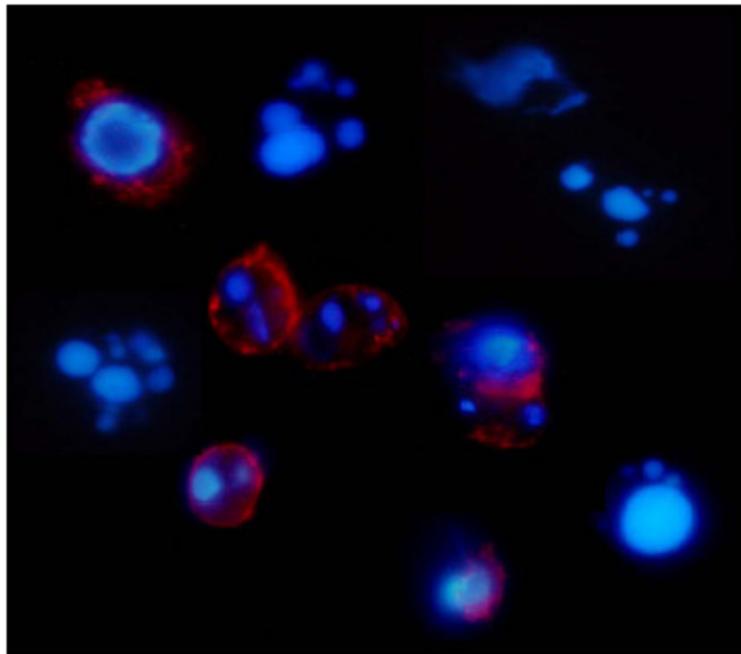


Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides



Silvia Marcé Torra

**Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona**

INTRODUCCIÓN

1.- APOPTOSIS

1.1.- Definición

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular por el cuál las células mueren de una forma controlada en respuesta a diversos estímulos. Se trata de un proceso fisiológico esencial en el desarrollo de un organismo, en el control de la homeostasis de la célula y en la respuesta a diferentes agentes externos como radiaciones ionizantes o agentes quimioterápicos.

La desregulación de la apoptosis bien sea por exceso o por defecto puede ser causa de diversas patologías (tabla 1.1.1).

Tabla 1.1.1. Patologías causadas por desregulación de la apoptosis.

Enfermedades relacionadas con inhibición de apoptosis	Enfermedades relacionadas con exceso de apoptosis
Cáncer Enfermedades autoinmunes Infecciones virales	SIDA Enfermedades neurodegenerativas Síndromes mielodisplásicos Daño isquémico Hepatitis tóxica Pancreatitis Hepatitis fulminante Tiroiditis

1.2.- Introducción histórica

El término *apoptosis* surgió en 1972 (Kerr JF et al, 1972) al describir las características morfológicas de ciertas células que morían espontáneamente durante el desarrollo. Posteriormente se demostró que tanto las células normales como las patológicas activaban un programa de muerte celular intrínseco en determinadas circunstancias, de modo que estas células morían de forma controlada y eran eliminadas por macrófagos tisulares antes de que éstas pudieran dañar a otras células o iniciaran reacciones inflamatorias.

La aceptación de que las células poseían un programa de muerte celular intrínseco no fue hasta 20 años después con la identificación de genes implicados en la apoptosis (*ced-3*, *ced-4*, *ced-9*) en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Ellis RE et al, 1991). Posteriormente se detectaron sus homólogos en humanos (Schwartz LM and Osborne BA, 1994), cosa que supuso un avance en el estudio de la apoptosis.

1.3.- Características morfológicas y bioquímicas

Durante el proceso de apoptosis la morfología de la célula sufre una serie de cambios: la cromatina se condensa en la periferia nuclear, los nucléolos se desintegran y se reduce el tamaño del núcleo. El volumen celular total se reduce, la célula se encoge y se hace más densa, los orgánulos citoplasmáticos se condensan y el retículo endoplasmático se dilata, pero las mitocondrias se mantienen morfológicamente normales. A continuación se produce la fragmentación del núcleo y del citoplasma en pequeños corpúsculos rodeados de membrana que reciben el nombre de cuerpos apoptóticos y que serán fagocitados por macrófagos o células vecinas (figura 1.3.1).

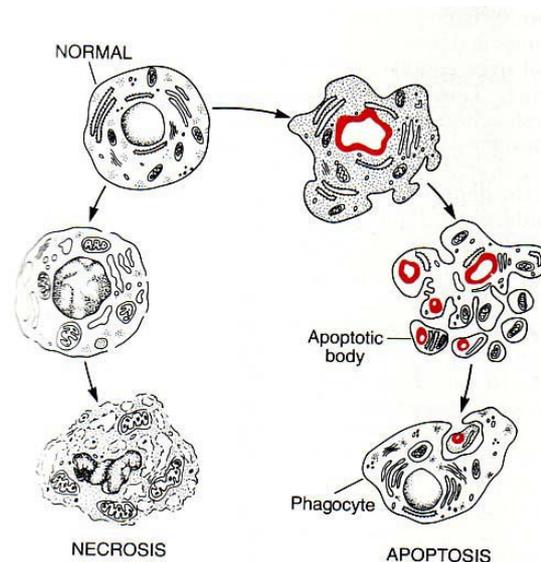


Figura 1.3.1. Pasos del proceso apoptótico versus una necrosis.

Al mismo tiempo se producen una serie de procesos bioquímicos: por una parte, se activan una serie de endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} que cortan el DNA genómico por espacios internucleosomales y se generan fragmentos de DNA de unos 180-200 bp (*ladder* de DNA). Por otra parte, se produce una pérdida del potencial mitocondrial, así como una pérdida de la asimetría de la membrana plasmática: los residuos de fosfatidilserina que en condiciones normales se encuentran en la cara interna de la membrana celular, aparecen también en la cara externa de ésta (figura 1.3.2). Este hecho permite que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas por los macrófagos (Kerr JF et al, 1994).

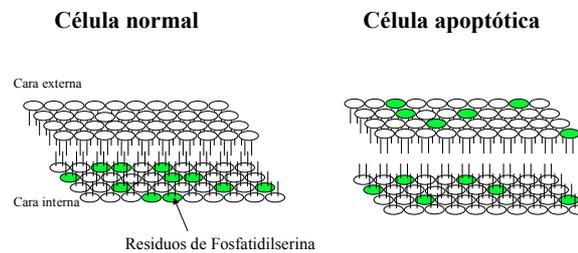


Figura 1.3.2. Exposición de los residuos de fosfatidilserina a la membrana externa de la célula en las fases iniciales del proceso apoptótico.

1.4.- Etapas y vías de la muerte celular por apoptosis

Existen dos vías de inducción de apoptosis, una vía extrínseca en la que una señal externa interacciona con una serie de receptores de muerte de la membrana celular como CD95/Fas, el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) o **TRAIL** (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) (Krammer PH, 2000; Locksley RM et al, 2001), y una vía intrínseca o mitocondrial, activada por estrés (radiaciones) o agentes genotóxicos (drogas, toxinas...) que dan lugar a la activación de la maquinaria apoptótica mitocondrial (Newmeyer DD and Ferguson-Miller S, 2003). Estos estímulos, sean externos o internos a la célula, constituyen el primer paso del proceso de apoptosis. La siguiente fase comprende la detección de esta señal y la transducción de la misma mediante vías que envían la señal a la maquinaria efectora de la muerte celular. La tercera fase es la fase efectora en la que están implicadas las proteasas que activan la apoptosis, así como sus reguladores, positivos y/o negativos. Y, finalmente, la última fase o fase *post-mortem* en la que se produce la condensación de la cromatina y la degradación del DNA (Vaux DL and Strasser A, 1996).

1.5.- La maquinaria apoptótica

1.5.1.- Las caspasas

Tras identificar los genes relacionados con la apoptosis en el nemátodo *C. elegans* (Ellis et al, 1991) se caracterizó la enzima convertidora de interleuquina-1 β (**ICE**, *Interleukin-1 β*

Converting Enzyme (caspasa-1) como la responsable de la maduración de la pro-interleuquina-1 β a su forma activa (Thornberry NA et al, 1992). Esta enzima era una cisteín-proteasa correspondiente a una nueva familia de proteínas con especificidad de corte en aspártico. Posteriormente se clonó y secuenció *ced-3* identificándose una proteína similar a ICE (Yuan J et al, 1993). La caracterización de esta nueva proteína (caspasa-3) acabó por asegurar la relevancia de estos mediadores en el proceso de apoptosis.

Los miembros de esta familia de proteínas fueron denominados **caspasas** (**Cysteine-Aspartate-Proteases**) y actualmente se han descrito 12 miembros en humanos. Aunque la caspasa-1 (ICE) fue identificada como regulador de la respuesta inflamatoria, al menos 8 de las 12 caspasas descritas han sido implicadas en la apoptosis (Salvesen GS, 2002). Las caspasas se sintetizan como proenzimas (zimógenos) que contienen tres dominios: el prodominio N-terminal, la subunidad grande y la subunidad pequeña o dominio C-terminal. Las caspasas deben proteolizarse para ser activas. Esta proteólisis se da en dos fases: la primera proteólisis divide la cadena en la subunidad grande y la subunidad pequeña; la segunda proteólisis elimina el prodominio N-terminal. Esta activación da lugar a un heterotetrámero activo (figura 1.5.1) formado por el ensamblaje de dos subunidades grandes y dos pequeñas, conteniendo dos sitios activos de catálisis (Salvesen GS, 2002) con una secuencia altamente conservada (QACxG) dentro de un residuo cisteína. Esta forma activa, a su vez, proteolizará a sus sustratos después de un residuo de aspártico.

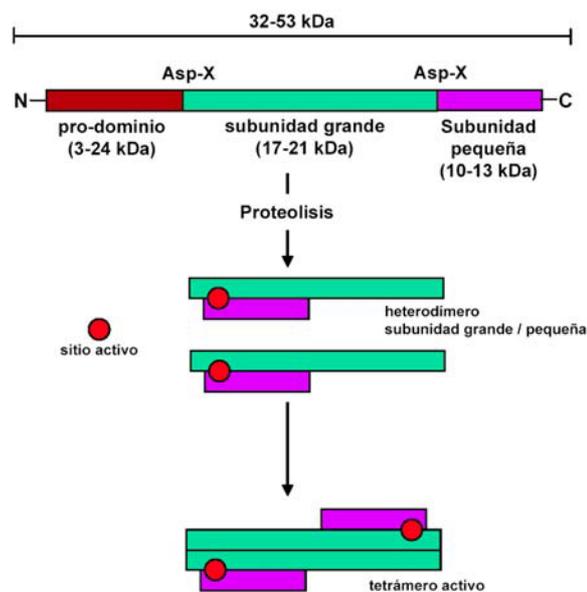


Figura 1.5.1. Proteólisis y activación de las caspasas.

La activación de las caspasas es fundamental para el proceso de muerte celular por apoptosis. Existen tres tipos de caspasas (figura 1.5.2) (Doctor KS et al, 2003):

- **Caspasas inflamatorias:** participan en procesos de activación de citoquinas (caspasas-1, -4, -5 y -14).
- **Caspasas iniciadoras:** son activadas en respuesta a señales de stress o daño celular o cuando la célula recibe una señal de que debe morir (caspasas-8, -9, -10 y -12).
- **Caspasas efectoras o ejecutoras:** son proteolizadas y activadas por las caspasas iniciadoras. Son responsables de la proteólisis directa de otros sustratos que producirán el cambio morfológico de la célula. La principal caspasa efectora es la caspasa-3, aunque también ejercen funciones ejecutoras las caspasas-6 y -7. La caspasa-3 es responsable de la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA y la formación de los cuerpos apoptóticos mediante la activación y proteólisis de otros sustratos.

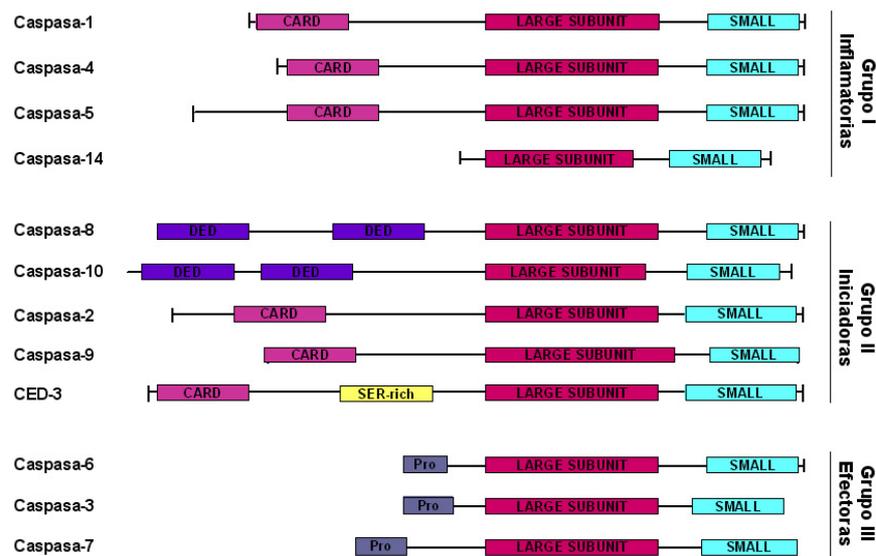


Figura 1.5.2. Esquema representativo de las 12 caspasas descritas en humanos.

