumor metastatic potencial. *J Natl cancer Inst* 1988; 80: 200-4.
56. Hennessy C, Henry JA, May FEB, Westley ER, Angus P, Lennard TWJ. Expression of the antimetastatic gene NM23 in human breast cancer. Association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 281-5.
57. Lewin B. Oncogenetic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 1991; 64: 303-9.
58. El-Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Geopfert H, Huff V. Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 2656-9.
59. Mao L, Lee DJ, Tockman MDS, Erozan YS, Askin F, Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers for the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9871-5.
60. Hess JL, Highsmith E Jr. Telomerase Detection in Body Fluids. *Clin Chem* 2002; 48: 18-24.
61. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-82.
62. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bachetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and hematologic malignances. *Blood* 1995; 85: 2315-29.
63. Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1996; 8: 66-71.
64. Bugart LJ, Zheng J, Shu Q, Strickler JG, Shibata D. Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 1105-11.
65. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Wilson JK, Marzowitz SD, et al. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998; 20: 291-3.
66. Susin SA, Samzani N, Kroemer G. Mith as regulation of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 151-65.