Las caspasas participan tanto en la vía extrínseca como en la intrínseca. Los receptores de membrana de la vía extrínseca poseen un dominio intracitoplasmático, el dominio de muerte (**DD**, *Death-domain*), responsable de la activación del proceso apoptótico tras la unión de un ligando al receptor. En el caso de Fas, la unión del ligando (FasL) produce la trimerización del receptor que secuestra unas moléculas adaptadoras (**FADD**, *Fas Associated protein with a Death Domain*) responsables de la unión y la activación de la

caspasa-8. El complejo formado por el DD, FADD y la caspasa-8 recibe el nombre de **DISC** (*Death-Inducing Signalling Complex*). La activación de la caspasa-8 dará lugar, a su vez, a la activación de una cascada de caspasas (Yuan J, 1997) hasta la caspasa efectora-3.

Uno de los puntos clave de la vía intrínseca es la liberación del *citocromo c* que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. Estímulos de daño celular que provocan una lesión en la mitocondria permitirían la salida del *citocromo c*. Una vez en el citosol, se une a la proteína **Apaf-1** (*Apoptosis protease-activating factor-1*), una proteína de 130 kDa con elevada homología con CED-4 (Zou H et al, 1997). Apaf-1 se une y activa la caspasa-9. El complejo formado por el citocromo c, Apaf-1 y la caspasa-9 se conoce con el nombre de apoptosoma y media la apoptosis inducida por fármacos, agentes oxidantes y factores de crecimiento (Barinaga M, 1998) mediante la activación, por parte de la caspasa-9, de la caspasa efectora-3.

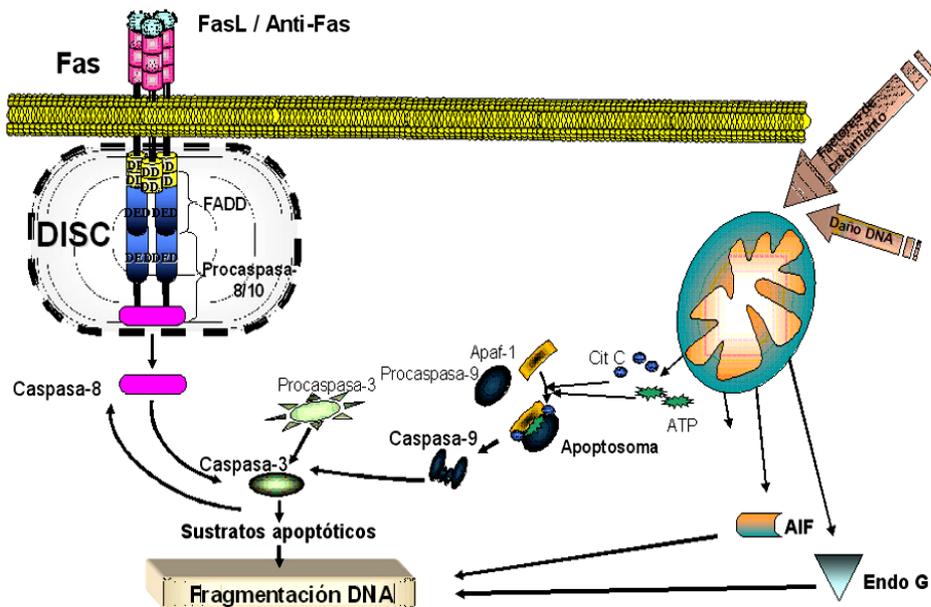


Figura 1.5.3. Implicación de las caspasas en las dos vías del proceso apoptótico.

1.5.2.- Sustratos de las caspasas

Un elevado número de proteínas son proteolizadas por las caspasas durante el proceso de apoptosis. El primer sustrato de caspasas descrito fue la *poli-(ADP-ribosa)-polimerasa* (**PARP**) (Oliver FJ et al, 1998), utilizado como marcador de apoptosis en muchos tipos celulares (Helleday T et al, 2005).

En células no apoptóticas, la PARP se une al DNA que presenta daños en sus cadenas, dando lugar a la formación de polímeros de ADP-ribosa que se unirán a diferentes proteínas como las *topoisomerasa I y II*, *histonas*, *DNA polimerasas* y *DNA ligasa 2*, como a la propia PARP. Esta unión inhibe a algunas de estas proteínas inhibiendo la replicación y transcripción del DNA y permitiendo la unión de enzimas de reparación del DNA mediante la separación de las histonas del DNA. Por ello, la PARP ha sido implicada en los mecanismos de reparación del DNA (Chatterjee S et al, 1999; Oei SL et al, 2005).

En las fases finales del proceso apoptótico, la caspasa-3 proteoliza la PARP generando un fragmento de 85 kDa, que contiene el dominio catalítico (C-terminal), y un fragmento de 16 kDa, que contiene el dominio de unión al DNA (N-terminal) (Oliver FJ et al, 1998). El resultado final de esta proteólisis es impedir la reparación del DNA dañado y permitir que la célula entre en apoptosis.

1.5.3.- Inhibidores de las caspasas

Las caspasas están reguladas transcripcionalmente y por modificaciones post-transduccionales (Earnshaw WC et al, 1999). Una vez activadas, también existen mecanismos de regulación de su degradación a nivel del proteasoma (Jesenberger V and Jentsch S, 2002). Su actividad enzimática viene regulada a la vez por dos familias de proteínas:

- **IAPs** (*Inhibition of Apoptosis Proteins*): identificadas en baculovirus por su capacidad de impedir la apoptosis de la célula hospedadora mediante la inhibición de la actividad enzimática de las caspasas (Deveraux QL and Reed JC, 1999). Se han identificado 8 IAPs en mamíferos, entre las que se encuentran *XIAP*, *c-IAP1*, *c-IAP2*, *ML-IAP* y *survivina*. Las IAPs son inhibidores directos de las caspasas. Más concretamente, XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 inhiben las caspasas -3, -7 y -9 (pero no las -1, -6, -8 y -10). Estas proteínas inhiben a las caspasas mediante la unión a ellas por dominios **BIR** (*Baculoviral IAP Repeat*) de unos 80 aa plegados alrededor de un átomo de zinc. Las IAPs pueden presentar uno o más de un dominio BIR. Dentro de las IAPs existen dominios llamados RING, que actúan como una ubiquitín-ligasa induciendo su autodegradación (Yang Y et al, 2000) y la degradación de la caspasa que va unida a él, a través del proteasoma; así como dominios CARD que pueden permitir la regulación de la degradación de caspasas por interacción entre dominios de este tipo.

Dentro de esta familia de proteínas, la mejor estudiada es la XIAP. Su estructura está formada por tres dominios BIR y un dominio RING. El dominio BIR2 inhibe las caspasas-3 y 7, mientras que el dominio BIR3 inhibe a la caspasa-9. Antagonistas de XIAP pueden bloquear su efecto inhibitorio (Carter BZ et al, 2005) y inducir la proteólisis directa de caspasa-3. Esta activación de caspasa-3 es la que induce una posterior activación de las caspasas-8 y -9 como consecuencia del *loop* de amplificación de la señal apoptótica. Esta primera activación de caspasa-3 es debida a que estos antagonistas de XIAP se unen a BIR2 (Schimmer AD et al, 2004; Wang Z et al, 2004) impidiendo el bloqueo de la caspasa y su consiguiente activación. Además, se ha visto que el efecto apoptótico inducido por el antagonista de XIAP no se

observa en células normales. Esto es porque se ha observado una correlación entre el efecto de esta molécula y los niveles de expresión de XIAP, siendo mayores en las células tumorales. Así, el tratamiento con antagonistas de XIAP puede ser una terapia a tener en consideración en esos casos con elevados niveles de expresión de la proteína.

La proteína *survivina* posee un solo dominio BIR. Aunque fue considerada como una IAP (Ambrosini G et al, 1997) no inhibe las caspasas directamente, sino que es una proteína nuclear que desempeña un papel importante en la mitosis celular. Sus niveles de expresión oscilan durante el ciclo celular alcanzando su nivel máximo en la fase G₂/M, por lo que se considera una proteína más relacionada con proliferación que con la inhibición de las caspasas (Gurbuxani S et al, 2005; Martinez A et al, 2004; Wheatley SP and McNeish IA, 2005).

- **FLIP (*FLICE/ caspase 8 Inhibitory Protein*):** identificada en γ -herpes virus y baculovirus (v-FLIPs). Posee dos regiones homólogas de dominios efectores de muerte (**DED, *Death Effector Domain***) en su extremo amino, asemejándose a la estructura de las caspasas-8 y -10 (Hu et al, 1997). Poco después se identificó el homólogo celular, c-FLIP (también llamado Casper/ CASH/ CLARP/ FLAME/ I-FLICE/ MRIT o usurpina) (Scaffidi C et al, 1999), del que se han identificado dos variantes: c-FLIP_S y c-FLIP_L. La estructura de c-FLIP_S es similar a v-FLIP, pero además de los dos dominios DED presenta una región C-terminal. Esta región es mayor en el caso de c-FLIP_L que posee además una región homóloga a las caspasas, pero no posee la actividad catalítica de estas, debido a la ausencia del residuo de Cys, aunque sí contiene un sitio de corte en Asp.

Debido a su similitud estructural con la caspasa-8, las proteínas FLIP interfieren en su activación a nivel de formación del DISC. c-FLIP_S se une al adaptador FADD y a la caspasa-8 a través de sus dominios DED, inhibiendo la unión de la caspasa-8 a su receptor y posterior activación (Irmiler M et al, 1997). c-FLIP_L se une también a la caspasa-8 mediante sus dominios DED y su región "tipo caspasa" formando un heterodímero caspasa-8/ c-FLIP_L, detectándose proteólisis parcial de ambos (Krueger A et al, 2001). Esta proteólisis incompleta mantiene a las dos proteínas unidas al receptor, impidiendo la liberación de la forma activa de la caspasa-8. c-FLIP_L parece ser un inhibidor más potente que c-FLIP_S de la apoptosis inducida por distintos receptores de la muerte (Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TNF, etc) (Thome M et al, 1997). Su expresión es inducida por la activación de NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) y se degrada vía proteasoma.

Estos inhibidores actúan sobre las dos vías del proceso apoptótico (figura 1.5.4). Mientras, como he comentado, la proteína c-FLIP actuaría a nivel de la vía extrínseca, las IAP's pueden actuar bloqueando caspasas tanto de la vía extrínseca como de la mitocondrial.

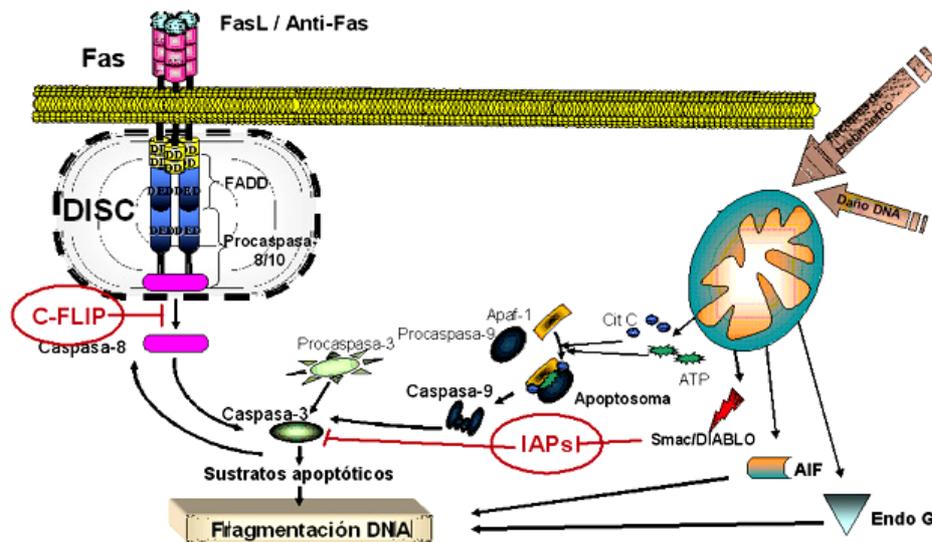


Figura 1.5.4. Esquema de las vías de activación de la apoptosis e inhibición de las caspasas. Las proteínas inhibitoras de las caspasas se destacan en rojo.

Al mismo tiempo, para estudiar el papel de las caspasas en la muerte celular programada se han desarrollado inhibidores peptídicos sintéticos de diversa especificidad. Estos inhibidores pueden ser reversibles o irreversibles. Todos ellos se han obtenido a partir de la secuencia de corte presente en los sustratos de las diferentes caspasas. El inhibidor de caspasas más utilizado es el Z-VAD.fmk, considerado un inhibidor general de las caspasas (Slee EA et al, 1996) con la excepción de la caspasa-2 que reconoce un pentapéptido y cuyo inhibidor es Z-VDVAD.fmk. Otros inhibidores utilizados son el inhibidor de la caspasa-9, Z-LEHD.fmk y Z-IETD.fmk, que inhibe preferentemente las caspasas-6, -8, -9 y -10 (Fadeel B et al, 1999).

1.5.4.- Proteínas de la superfamilia de Bcl-2

El gen *bcl-2* (**B-Cell Lymphoma 2 gene**) fue descrito como un protooncogen activado como resultado de la translocación cromosómica t(14;18)(q32;q21), característica del linfoma folicular y que yuxtapone el promotor del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14, con el gen *bcl-2* en el cromosoma 18 (Tsujiyoto Y et al, 1984) dando lugar a una sobreexpresión de Bcl-2.

Se han identificado otras proteínas similares a la proteína Bcl-2 y se han agrupado todas dentro de la denominada superfamilia de proteínas de Bcl-2 (figura 1.5.4). Por el momento, hay descritos 21 miembros de esta superfamilia de proteínas en mamíferos. Todas ellas poseen, al menos, uno de los cuatro dominios conservados BH (**Bcl-2 Homology**), BH1,

BH2, BH3 y BH4, que corresponden a segmentos de hélices α . Los distintos miembros de esta superfamilia se dividen en miembros antiapoptóticos, proapoptóticos y “sólo BH3” (figura 1.5.5):

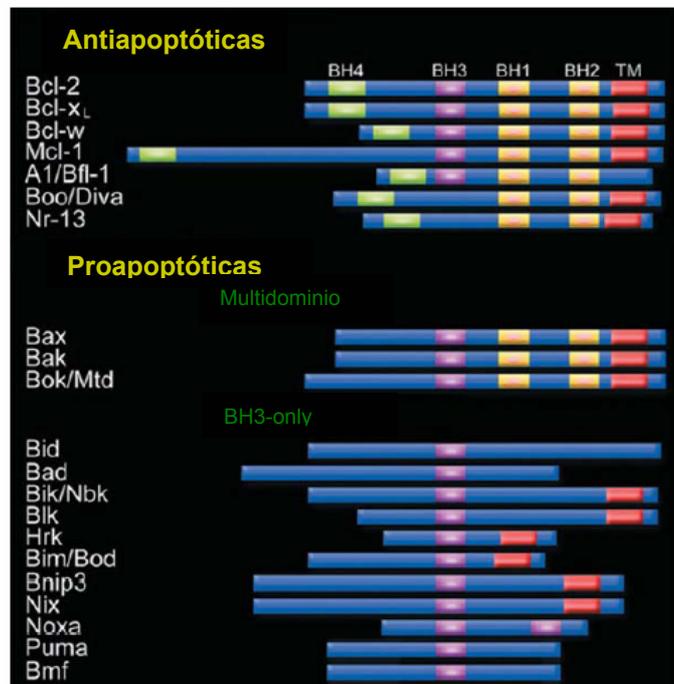


Figura 1.5.5. Estructura de los miembros de la superfamilia de Bcl-2.

- **Antiapoptóticas:** **Bcl-2** y sus homólogos más cercanos, **Bcl-X_L** y **Bcl-w**, inhiben la apoptosis inducida por muchos estímulos citotóxicos. Su dominio hidrofóbico C-terminal facilita su interacción con la región citosólica de tres membranas intracelulares: el retículo endoplasmático, la envoltura nuclear y la membrana externa mitocondrial. Bcl-2 es una proteína integral de membrana (Janiak F et al, 1994; Lithgow T et al, 1994), mientras que Bcl-X_L y Bcl-w sólo se insertan en las membranas después de una señal citotóxica (Krajewski S et al, 1994; O'Reilly LA et al, 2001). Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w presentan una estructura tridimensional altamente conservada (Muchmore SW et al, 1996; Petros AM et al, 2001). Consiste en una estructura globular formada por cinco hélices α anfipáticas que rodean dos hélices α hidrofóbicas. La cavidad hidrofóbica formada por residuos de los dominios BH1, BH2 y BH3 puede interaccionar con la hélice α del dominio BH3 de una proteína “sólo BH3” (Sattler M et al, 1997).

Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*) es otro miembro de esta subfamilia. Se localiza en la mitocondria y no sólo regula la apoptosis, sino que también parece estar implicado en la

regulación del ciclo celular (Fujise K et al, 2000). El gen de Mcl-1 se encuentra localizado en el cromosoma 1 y está formado por tres exones y dos intrones. Por esplicing alternativo puede dar lugar a dos isoformas, un Mcl-1 antiapoptótico y un Mcl-1S proapoptótico (Bae J et al, 2000; Bingle CD et al, 2000). La estructura de la proteína antiapoptótica es similar a la de la proteína Bcl-2 pero se diferencian en que Mcl-1 presenta, en su extremo N-terminal, una secuencia PEST (construcción de prolina, glutamato, serina y treonina) responsable del rápido recambio de la proteína vía proteasoma (Nencioni A et al, 2005).

Bag-1 es una proteína multifuncional que participa en los mecanismos de control del crecimiento, que incluyen la apoptosis, señalización, proliferación, transcripción y motilidad celular. Muchos de los efectos ejercidos por Bag-1 se deben a su regulación de la actividad chaperona de las proteínas Hsp-70 y Hsc-70 (Takayama S et al, 1997) (Townsend PA et al, 2003).

Otros miembros de esta subfamilia que poseen menor homología con Bcl-2 son **A1** y **Boo/Diva**, cuya actividad antiapoptótica parece ser menor y han sido menos estudiados.

- Proapoptóticas: Los miembros de esta subfamilia comparten homología con Bcl-2 en los dominios BH1, BH2 y BH3, pero no BH4 donde parece residir la actividad antiapoptótica de la subfamilia anterior. Los principales representantes de esta subfamilia son **Bax** y **Bak**, presentes en multitud de tejidos y **Bok/Mtd**, cuya expresión parece estar limitada a tejidos reproductivos. La inactivación simultánea de Bax y Bak, pero no su inactivación individual, bloquea la apoptosis en muchos tejidos (Lindsten T et al, 2000; Wei MC et al, 2001), demostrando su relevancia en la apoptosis de muchos tipos celulares. En células sanas, Bax se presenta como un monómero con distribución citosólica (Hsu YT et al, 1997), mientras que Bak es una proteína oligomérica integrada en la membrana mitocondrial (Chittenden T et al, 1995) que en su forma inactiva se encuentra unida a Mcl-1 o Bcl-X_L (Willis SN et al, 2005). Cuando la célula recibe un estímulo apoptótico, Bax y Bak se oligomerizan, cambian su conformación y se integran en la membrana mitocondrial donde desencadenarán una serie de sucesos que conllevarán a la salida de *citocromo c* de la mitocondria, formación del apoptosoma y activación de las caspasas (Willis SN et al, 2005).

- Proteínas “sólo BH3” (BH3-only): poseen sólo el pequeño dominio central BH3 de 9 aminoácidos, necesario y suficiente para la inducción de apoptosis. Sin embargo, estas proteínas no pueden ejercer su acción apoptótica en ausencia de Bax y Bak (Zong WX et al, 2001), de modo que parecen actuar en la misma vía de apoptosis como sensores del daño celular, interaccionando directamente con los miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 inactivándolos, mientras que las proteínas “tipo Bax” parecen estar implicadas en la permeabilización de la membrana mitocondrial. Cada una de estas proteínas “sólo BH3” está implicada en la transducción de señales mortales específicas, así como en el control de la homeostasis en determinados tejidos y en el desarrollo.

Se han identificado al menos 10 proteínas en mamíferos pertenecientes a este subgrupo: **Bad**, **Bid**, **Bik/Nbk**, **Bim**, **Blk**, **Hrk**, **Noxa**, **Bnip3**, **Puma** y **Bmf**. **Bim** participa en la

apoptosis inducida en linfocitos por la deprivación de citoquinas, flujo de Ca^{2+} o drogas como el taxol y en el mantenimiento de la homeostasis (Bouillet P et al, 1999). **Bmf** está implicado en un proceso de muerte celular inducida por separación de la matriz extracelular (Puthalakath H et al, 2001). **Noxa** (Oda E et al, 2000) y **Puma** (Nakano K and Vousden KH, 2001) se descubrieron como proteínas inducidas por la activación de p53 como respuesta al daño al DNA o activación de oncogenes. Recientemente se ha descrito su activación independiente de p53 (Erlacher M et al, 2005; Perez-Galan P et al, 2006). Estudios recientes han demostrado que Noxa es la proteína “sólo BH3” que permite la activación de Bak mediante su unión, y consecuente desplazamiento de Bak, con Mcl-1. **Bid** participa en la apoptosis inducida por receptores de muerte. **Bad** y **Hrk** están implicados en la apoptosis inducida por deprivación de factores de crecimiento (Sanz C et al, 2000; Zha J et al, 1997) y **Bik** participa en la apoptosis inducida por ligación de IgM en células B (Jiang A and Clark EA, 2001). **Bik** es el homólogo murino de Bik (Hegde R et al, 1998).

Los miembros de los distintos grupos homo- o heterodimerizan entre sí. Las proteínas “sólo BH3”, con la posible excepción de Bid, ejercen su acción apoptótica por unión con miembros antiapoptóticos de la familia, neutralizando así su acción y liberando y activando los miembros proapoptóticos permitiendo, de este modo, la inducción de apoptosis. La hélice α anfipática de su dominio BH3 puede unirse al surco hidrofóbico generado por las hélices α de los dominios BH3, BH2 y BH1 de un miembro antiapoptótico (Sattler M et al, 1997).

Estas proteínas han de ser previamente activadas por una señal de muerte. Así Bid es proteolizado por acción de la caspasa-8 (Luo X et al, 1998) originando una forma truncada de Bid (**tBid**) que parece sufrir una miristilación en su extremo N-terminal, previa a su inserción en la membrana externa mitocondrial (Zha J et al, 2000). Se ha postulado que es tBid la que provoca el cambio conformacional e inserción de Bax a la membrana mitocondrial, intercomunicando de este modo la vía extrínseca con la intrínseca (Slee EA et al, 1999a). Bim ha de ser liberado de su unión con la cadena ligera de la dineína citoplasmática a la que se une mediante el adaptador LC8, proteína motora que se mueve sobre microtúbulos (Puthalakath H et al, 1999) y Bmf de su asociación con el complejo motor miosina V que se mueve sobre filamentos de actina (Puthalakath H et al, 2001). La actividad de otras proteínas de esta subfamilia, como Noxa, Puma y Hrk es controlada a nivel transcripcional (Puthalakath H and Strasser A, 2002). Asimismo, Bim se induce transcripcionalmente en la apoptosis inducida en linfocitos de ratón por deprivación de IL-3 (Shinjyo T et al, 2001) e IL-2 (Stahl M et al, 2002). En el caso de Bad, su fosforilación en residuos de serina por Akt o proteína quinasa A induce su unión a la proteína 14-3-3, que lo mantiene secuestrado en el citoplasma hasta que una señal apoptótica induce su defosforilación y translocación a la mitocondria (Zha J et al, 1997). La activación de otros miembros de la familia como Bik parece implicar su fosforilación en residuos de serina y treonina (Verma S et al, 2001).

Estudios genéticos y funcionales realizados hasta el momento han demostrado que las proteínas “sólo BH3” requieren los miembros proapoptóticos multidominio para inducir la salida de citocromo c y la apoptosis de la célula. Recientemente, se ha descrito que las proteínas “sólo BH3” Bim y Puma presentan afinidad para unirse a los miembros antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 y A1, mientras que Bad une a los miembros antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w y Noxa presenta únicamente afinidad para Mcl-1 y A1 (Chen L et al, 2005) (figura 1.5.6). La unión de estas proteínas “sólo BH3” con sus respectivos miembros antiapoptóticos permite desplazar la unión de estos últimos con miembros proapoptóticos activando su oligomerización y la activación de la apoptosis. Asimismo, se ha visto que Mcl-1 se encuentra unido a Bak (Bae J et al, 2000; McDonnell TJ et al, 1996; Moshynska O et al, 2004; Zhou P et al, 1997) pero un estímulo apoptótico permite la interacción de Noxa con Mcl-1 provocando la liberación de Bak y permitiendo así su oligomerización y activación de la vía apoptótica mitocondrial (Chen L et al, 2005; Perez-Galan P et al, 2006).

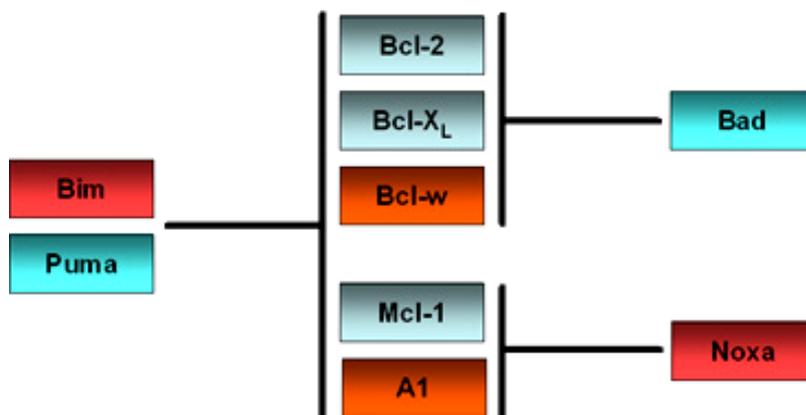


Figura 1.5.6. Selectividad en la unión entre proteínas “sólo BH3” y los miembros antiapoptóticos de la familia de proteínas de Bcl-2.

1.6.- Conexión entre las vías extrínseca e intrínseca

Las vías extrínseca e intrínseca del proceso de apoptosis están conectadas entre sí por la proteína “sólo BH3”, Bid (Danial NN and Korsmeyer SJ, 2004; Wajant H, 2002). La activación de los receptores de muerte induce la formación del DISC y activación de la caspasa-8 que, entre otros efectos, proteoliza Bid. tBid provoca un cambio de conformación de Bax y se

transloca también a la mitocondria donde induce la salida de citocromo c y la activación de la vía intrínseca.

Algunos tipos celulares requieren esta conexión de vías como amplificación de la señal de apoptosis. Esta necesidad permite clasificar las células en dos tipos: 1) células de tipo I, en las que el procesamiento de la caspasa-8 es suficiente para activar la cascada de caspasas y desencadenar el proceso apoptótico y 2) células de tipo II, donde la activación de caspasas depende de la translocación de tBid a la mitocondria, oligomerización Bax/Bak y salida de citocromo c y, por lo tanto, requiere la implicación de la vía intrínseca y la participación de proteínas de la familia de Bcl-2 (Danial NN and Korsmeyer SJ, 2004).

1.7.- Implicación de la mitocondria en el proceso de apoptosis

Como ya he ido mencionando a lo largo de esta tesis, la mitocondria es uno de los principales orgánulos implicados en el proceso de muerte celular. Los mecanismos reguladores que subyacen tanto en la apoptosis como en la necrosis parecen coincidir en que la permeabilización de la membrana mitocondrial constituye un acontecimiento crucial (Green DR and Reed JC, 1998; Kroemer G, 1998).

Durante la apoptosis se produce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y, con ello, la liberación de proteínas proapoptóticas confinadas en el espacio intermembrana como **citocromo c** (Liu X et al, 1996), **AIF** (*Apoptosis-inducing factor*) (Susin SA et al, 1999), **Smac/Diablo** (*Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP-Binding Protein with Low pI*) (Du C et al, 2000; Verhagen AM et al, 2000), **Omi/HtrA2** (Martins LM et al, 2002), **endo G** (*endonuclease G*) (Li LY et al, 2001; Wang X, 2001) y, según algunos autores, cantidades discretas de procaspasas-2, -3 y -9 (Susin SA et al, 1999). Estas proteínas liberadas al citosol continuarán con la ejecución de la apoptosis (figura 1.7.1).

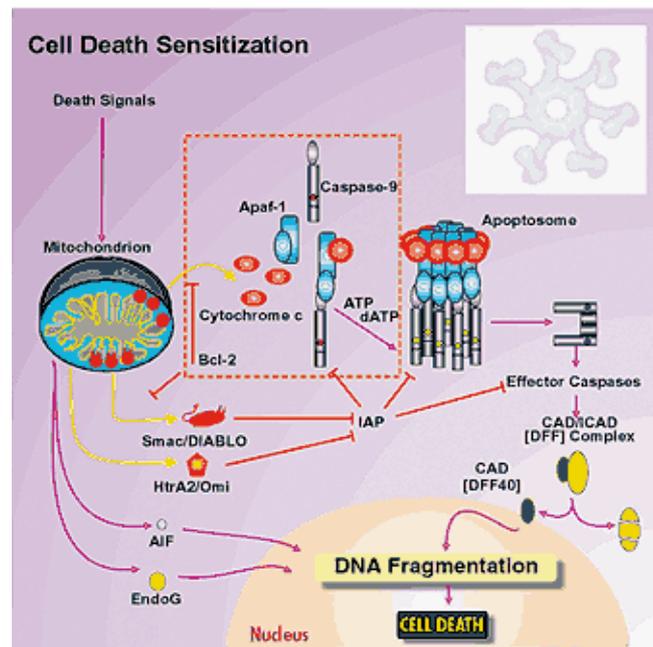


Figura 1.7.1. Esquema de la implicación de la mitocondria en la apoptosis.

Existen dos modelos para explicar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial:

1) Formación de canales por proteínas de la familia de Bcl-2. Propone la formación de canales multiméricos por proteínas proapoptóticas tipo Bax, mediante su oligomerización en la membrana externa mitocondrial, permitiendo la salida de proteínas de gran tamaño (Smac/Diablo) y factores apoptogénicos (citocromo c, AIF) al citosol sin alterar las funciones de la mitocondria. Si los niveles de ATP son suficientes y la célula es capaz de activar el apoptosoma, la célula morirá por apoptosis. En caso contrario, la muerte podría ser independiente de caspasas, similar a la necrosis. Este modelo explicaría las situaciones en las que se produce liberación de factores apoptogénicos antes de la despolarización mitocondrial.

2) Apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP). Propone la apertura del denominado poro de transición de permeabilidad, integrado por **VDAC (Voltaje Dependent Anion Channel)**, **ANT (Adenine Nucleotides Translocator)** y ciclofilina D, junto con otras proteínas, en los lugares de contacto entre las membranas mitocondriales interna y externa (Crompton M, 1999; Marzo I et al, 1998). La apertura del poro provocaría la pérdida de $\Delta\Psi_m$ y de ATP. Los solutos y agua entran en la matriz provocando un hinchamiento y la rotura de la membrana externa mitocondrial, permitiendo la liberación de proteínas del espacio intermembrana. Dependiendo de la intensidad del estímulo, este proceso terminará en necrosis (estímulo intenso) o apoptosis (estímulo débil). Asimismo se ha descrito la participación de

proteínas de la familia de Bcl-2 en el control de la apertura del PTP. Los miembros proapoptóticos interaccionarían con ANT (Marzo I et al, 1998) o VDAC (Shimizu S et al, 1999) para permitir la apertura del poro, mientras que los miembros antiapoptóticos mediarían el cierre (Shimizu S et al, 1999; Shimizu S et al, 2000). Este modelo explicaría aquellas situaciones en las que la pérdida de $\Delta\Psi_m$ precede a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la activación de caspasas.

1.7.1.- Citocromo c

Estudios de cinética *in vivo* y *ex vivo* han demostrado que la salida de citocromo c de la mitocondria es rápida y completa pero tan sólo son necesarios niveles discretos de citocromo c en el citosol para desencadenar la respuesta apoptótica. En algunas células, especialmente células tumorales con elevados niveles de IAP's, la cantidad de proteínas proapoptóticas que salen de la mitocondria es crítica para sobrepasar el efecto protector de la inhibición de las caspasas. La mitocondria es un orgánulo altamente compartimentado y sólo un 15-20% del citocromo c se encuentra en el espacio intermembrana. Existen estudios que apuntan que la salida del citocromo c de la mitocondria se da en dos fases, las dos induíbles por proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2. En la primera fase, el citocromo c del espacio intermembrana es liberado al citosol a través de la membrana mitocondrial externa. Durante la segunda fase, se produce una redistribución del citocromo c secuestrado en otros compartimentos de la mitocondria (crestas mitocondriales de la membrana interna), lo que conlleva una remodelación estructural de la membrana interna mitocondrial y cambios en la unión del citocromo c a lípidos de membrana como la cardiolipina. Esta remodelación mitocondrial, que podría ser causada por tBid y parece ser independiente de Bax y Bak, provocaría la movilización del citocromo c desde el interior de las crestas mitocondriales, de forma que éste podría ser liberado totalmente (Scorrano L et al, 2002).

1.7.2.- Liberación de AIF: muerte independiente de caspasas

AIF (*Apoptosis-inducing factor*) es una flavoproteína de 57 kDa que reside en el espacio intermembrana mitocondrial y posee una alta homología con las oxidoreductasas bacterianas. Bajo condiciones de inducción de apoptosis, AIF es liberado al citoplasma y se transloca al núcleo donde se acumula y ejerce su acción apoptótica. AIF induce condensación periférica de la cromatina y rotura del DNA en fragmentos no oligonucleosomales de alto peso molecular (~ 50kpb) (Susin SA et al, 2000). Esta fragmentación a gran escala precede la degradación oligonucleosomal propia del proceso de apoptosis. AIF actúa de forma independiente de la acción de las caspasas, ya que su efecto apoptótico no es abolido por sus inhibidores (Z-VAD.fmk). Sin embargo, se ha visto que AIF puede activar la caspasa-9 y, por lo tanto, otras caspasas, mediante un mecanismo indirecto dependiente de la mitocondria.

1.7.3.- Smac/Diablo

Smac/Diablo (*Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP-Binding Protein with Low pI*) (Du C et al, 2000; Verhagen AM et al, 2000) es otra de las proteínas proapoptóticas presentes en el espacio intermembrana mitocondrial, que es liberada cuando se desencadena el proceso de apoptosis. Se sugiere que la liberación de Smac/Diablo es paralela a la del citocromo c (Du C et al, 2000), y una vez en el citoplasma interacciona con las IAP's previniendo la inhibición de las caspasas, tanto iniciadoras o efectoras como ejecutoras (Chai J et al, 2000). Smac/Diablo desplaza la unión de las IAP's con las caspasas mediante interacción de su extremo N-terminal con alguno de los dominios BIR presentes en las IAP's, aunque, por el momento, sólo se ha descrito la interacción de Smac/Diablo con la proteína XIAP.

1.8.- Otras vías de activación de caspasas y apoptosis

Existe otra vía de apoptosis utilizada por los linfocitos T citotóxicos (CTL's) y las células NK (*natural killer*) para eliminar células infectadas por virus. Esta vía consiste en la secreción de unos gránulos que contienen proteínas inductoras de apoptosis, como la **perforina**, una proteína formadora de poros y las **granzimas**, serinproteasas que proteolizan diversos sustratos, incluyendo algunas caspasas y sustratos de estas y actúan destruyendo la célula diana. La granzima B es introducida en la célula por canales de perforina y proteoliza la caspasa-3, Bid y ICAD provocando la apoptosis de la célula. Algunas células, entre ellas CTL's y NK, expresan una proteína inhibidora de la granzima B, la PI-9 (*Proteinase inhibitor 9*), que protege estas células de su efecto (Danial NN and Korsmeyer SJ, 2004; Reed JC et al, 2002).

Otro tipo de muerte celular es la autofagia, un proceso dinámico y coordinado con la apoptosis, en el que porciones de citoplasma son secuestrados en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que se destruyen de forma que la célula se va eliminando por endocitosis (Klionsky DJ and Emr SD, 2000). La autofagia es un proceso descrito, fundamentalmente, en células del sistema nervioso.

1.9.- Transducción de señales en la regulación de la apoptosis

Las células del organismo reciben un gran número de señales de forma constante que son integradas y generan respuestas celulares como proliferación, diferenciación, quiescencia o apoptosis. Estas señales pueden ser externas o internas. La mayoría de las señales externas son de naturaleza proteica y deben ser reconocidas por receptores de membrana que transmitan la señal al interior de la célula. La integración de todas estas señales se da en orgánulos específicos, de forma que cada señal debe de ser transmitida desde el lugar donde se recibe hasta el orgánulo donde se integrará generando una respuesta. Esta integración se da gracias a la acción secuencial de varias proteínas y se conoce con el nombre de transducción de señales. La señal se transmite de una proteína a otra mediante interacciones y modificaciones postraduccionales que provocan cambios en la conformación de la siguiente

proteína de la vía transductora. La célula recibe múltiples señales, de forma que hay varias vías de transducción de señales actuando a la vez e interconectándose. La respuesta celular resulta de la integración de estas señales y se genera por cambios en la expresión de genes y/o modificaciones postraduccionales de proteínas, que resultan en cambios en su función.

La maquinaria apoptótica se encuentra presente en todas las células pero está inactiva por una serie de mecanismos que evitan una entrada descontrolada en apoptosis (Allen PD et al, 1993; Raff MC, 1992). El conjunto de señales de supervivencia y de muerte celular que recibe una célula modula los niveles de proteínas proapoptóticas, lo que determina la supervivencia o muerte por apoptosis de la célula.

Todas estas vías están interconectadas entre sí formando una compleja red de señalización.

1.9.1.- Vías de supervivencia

Las **MAPK's** (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) son una familia de serín/treonín-quininas implicadas en la regulación de muchos procesos celulares distintos (proliferación, diferenciación y supervivencia). Están presentes en todos los organismos estudiados y su método de regulación consiste en la activación secuencial de tres familias de quininas: las **MKKK** (*MAPK Kinase Kinase*), las **MAPKK** (*MAPK Kinase*) y las **MAPK** (Franklin RA and McCubrey JA, 2000; O'Gorman DM and Cotter TG, 2001). Existen muchos miembros dentro de esta familia de MAPK's implicados en supervivencia y apoptosis, entre ellos **ERK1** y **2** (*Extracellular Signal-Related Kinase 1 and 2*), **JNK** (*c-Jun N-terminal protein Kinase*) y **p38-MAPK**. La vía de ERK1/2 se ha implicado en supervivencia celular, mientras que JNK y p38-MAPK tienen tanto actividad apoptótica como antiapoptótica.

ERK es activada por una cascada de quininas donde participan Ras, Raf-1 y MEK1 (*MAP Kinase/ Erk Kinase-1*). Esta activación provoca translocación de ERK al núcleo, donde actúa regulando factores de transcripción de genes implicados en ciclo celular y supervivencia. Durante el proceso de apoptosis, la caspasa-3 activa puede proteolizar e inactivar Raf-1, inhibiendo, de esta forma, la vía de supervivencia (Widmann C et al, 1998). Por el contrario, la vía de ERK inhibe la apoptosis inducida por estímulos como la hipoxia (Buckley S et al, 1999), la retirada de factores de crecimiento (Erhardt P et al, 1999) y algunos agentes quimioterápicos (Anderson CN and Tolkovsky AM, 1999).

JNK y p38-MAPK se activan en respuesta a toxinas, estrés fisiológico, citocinas inflamatorias y daño a DNA (Cross TG et al, 2000; O'Gorman DM and Cotter TG, 2001). JNK y/o p38-MAPK son fosforiladas e inactivadas, fosforilando otros factores de transcripción implicados en apoptosis y supervivencia celular. La caspasa-3 puede activar JNK por acción de MEKK1 (*MEK Kinase-1*) y los inhibidores farmacológicos de estas quininas inhiben la apoptosis inducida por estrés celular en determinadas situaciones. En algunos casos, pero, la apoptosis es independiente a su activación. De esta forma, el efecto de la activación de JNK y

p38-MAPK sobre la apoptosis depende del tipo celular, del estímulo y del estado de activación de las otras vías implicadas.

La **PI3K** (*Phosphoinositide 3-Kinase*) es una proteína quinasa que fosforila lípidos de la familia del fosfatidilinositol, participa en procesos de supervivencia, proliferación y envejecimiento celular y tiene capacidad oncogénica. La PI3K es un heterodímero formado por una subunidad reguladora y una subunidad catalítica.

La actividad PI3K genera fosfolípidos que actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales. Estos fosfolípidos actúan sobre proteínas diana como **PDK1** (*Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*), **Akt/PKB** (*Protein Kinase B*), algunas **GTPasas**, **PKC** (*Protein Kinase C*), **SHIP** (*Src homology 2-containing-inositol 5'-phosphatase*) y **PTEN** (*Phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome ten*). PDK1 es una quinasa ubiqa y constitutivamente activa que fosforila a Akt, entre otras. Las fosfatasas PTEN y SHIP actúan defosforilando los fosfatidilinositoles generados por la actividad de PI3K y regulan la vía negativamente.

Akt, también llamada PKB (protein kinase B), presenta un dominio de plecstrina C-terminal que le permite interactuar con fosfolípidos de membrana, un dominio catalítico y una zona reguladora N-terminal. Se distinguen tres isoformas diferentes (α , β y γ) (Datta SR et al, 1999). La unión de factores de crecimiento a sus receptores de membrana induce fosforilación de PI3K que genera fosfolípidos, los cuales se unen a dominios homólogos a plecstrina (PH) presentes en la forma inactiva y citoplasmática de Akt, permitiendo un cambio de conformación (Milburn CC et al, 2003; Pim D et al, 2005) y su relocalización a la membrana plasmática de las células donde será fosforilada en un residuo serina (ser473) del extremo C-terminal por un mecanismo dependiente de PI3K, o bien, por una integrina independiente de PI3K, **ILK** (*Integrin-linked Kinase*), y en un residuo treonina (thr308) a través de PDK1 (Chiu D et al, 2005; Hanada M et al, 2004). La fosforilación de estos dos residuos de Akt conlleva a su activación y fosforilación de sus sustratos (Hanada M et al, 2004), entre los cuales se destacan proteínas implicadas en procesos de proliferación, síntesis proteica, supervivencia, apoptosis y angiogénesis como p21/waf1, p27, MDM-2, Bad, caspasa-9, hTERT (*Human Telomerase Reverse Transcriptase*), BRCA-1 (*Breast Cancer gene-1*) y FKHRL1 (*Forkhead Transcription Factor 1*) entre otros. Akt está regulada negativamente por la proteína fosfatasa PTEN, identificada inicialmente como un gen supresor de tumores, que bloquea la translocación de Akt a la membrana plasmática. PTEN está frecuentemente mutada en las células transformadas, llevando a una hiperactividad de Akt (Stambolic V et al, 1998). Una vez inactivada, se le conocen un gran número de sustratos.

La familia de proteínas **PKC** (*Protein Kinase C*) comprende quinasas con 12 isoenzimas con actividad serín/treonín-quinasa (Mellor H and Parker PJ, 1998). Todas las isoenzimas contienen un dominio quinasa conservado en la zona C-terminal y una zona

reguladora en N-terminal, donde se sitúan también los dominios de interacción con la membrana y una secuencia autoinhibidora específica para cada isoenzima. Esta estructura hace que la actividad de las PKC sea altamente regulable por cambios conformacionales.

En condiciones normales, las PKC se encuentran en el citosol en una conformación inactiva. En respuesta a determinados estímulos externos, algunos fosfolípidos de membrana son hidrolizados provocando la translocación de PKC hacia la membrana y su activación. Las PKC se regulan de forma compleja por fosforilación, por unión a cofactores y a proteínas adaptadoras (Newton AC, 2001).

Las funciones de las distintas PKC son muy variadas, de forma que cada una puede tener sustratos diferentes. Algunos de estos sustratos están relacionados con la inhibición de la apoptosis, como Bcl-2, Bad, I κ B α y p53. Otros sustratos de PKC son GSK3, p70^{S6K}, Raf, JAK, Fos, CREB y Btk, entre otros. De forma general, PKC α , PKC β y las formas atípicas se relacionan con inhibición de apoptosis, mientras que PKC δ , PKC θ y PKC ϵ están más relacionadas con inducción de apoptosis.

NF- κ B (Nuclear Factor κ B) es un factor de transcripción heterodimérico formado por dos subunidades, p50 y p65 (*RelA*). La subunidad p50 contiene el dominio de unión a las secuencias diana del DNA, mientras que p65 contiene el dominio de transactivación para el reclutamiento de coactivadores de la transcripción. NF- κ B induce la expresión de genes supresores de la apoptosis, como miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 (Bcl1 y Bcl-X_L) y algunas IAP's. En condiciones normales, NF- κ B se encuentra inactivo en el citosol por la unión de su inhibidor I κ B. Cuando I κ B es fosforilado por **IKK (I κ B Kinase)**, se libera NF- κ B y se transloca al núcleo donde activará factores de transcripción implicados en supervivencia y proliferación, como c-FLIP. El I κ B fosforilado es ubiquitinizado y rápidamente degradado por el proteasoma. Se han propuesto, como agentes antitumorales, el uso de inhibidores de IKK que impedirían la fosforilación de I κ B y, por tanto, la acción de NF- κ B, así como el uso de inhibidores del proteasoma, impidiendo la degradación de I κ B ubiquitinado (Nakanishi C and Toi M, 2005).

p53 es un factor de transcripción de 393 aminoácidos codificado por el gen supresor de tumores *TP53*, ubicado en el cromosoma 17 (17p13.1). Se trata del gen más frecuentemente alterado en cánceres humanos. Está relacionado con la transcripción de genes implicados en el control del ciclo celular y la apoptosis. La expresión de p53 se induce en respuesta a daño al DNA, privación de metabolitos, daño físico a la célula y estrés oncogénico. Actúa induciendo dos procesos para evitar un crecimiento descontrolado de las células: 1) inhibe la proliferación celular parando la célula en fase G₁ del ciclo celular, o 2) induce la apoptosis para eliminar la célula dañada (Evan G and Littlewood T, 1998). La pérdida o inactivación de los dos alelos de *TP53* causa la pérdida del punto de control G₁/S del ciclo celular y de algunos mecanismos

inductores de apoptosis, lo que provoca una desregulación de la proliferación celular y un aumento del riesgo de desarrollar neoplasias.

En condiciones normales, los niveles de p53 en la célula son bajos, ya que esta se encuentra unida a **MDM-2** (*Murine double minute-2*), que induce su degradación vía proteasoma. Señales de estrés y daño al DNA inducen la fosforilación de p53 y MDM-2 impidiendo su unión y provocando la estabilización y activación de p53 (Evan G and Littlewood T, 1998).

La parada de ciclo inducida por p53 se debe, en gran parte, a la inducción del inhibidor de quinasas dependientes de ciclina, p21^{waf1/cip1}. Por el contrario, los mecanismos por los cuales p53 induce apoptosis implican la activación de genes específicos, distintos de los que causan parada de ciclo celular. Las proteínas p73 y p63 son altamente homólogas a p53. Estas dos proteínas son necesarias para la apoptosis inducida por p53 y forman parte de una compleja red de regulación del ciclo celular y la apoptosis. p73 y p63 también juegan un papel importante en la progresión tumoral y en la respuesta a la quimioterapia, aunque en menor grado que p53 (Irwin MS and Kaelin WG, 2001). p53 puede inducir apoptosis por activación transcripcional de genes proapoptóticos como Noxa, Puma, Bax, p53AIP, Apaf-1 y PERP, y por represión transcripcional de Bcl-2 y las IAP's (Schuler M and Green DR, 2001; Wu X and Deng Y, 2002). La intensidad y la cinética de expresión de estos genes depende de los niveles de p53, del tipo de estrés inducido y del modelo celular (Zhao R et al, 2000), ya que los genes inducidos por p53 críticos para su acción apoptótica pueden variar según el contexto celular. Recientemente, se ha demostrado que como respuesta al daño a DNA, p53 transloca a la mitocondria donde se une a Bcl-X_L y Bcl-2 provocando la permeabilización de la membrana y la salida de citocromo c (Mihara M et al, 2003). p53 puede actuar induciendo apoptosis por activación de Bax (Chipuk JE et al, 2004) y por unión directa con Bak, bloqueando la unión de esta proteína con Mcl-1 y activándola (Leu JI et al, 2004).

Por su parte, ATM, el gen de la *Ataxia-telangiectasia*, es una proteína quinasa "PI-3-like" que actúa por encima de p53. ATM actúa como sensor de daño al DNA y mantiene la integridad genómica promoviendo parada de ciclo celular en las fases G₁/S y/o G₂/M y reparación de este daño propagando esta señal y activando distintas dianas como c-Abl, BRCA1, CHK2, MDM-2, DNA-PK y p53. Se ha observado que en la apoptosis inducida por fármacos genotóxicos se produce una estabilización de p53 tras su fosforilación vía ATM (Banin S et al, 1998; Stankovic T et al, 2004), sugiriendo que p53 y ATM interactúan en una misma vía común (Fedier A et al, 2003) (figura 1.9.1).

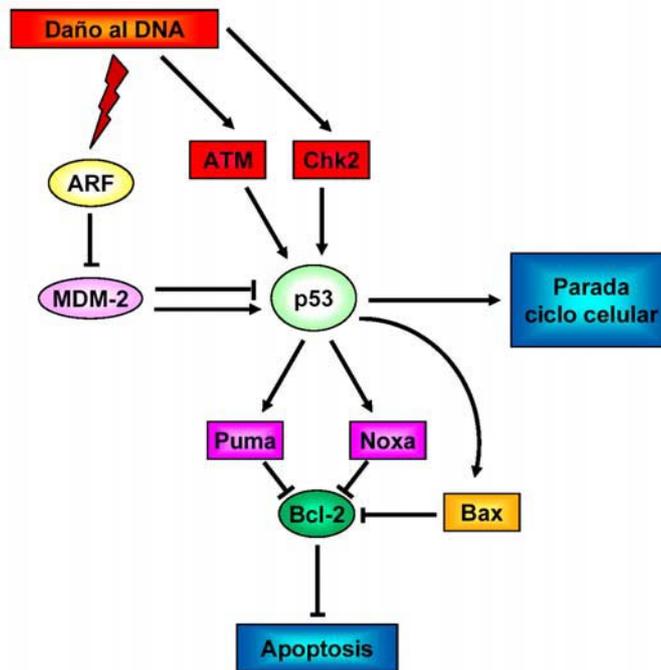


Figura 1.9.1. Esquema de la vía de daño a DNA ATM-p53.

2.- APOPTOSIS Y CÁNCER

Como ya he mencionado anteriormente, la homeostasis de los tejidos está regida por un equilibrio entre los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Todas las células disponen de los mecanismos necesarios para llevar a cabo estos procesos, y su regulación es consecuencia de la integración de señales intra y extracelulares que condicionan a la célula a seguir un camino u otro. En algunos casos, pero, este equilibrio se altera produciendo un acúmulo de células que puede originar un cáncer. Este acúmulo se puede deber bien a una proliferación descontrolada de células, una disminución del proceso normal de apoptosis, o bien a ambos casos.

La tumorigénesis requiere el acúmulo de diversas alteraciones dentro de una misma célula para adquirir un mayor índice proliferativo y volverse maligna con independencia de factores de crecimiento y supervivencia, resistencia a señales de inhibición del crecimiento, bloqueo de los sistemas que limitan la replicación, inhibición de la apoptosis, activación de

angiogénesis y invasión de tejidos y formación de metástasis (Green DR and Evan GI, 2002; Hanahan D and Weinberg RA, 2000). Los defectos en el proceso de apoptosis permiten que las células sobrevivan más allá de su vida fisiológica, permitiéndoles prescindir de factores extracelulares para la supervivencia, y protegerse frente a la hipoxia y el estrés celular que provoca el tumor. Esta inhibición de la apoptosis, también ofrece a la célula más tiempo para acumular alteraciones genéticas que pueden contribuir a la desregulación del ciclo celular, la alteración del patrón de diferenciación del tejido, la estimulación de la angiogénesis o el aumento en la movilidad y invasividad celular (Reed JC, 2003).

Los tratamientos de quimioterapia y radioterapia actúan sobre estos tumores provocando parada de ciclo celular y/o apoptosis (Reed JC, 2003). Las alteraciones en las maquinarias efectoras y reguladoras de la apoptosis pueden provocar resistencia a la quimioterapia y radioterapia. Estas alteraciones son frecuentes en el cáncer. Así, los componentes de las vías de muerte celular alterados durante el desarrollo de los tumores son buenas dianas para el desarrollo de nuevos fármacos que restablezcan la sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis, con la intención de que estas nuevas propuestas terapéuticas sean más selectivas para los tejidos tumorales que no las terapias actuales (Reed JC, 2003; Vousden KH and Lu X, 2002). Actualmente, ya existen algunos fármacos que tienen como diana terapéutica proteínas o genes implicados en distintos niveles del proceso apoptótico. En conclusión, la apoptosis se puede modular actuando a distintos niveles pero es necesario estudiar las alteraciones concretas de cada tumor, incluso en cada individuo, para determinar la mejor estrategia terapéutica a seguir en cada caso. Esta modulación del proceso apoptótico puede conducir tanto a la inducción de la apoptosis como a la sensibilización de las células tumorales a la quimioterapia y radioterapia actuales.

3.- LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA DE TIPO B (LLC-B)

3.1.- Definición y epidemiología

La leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) fue definida por primera vez en 1966 como una enfermedad caracterizada por la expansión monoclonal de linfocitos B de pequeño tamaño, con escasa capacidad de proliferación y una vida media muy larga. Estos linfocitos tienden a acumularse en el organismo invadiendo preferentemente la sangre periférica, la médula ósea y los ganglios linfáticos (Galton DA, 1966).

La LLC-B es una enfermedad frecuente en los países desarrollados occidentales, donde representa un 30% de todas las leucemias y un 75% de las crónicas, mientras que en la población asiática representa tan sólo entre un 3 y un 5% del total de leucemias diagnosticadas (Rozman C and Montserrat E, 1995). Cada año son diagnosticados de LLC-B entre 7000 y 10000 pacientes en Europa y Estados Unidos. La incidencia media de la LLC-B es de, aproximadamente, 3 casos/ 100000 habitantes/ año (Oscier D et al, 2004). La enfermedad se

manifiesta en individuos de mediana y avanzada edad. La edad media al diagnóstico es de 64 años y, raras veces, se presenta en pacientes menores de 45 años. La frecuencia de esta enfermedad aumenta progresivamente en sucesivas décadas de vida del individuo. Respecto a la incidencia según los sexos, se ha visto que hay dos hombres afectados por cada mujer. Sin embargo, se desconocen los motivos de esta diferencia (Oscier D et al, 2004).

La etiología de la LLC-B es aún desconocida. A diferencia de otros tipos de leucemia, la LLC-B no está asociada claramente a la exposición a radiaciones elevadas, condiciones ambientales determinadas, agentes químicos o benéficos. Una de las hipótesis propuestas para explicar la aparición de una LLC-B es la adquisición de alguna alteración genética en linfocitos B normales capaces de resistir y expandirse generando esta enfermedad (Chiorazzi N et al, 2005). Esta hipótesis sugiere la presencia de un componente genético responsable de la enfermedad. En algunos casos se ha podido establecer una historia familiar directa entre casos de LLC-B y esta relación se hace más clara cuando el estudio se amplía a familiares de personas afectas que padecen cualquier tipo de síndrome linfoproliferativo de tipo B asociado a una LLC-B (linfomas y enfermedad de Hogkin, principalmente). En estos casos se habla de LLC-B de tipo familiar. Estas familias corroboran la existencia de un componente genético y hereditario en el riesgo de padecer LLC-B (Houlston RS et al, 2003; Houlston RS et al, 2002; Yuille MR et al, 2000). Además, la aparición entre individuos sanos de una población celular con un inmunofenotipo idéntico al de las células de una LLC-B es de 13,5% en familiares de primer grado de pacientes con LLC-B (Rawstron AC et al, 2002), mientras que es tan sólo de un 3,5% en individuos sanos no relacionados con ningún caso de LLC-B (Chiorazzi N et al, 2005; Rawstron AC et al, 2002).

3.2.- Diagnóstico, signos y síntomas

El principal criterio en el diagnóstico de la enfermedad es la presencia de una linfocitosis absoluta en sangre periférica. A medida que aumenta la linfocitosis, los linfocitos B invaden el sistema linfático, los ganglios aumentan de tamaño (adenopatía) y se ven afectados órganos como el bazo y el hígado (esplenomegalia y hepatomegalia), todo ello acompañado por una infiltración linfocitaria (>30%) en la médula ósea. La invasión celular de la médula ósea se da en diferentes grados según el enfermo y su consecuencia es la depleción de otras poblaciones hematopóéticas como eritrocitos y plaquetas. Estos linfocitos son pequeños, con un aspecto aparentemente maduro aunque funcionalmente inactivos, y una cromatina nuclear condensada. El núcleo ocupa la mayor parte del volumen celular y prácticamente no tienen citoplasma (figura 3.2.1). Son células frágiles que se rompen fácilmente en el proceso mecánico de la extensión, adquiriendo un aspecto al microscopio de mancha, conocido como sombras de Gumprecht. Estas poblaciones de linfocitos inactivos desplazan las poblaciones inmunológicamente activas, de modo que el paciente presenta síntomas de inmunodeficiencia que se acentúan a medida que avanza la enfermedad. Entre las complicaciones más frecuentes se encuentran las infecciones, citopenias (anemia y trombocitopenia) y la

transformación de la enfermedad a formas más agresivas como el síndrome de Richter, linfoma de células grandes (LDCG-B) o leucemia prolinfocítica (Guipaud O et al, 2003; Oscier D et al, 2004).

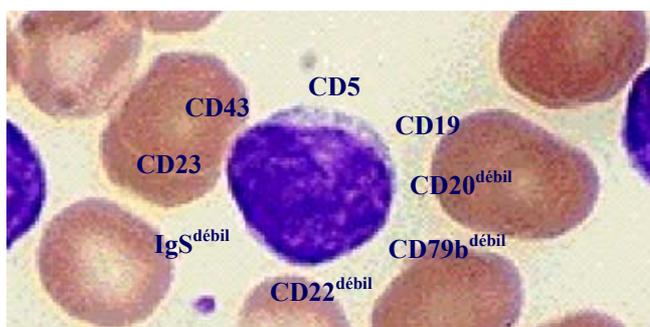


Figura 3.2.1. Aspecto morfológico de los linfocitos B de una LLC-B y marcadores característicos.

Actualmente, el diagnóstico de la LLC-B se realiza mediante la determinación inmunofenotípica de la población B acumulada en la sangre periférica (Oscier D et al, 2004). Se trata de una población monoclonal de células que se caracterizan por expresar simultáneamente los marcadores CD19, CD20 y el marcador de línea T, CD5. La positividad del marcador CD23 y la negatividad de CD10 y CD22 (figura 3.2.1), entre otros, permite realizar un diagnóstico diferencial de la LLC-B respecto otros síndromes linfoproliferativos como el linfoma de células del manto (LCM) y la leucemia prolinfocítica B (Jennings CD and Foon KA, 1997). Estas células presentan también una baja densidad de inmunoglobulinas (Ig) de superficie, normalmente IgM y/o IgD (Rozman C and Montserrat E, 1995), que constituyen los receptores de antígeno de célula B (BCR), igual que bajos niveles del marcador de superficie CD79b, característico de un fenotipo de célula B activada y madura (Chiorazzi N et al, 2005). Prácticamente no responden a los estímulos que promueven el ciclo celular en linfocitos B normales (Caligaris-Cappio F, 1996). Las Ig's de las células de LLC-B están constituidas por un solo tipo de cadena pesada y uno solo de cadena ligera, indicativo de su monoclonalidad. Es el estado mutacional de las regiones variables de las cadenas pesadas de las Ig's (**IgV_H**, *Inmunoglobulin variable heavy chain*) lo que permite clasificar las LLC-B en dos grupos por su agresividad, de modo que los casos no mutados tienen peor pronóstico que los que presentan hipermutaciones en el gen de las Ig's (Kienle DL et al, 2005). En los últimos años se ha descrito que el estado mutacional de las Ig's correlaciona con los niveles de expresión de la proteína

ZAP-70 (*zeta-associated protein 70*) (Crespo M et al, 2003; Keating MJ et al, 2003). Esta proteína es una proteína tirosín-quinasa intracelular, de la familia de proteínas tirosín-quinasa Syk-ZAP-70, que se expresa en células T y NK y está implicada en los primeros pasos de señalización de célula T por receptores de superficie. Los linfocitos B normales no expresan esta proteína. El nivel de expresión de esta proteína en linfocitos de LLC-B varía, correlacionando con el curso clínico y la agresividad de la enfermedad (Herishanu Y et al, 2005; Keating MJ et al, 2003; Kienle DL et al, 2005; Schroers R et al, 2005; Wiestner A, 2005).

3.3.- Pronóstico

La LLC-B tiene una expresión clínica muy variable que puede ir desde formas indolentes de más de 20 años de evolución a otras más agresivas de curso corto. Se han establecido diversas clasificaciones en los estadios clínicos que ayuden a predecir el pronóstico de casos individuales. Las clasificaciones más utilizadas son el sistema de Rai (Rai KR et al, 1975) (tabla 3.3.1), el de Binet (Binet JL et al, 1981) (tabla 3.3.2) y el sistema adoptado en el *Internacional Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* que es una combinación de los dos sistemas anteriores (Internacional Workshop on CLL, 1981). Estos sistemas se basan en un recuento leucocitario en sangre periférica, la invasión de ganglios linfáticos de distintas áreas del organismo y la presencia de anemia y/o trombocitopenia.

Tabla 3.3.1. Estadios clínicos de Rai

Estadio		Supervivencia media (años)
0	Linfocitosis en sangre periférica	>15
I	Linfocitosis + adenopatías	7
II	Linfocitosis + hepatomegalia y/o esplenomegalia	5
III	Linfocitosis + anemia (Hb<110 g/l)	2
IV	Linfocitosis + trombocitopenia (plaquetas<100x10 ⁹ /l)	2

Tabla 3.3.2. Estadios clínicos de Binet

Estadio	Supervivencia media (años)
A Ausencia de anemia y trombocitopenia Menos de tres áreas linfoides afectas*	>10
B Ausencia de anemia y trombocitopenia Tres o más áreas linfoides afectas*	5
C Anemia (Hb<100 g/l) y/o trombocitopenia (plaquetas< 100x10 ⁹ /l)	2

* Se consideran 5 áreas linfoides distintas: hígado, bazo y los ganglios linfáticos de los territorios cervicales, axilares e inguinales, independientemente de que su afectación sea unilateral o bilateral.

Otros criterios para la determinación del pronóstico de la LLC-B complementarios a las clasificaciones en estadios clínicos, son la edad y el sexo (Catovsky D et al, 1989), los niveles plasmáticos de $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2M$) y suero-timidinaquinasa (s-TK) (Hallek M et al, 1996) y el patrón histológico de médula ósea (Rozman C et al, 1984). Otro parámetro es la determinación del tiempo de doblaje de la linfocitosis, LDT (*lymphocyte doubling time*), calculada determinando los meses necesarios para que el número de linfocitos en sangre periférica se doble (Molica S and Alberti A, 1987; Montserrat E et al, 1986). Este parámetro, pero, puede variar a lo largo de la evolución de la enfermedad (Magnac C et al, 2003).

En los últimos años se han estudiado nuevos marcadores que reflejan mejor la evolución y heterogeneidad de este síndrome. Estos marcadores, como ya he mencionado, son el estado mutacional de los genes de las Ig's (IgV_H), la expresión de CD38 y la proteína ZAP-70 (Chiorazzi N et al, 2005). Pacientes sin o escasas mutaciones de las Ig's (la secuencia de nucleótidos difiere < 2% respecto a la línea germinal), con elevados niveles de expresión de CD38 y ZAP-70 presentan un peor curso clínico, mayor agresividad de la enfermedad y resistencia al tratamiento que los casos con mutaciones en el gen de las Ig's y bajos niveles de CD38 y ZAP-70.

3.4.- Biología de la LLC-B

En la LLC-B los linfocitos circulantes se encuentran en fase G₀ del ciclo celular y responden débilmente a estímulos mitogénicos (Montserrat E and Rozman C, 1995). A pesar de este estado quiescente, estas células expresan marcadores de activación celular en la membrana (Damle RN et al, 2002), presentan mRNA para, prácticamente, todas las citocinas analizadas (Pistoia V, 1997) y secretan algunas de estas como los linfocitos B

normales (Caligaris-Cappio F and Hamblin TJ, 1999). De este modo, las células de LLC-B tienden a ser cinéticamente quiescentes, fenotípicamente activas y funcionalmente anérgicas. Se trata de linfocitos aparentemente maduros pero con deficiente producción de anticuerpos, lo que favorece la aparición de procesos infecciosos (Caligaris-Cappio F, 2003).

Las células de LLC-B expresan niveles bajos del receptor de antígeno BCR y de la molécula CD79b (marcador de linfocito B maduro), probablemente por problemas en el anclaje de las cadenas que forman el complejo (Guipaud O et al, 2003; Payelle-Brogard B et al, 2002). Esto correlaciona con la baja señalización y la débil respuesta de las células de LLC-B a los estímulos vía BCR. Sin embargo, algunos casos tienen el BCR operativo, lo que afecta al desarrollo de la enfermedad y terapia (Chiorazzi N and Ferrarini M, 2003; Guipaud O et al, 2003; Stevenson FK and Caligaris-Cappio F, 2004).

Diversos autores han intentado determinar cuáles son las células que originan la LLC-B. Antiguamente, se creía que las células de LLC-B provenían de una transformación de linfocitos B naive que no habían estado expuestos a antígeno en el centro germinal y que, por lo tanto, no habían padecido el proceso de hipermutación somática de los genes de las inmunoglobulinas. Posteriormente se observó que, aproximadamente un 50% de los casos de LLC-B presentan hipermutaciones somáticas en las cadenas d'IgV_H, lo que sugiere que algunos clones derivan de células que sí han pasado por el centro germinal (Fais F et al, 1998).

3.5.- Citogenética y alteraciones oncogénicas

Las translocaciones cromosómicas son poco frecuentes en la LLC-B. Las únicas alteraciones genéticas descritas hasta el momento corresponden a translocaciones del gen *bcl-2* y mutaciones en los genes *TP53* y *ATM* (tabla 3.5.1). Se pueden detectar, pero, aberraciones genómicas en la mayoría de casos de LLC-B (Bea S et al, 2002; Dohner H et al, 2000). Cada paciente puede presentar varias de estas alteraciones simultáneamente. Además, no todas las células de un caso pueden presentar el mismo patrón citogenético, debido a que estas alteraciones se pueden ir adquiriendo en el transcurso de la enfermedad generando subpoblaciones linfocitarias.

Tabla 3.5.1. Alteraciones citogenéticas más comunes en la LLC-B

ALTERACIÓN	INCIDENCIA	EFEECTO
Delección 13q14	~ 55%	Inactivación de un posible gen supresor de tumores y 2 micro-RNA
Trisomía 12	~ 35%	Posible protooncogen
Delección 11q22-23	~ 20%	ATM
Delección 6q21	~ 5%	Inactivación de un posible gen supresor de tumores
Delección 17p13	~ 7%	Mutación de p53
Translocación 18q21	~ 1-4%	Activación de Bcl-2

El gran número de alteraciones citogenéticas descritas en la LLC-B y el hecho de que estas aparezcan y se acumulen a medida que avanza la enfermedad indica que aún quedan muchos genes por identificar implicados en la LLC-B.

- **Delecciones 13q14:** la pérdida homocigótica o hemizigótica de material genético en 13q14 se da en más de un 50% de los casos de LLC-B y en un 50% de casos de linfoma de células del manto (LCM) (Bea S et al, 2002; Dunham A et al, 2004). Se han descrito un gran número de genes que pueden estar en esta región, y recientemente, se han detectado 2 micro-RNA's (*miR-15* y *miR-16*). Los micro-RNA's (miRNA) son estructuras no codificantes de entre 21 y 25 nucleótidos formadas por la propia célula que regulan la función de múltiples genes silenciándolos y participan en el desarrollo de los organismos eucariotas superiores (Calin GA et al, 2002; Chiorazzi N et al, 2005). La delección de estos miRNA's implica una ventaja selectiva y la posibilidad de adquirir mutaciones adicionales (Chiorazzi N et al, 2005). Otros genes localizados en esta zona son **E4.5** (13q14.3), que codifica por una proteína de la familia de los intercambiadores de nucleótidos de guanina (Solomou EE et al, 2003) y **Leu-7**, adyacente a la zona delecionada y que parecería estar silenciado por metilación de su promotor (Hammarsund M et al, 2004). Los casos que presentan delección de 13q, sin embargo, son los relacionados con una mejor supervivencia (Stilgenbauer S et al, 2002).
- **Trisomía 12:** relacionada con una morfología atípica de los linfocitos, alta proliferación y mal pronóstico (Garcia-Marco JA et al, 1997; Gozzetti A et al, 2004; Li Q et al, 2005; Sindelarova L et al, 2005). Se ha descrito que la expresión anómala de bcl-3 en la LLC-B está relacionada con la trisomía del cromosoma 12 (Schlette E et al, 2005).

- **Deleciones 11q22-23:** zona donde se localiza el gen que codifica para la proteína ATM (Chiorazzi N et al, 2005; Stankovic T et al, 1999). Como ya he comentado anteriormente, esta proteína es uno de los sensores de daño a DNA de la célula. Se han detectado, también, mutaciones puntuales (no delecionantes) en el alelo y en casos de LLC-B familiar, sugiriendo que el gen está implicado en el desarrollo y evolución del tumor (Bullrich F et al, 1999; Stankovic T et al, 1999).
- **Deleciones 17p:** más concretamente, deleciones en 17p13 o cercanas, donde se localiza el gen supresor de tumores *TP53* que codifica para la proteína p53, también implicada en la regulación del proceso apoptótico, parada de ciclo celular y desarrollo del tumor (Chiorazzi N et al, 2005). Al igual que en el caso anterior, también se han detectado mutaciones puntuales de p53 en, aproximadamente, un 26% de los pacientes con LLC-B. La función de p53 también puede verse afectada por alteraciones en 11q (ATM). Las alteraciones de p53 están asociadas a una mayor progresión y agresividad de la enfermedad, resistencia a la quimioterapia y transformación a síndrome de Richter (Nakamura N and Abe M, 2003; Tsimberidou AM and Keating MJ, 2005). En algunos casos, las mutaciones en p53 se han adquirido como consecuencia de tratamientos previos o a lo largo de la evolución de la enfermedad (Dohner H et al, 2000; Krober A et al, 2002).
- **Translocación 18q21:** conlleva el reordenamiento del gen que codifica para la proteína Bcl-2. Esta proteína está sobreexpresada en el linfoma folicular como consecuencia de la translocación t(14;18)(q32;q21) que sitúa el gen *bcl-2* bajo el control del promotor de las cadenas pesadas de las Ig's (Bakhshi A et al, 1985; Cleary ML and Sklar J, 1985; Tsujimoto Y et al, 1985). Sin embargo, y a pesar de que la sobreexpresión de Bcl-2 se detecta en un 70% de los casos de LLC-B, la translocación no es la principal causa de este aumento, ya que tan sólo se detecta en un 1-4% de los casos y en una zona distinta a la del linfoma folicular. Una de las hipótesis propuestas para explicar este aumento en los niveles de expresión de Bcl-2 en la LLC-B es una hipometilación del locus de *bcl-2* en su extremo 5' promotor (Hanada M et al, 1993; Packham G and Stevenson FK, 2005). Los procesos de hipometilación de un gen están asociados a sobreexpresión de estos, siendo así, la hipometilación de *bcl-2* está asociada a una activación transcripcional de este proto-oncogen. Bcl-2 es un gen diana para los microRNA *miR-15* y *miR-16*, por lo que la alteración de estos microRNA, que como ya he comentado, es frecuente en la LLC-B, puede modificar los niveles de expresión de esta proteína (Calin GA et al, 2005).

3.6.- Regulación de la apoptosis en la LLC-B

Las células de LLC-B tienen una vida media muy larga "*in vivo*" y son resistentes a la apoptosis. Existen muchos factores del entorno celular que influyen e inducen esta

supervivencia celular (contacto con células vecinas, citocinas, factores de crecimiento, CD40, integrinas, etc.) (Caligaris-Cappio F, 2003). Todos estos factores actúan induciendo cambios en las proteínas que constituyen la red transductora de señales que regula la supervivencia y la apoptosis de las células. Esta serie de cambios afectan los niveles y/o función de estas proteínas.

3.6.1.- Miembros de la familia de Bcl-2 y IAP's en la LLC-B

Como ya hemos visto en páginas anteriores, las proteínas de la familia de Bcl-2 son importantes reguladoras de la apoptosis y su alteración contribuye al desarrollo del cáncer. A pesar del potencial oncogénico de estos miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, parece que la mutación directa de Bcl-2 o Bcl-X_L es rara. Sin embargo, posiblemente existen algunas mutaciones oncogénicas que actúan indirectamente aumentando los niveles de estas proteínas antiapoptóticas (Cory S et al, 2003). La sobreexpresión de Bcl-2, por ejemplo, está asociada a baja respuesta a la quimioterapia y peor pronóstico en diversos tumores (Reed JC, 1998b).

Las células de LLC-B presentan unos ratios Bcl-2/ Bax superiores a los linfocitos B control (Pepper C et al, 1997; Saxena A et al, 2004), lo que hizo hipotetizar que era este elevado ratio el que inducía una mayor supervivencia. Por lo tanto, una estrategia para contrarrestar este efecto era inducir la expresión de proteínas proapoptóticas, como Bax, disminuyendo el ratio Bcl-2/ Bax, lo que provocaba un aumento de la sensibilidad a la citotoxicidad. Sin embargo, recientemente se ha descrito que no es tan importante el ratio entre estas dos proteínas como las interacciones entre los miembros antiapoptóticos de esta familia con los miembros BH3-only, sugiriendo que la inducción de apoptosis depende, entre otros factores, de las interacciones selectivas entre estas proteínas (Chen L et al, 2005).

La alteración de una sola proteína de la familia de Bcl-2 es un fenómeno poco oncogénico pero se ha observado un sinergismo con otras alteraciones oncogénicas que afecten el ciclo celular, como son alteraciones en c-Myc o p53 (Cory S et al, 2003; Hanahan D and Weinberg RA, 2000).

Mcl-1 participa en la longevidad de las células de LLC-B y su elevada expresión en estas células se asocia a resistencias a la quimioterapia (Kitada S et al, 1998; Saxena A et al, 2004). Durante el proceso de apoptosis inducida por fármacos, se observa una disminución en los niveles de Mcl-1 (Bellosillo B et al, 1999). Existe la controversia, pero, de si esta disminución de la expresión de Mcl-1 es necesaria para la inducción de la muerte celular o es una consecuencia de ello. La reciente identificación de un polimorfismo en el promotor de Mcl-1 se ha correlacionado con una elevada expresión tanto del mRNA como de la proteína Mcl-1 en la LLC-B, que, al mismo tiempo, ha correlacionado con una rápida progresión de la enfermedad y una poca respuesta al tratamiento, atribuyendo un papel importante de Mcl-1 en el desarrollo de la LLC-B y la inducción de apoptosis en estas células (Moshynska O et al, 2004).

La sobreexpresión de las proteínas IAP es frecuente en la LLC-B. La proteína IAP mejor estudiada es la XIAP, la cuál se he detectado sobreexpresada también en algunos casos de LLC-B. Sin embargo, las IAP's no desempeñan un papel crucial en la regulación de la apoptosis en células de LLC-B igual que tampoco se ha detectado un efecto antiapoptótico inducido por las IAP's detectable en la LLC- B (Schliep S et al, 2004). Esto es debido a que los niveles de sobreexpresión de estas proteínas no son suficientes para contrarrestar los elevados niveles de expresión de Smac/Diablo, suficientes para inhibir el efecto inhibitor de caspasas de las IAP's en la LLC-B. Los antagonistas de las IAP's, Smac/Diablo y HtrA2/Omi, son liberados al citosol des de la mitocondria durante el proceso apoptótico, donde se unen a las IAP's permitiendo la activación de las caspasas. Se han diseñado péptidos sintéticos que mimetizan Smac y Omi, induciendo la apoptosis y sensibilizando algunas celulas tumorales a TRAIL y otros agentes proapoptóticos (Kater AP et al, 2005).

3.6.2.- Vía de NF-κB

NF-κB es un factor de transcripción que es activado cuando IKK fosforila el inhibidor IκBα, que se encuentra unido a NF-κB inactivo (Karin M and Lin A, 2002) (figura 3.6.2).

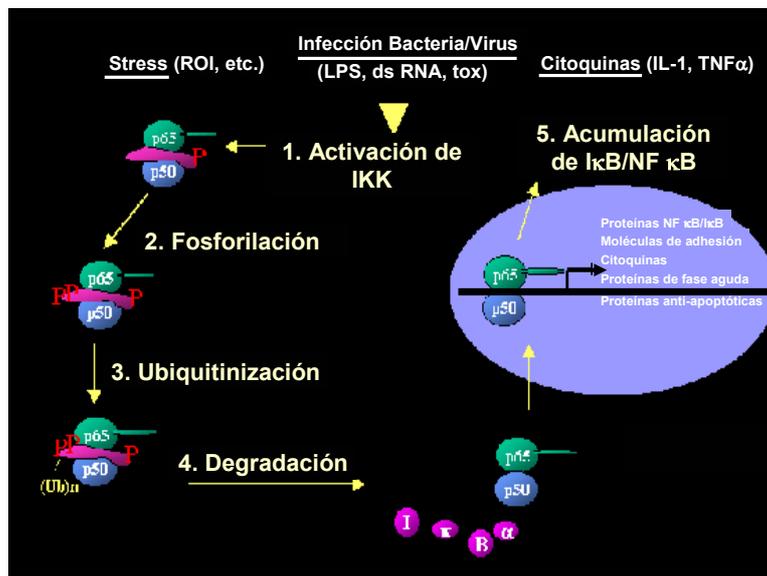


Figura 3.6.2. Vía de NF-κB. La activación de IKK induce la fosforilación de IκBα provocando su ubiquitinización y, consecuente, degradación vía proteasoma, que induce la activación de NF-κB que entra al núcleo celular activando la transcripción de proteínas antiapoptóticas entre otras.

Las células de LLC-B tienen NF- κ B activado constitutivamente (Furman RR et al, 2000), sin embargo no presentan una actividad IKK aumentada respecto a los linfocitos B normales (Munzert G et al, 2002). Se ha descrito que la unión de CD40 y activación de BCR aumenta la actividad de NF- κ B y prolonga la supervivencia *ex vivo* de las células de LLC-B (Bernal A et al, 2001; Furman RR et al, 2000). NF- κ B regula la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-X_L, las IAP's y c-FLIP (Karin M and Lin A, 2002), lo que explicaría que la ligación de CD40 indujera un efecto sobre la expresión de Bcl-X_L y FLIP en células de LLC-B (Kitada S et al, 1999). Actualmente, se están estudiando estrategias para inhibir esta activación constitutiva de NF- κ B en la LLC-B y otros síndromes linfoproliferativos. Existen diversas estrategias para bloquear la actividad de NF- κ B, actuando directamente sobre esta proteína, modulando sus elementos reguladores, I κ B y IKK, o compitiendo con su función mediante factores de transcripción *decoy* (Kater AP et al, 2005; Nakanishi C and Toi M, 2005).

3.6.3.- Vía de p53/ATM

Como ya he comentado en anteriores páginas, la vía de p53 está alterada en un alto porcentaje de casos de LLC-B. Estas alteraciones están asociadas a estadios avanzados de la enfermedad, exceso de prolinfocitos, mayor incidencia de transformación a síndrome de Richter y baja respuesta al tratamiento con análogos de nucleótidos y agentes alquilantes. La incidencia de alteraciones en p53 en la LLC-B es aproximadamente del 15% con diferencias entre pacientes no tratados (7%) y pacientes pretratados o resistentes al tratamiento (50%) (Oscier DG et al, 2002; Thornton PD et al, 2004).

4.- EL LINFOMA DE LAS CÉLULAS DEL MANTO (LCM)

4.1.- Definición

El linfoma de las células del manto (LCM) representa un 6% de los linfomas non-Hodgkin (LNH). Inicialmente, se consideró un linfoma indolente y de bajo grado pero se ha visto que se trata de un linfoma agresivo e incurable que presenta las peores características de los linfomas de bajo y alto grado (Weisenburger DD and Armitage JO, 1996), con muy mala respuesta al tratamiento. Los pacientes suelen ser varones de unos 60 años de edad media, que presentan una enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico, con afectación extranodal, sobretodo médula ósea, tracto gastrointestinal y bazo. El tiempo medio de progresión de la enfermedad es el más corto observado en linfomas y la supervivencia media oscila entre 3 y 5 años, siendo inferior en las formas más agresivas (Bertoni F et al, 2004).

4.2.- Características inmunofenotípicas

Se trata de una proliferación de células del manto con un fenotipo de célula B madura y expresión de CD19, CD20, CD22, CD79a y IgM y/o IgD de forma moderada a alta. Al igual que la LLC-B, también expresan de forma aberrante el marcador propio de línea T, CD5, pero se diferencia de la LLC-B por no expresar CD23, igual que tampoco expresan CD10. La principal característica de estas células es la presencia de la translocación t(11;14)(q13;q32), que da lugar a una sobreexpresión de ciclina D1, implicada en la regulación del ciclo celular en la fase G₁-S (Campo E, 2003).

4.3.- Variantes y pronóstico

Morfológicamente, se han definido dos variantes de esta enfermedad, una **variante típica** o clásica caracterizada por una proliferación de linfocitos B de tamaño mediano o pequeño, con núcleo irregular, cromatina condensada y escaso citoplasma, y una **variante blástica**, en la que los linfocitos son de una tamaño mayor, con un citoplasma basófilo y un núcleo redondo con cromatina laxa y presencia de nucleólos (figura 4.3.1). En esta última variante, el índice proliferativo es más alto y también la inestabilidad genómica. La variante blástica está asociada a deleciones en p16^{INK4a/ARF}, mutaciones en p53 y un cariotipo complejo (Bea S et al, 1999; Hernandez L et al, 1996; Pinyol M et al, 1997; Schlegelberger B et al, 1999). A menudo se asume que la variante blástica puede ser una transformación de la forma típica, la cual adquiere las alteraciones que la caracterizan.

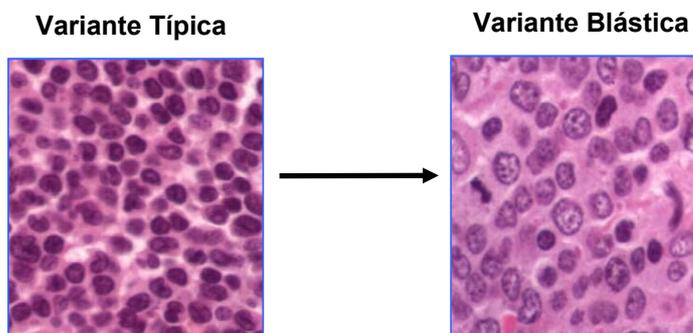


Figura 4.3.1. Morfología de las dos variantes de un LCM.

Las variantes blásticas son mucho más agresivas que las típicas. El término blastoide, utilizado recientemente y recogido en la clasificación de la OMS (Jaffe ES et al, 2001), incluye las dos variantes reconocidas como blástica y pleomórfica. El grupo de LCM pleomórficos suele tener índices proliferativos más elevados y se han detectado clonas

tetraploídes en un 80% de los casos (Ott G et al, 1997) y se caracterizan por una población celular más heterogénea.

Los estadios del LCM se determinan por la arquitectura de la infiltración de los nódulos linfáticos (Bertoni F et al, 2004). En los primeros estadios de la enfermedad, se produce una infiltración de la zona del manto del folículo linfático. Posteriormente, se produce una infiltración nodular hasta llegar al tercer estadio en el que se observa un patrón difuso de células neoplásicas.

4.4.- Alteraciones genómicas

4.4.1.- Translocación t(11;14)(q13;q32)

El principal marcador del LCM es la presencia de la translocación t(11;14)(q13;q32), que yuxtapone el gen *bcl-1* (*CCND1*) en la región 11q13 con el promotor de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas en 14q32, induciendo una sobreexpresión de la proteína ciclina D1 (Bosch F et al, 1994; Campo E et al, 1999) dando lugar a una desregulación del control del ciclo celular en la fase G₁-S. La sobreexpresión de ciclina D1 es una característica de todos los casos de LCM. Un 35% de los puntos de rotura en 11q13 se dan en la región **MTC** (*Major Translocation Cluster*) (figura 4.4.1) (Stamatopoulos K et al, 1999; Welzel N et al, 2001).

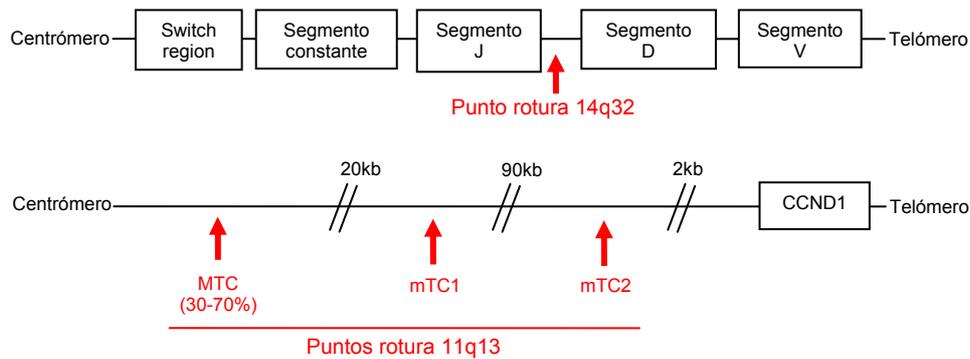


Figura 4.4.1. Diagrama de los puntos de rotura que determinan la translocación t(11;14)(q13;q32).

La ciclina D1, en combinación con las quinasas dependientes de ciclina **cdk4** y **cdk6**, regula la transición entre las fases G₁ y S del ciclo celular mediante la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (**pRb**) (Blagosklonny MV and Pardee AB, 2001; Sherr CJ, 2000) (figura 4.4.2). pRb inhibe la progresión del ciclo celular cuando se encuentra hipofosforilada debido a que, de esta forma, secuestra factores necesarios para la transcripción de genes implicados en la progresión hacia la fase S del ciclo celular, como **c-Myc** o **E2F** (Nevins JR, 1998). La fosforilación de pRb permite la liberación de estos factores de transcripción y la progresión del ciclo celular. Una vez la célula entra en fase S está destinada, de forma irreversible, a terminar el ciclo celular. Durante la fase G₁, la célula recibe una serie de estímulos que determinan si esta pasará a replicar el DNA y, posteriormente, a sí misma o saldrá del ciclo celular entrando en una fase de quiescencia (G₀). La progresión de la fase G₁ requiere la expresión de ciclina D1 por estímulos mitogénicos. Se han detectado algunos casos de variantes blastoides en los que pRb se encuentra hiperfosforilado o existe una sobreexpresión de E2F, lo que sugiere que la ciclina D1 puede tener un papel en los LCM superando el control negativo sobre el crecimiento que ejerce pRb.

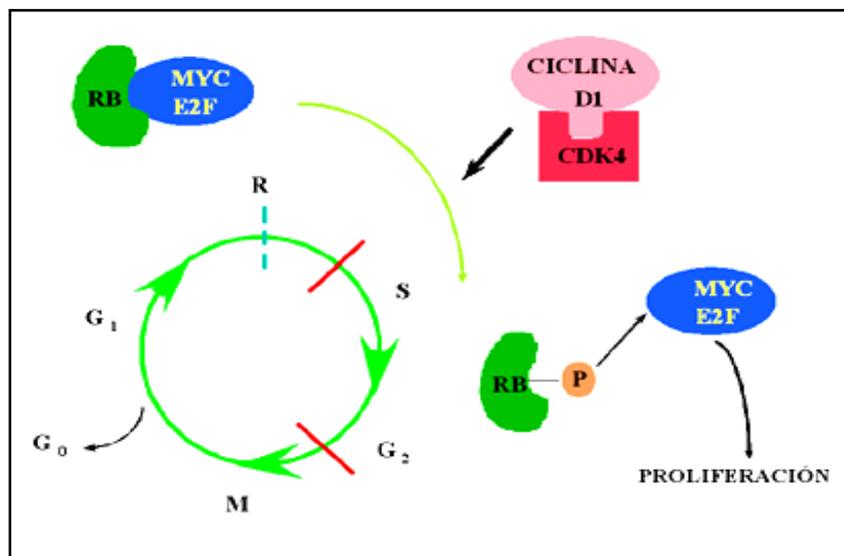


Figura 4.4.2. Implicación de la ciclina D1 sobre el ciclo celular.

En el LCM, la expresión de ciclina D1 se da de forma continua e independiente de estímulos externos (Campo E et al, 1999; Ott G et al, 1997). Sin embargo, la ciclina D1

funciona como un oncogen débil y requiere la cooperación de otros oncogenes, como c-Myc y Ras, para la transformación celular (Hinds PW et al, 1994).

4.4.2.- Alteraciones en otras proteínas implicadas en ciclo celular

El ciclo celular está regulado por los complejos formados entre proteínas **CDK** (*Cyclin-dependent kinase*) y **ciclinas**, que constituyen la subunidad reguladora de estos. Estos complejos se activan e inactivan, específicamente, en puntos clave del ciclo celular en respuesta a distintos factores, tanto internos como externos (Sherr CJ and Roberts JM, 1999). La capacidad de las CDK's para fosforilar sus sustratos puede estar regulada por proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas (**CDKi's**, *cyclin-dependent kinase inhibitors*), que se unen al complejo ciclina/CDK y paran el ciclo celular. Dentro de estas CDKi's encontramos dos familias de proteínas: las proteínas **Cip/Kip** y las **INK4**. La primera familia contiene proteínas como p21^{WAF1/CIP1} (6p21.2), p27^{KIP1} (12p13) y p57^{KIP2} (11p15.5), las cuales inhiben tanto a ciclina D como E. En la segunda familia de inhibidores del ciclo celular encontramos a p16^{INK4a} (9p21), p15^{INK4b} (9p21), p18^{INK4c} (1p32) y p19^{INK4d} (19p13). Esta familia de proteínas inhibe, de forma selectiva, a las quinasas asociadas a ciclina D.

En los LNH, la expresión de p27^{KIP1} está inversamente relacionada con la actividad proliferativa de los tumores, ya que se detecta en elevadas cantidades en células quiescentes pero desaparece cuando las células entran en ciclo (Quintanilla-Martinez L et al, 1998). Sin embargo, en el LCM la expresión de p27^{KIP1} se pierde en las variantes clásicas mientras que es positiva en las blásticas a pesar de no haberse detectado alteraciones estructurales, ni deleciones y/o mutaciones del gen. Aún así, los niveles de expresión de la proteína p27^{KIP1} son bajos en el LCM resultado de una aumentada actividad de degradación vía proteasoma, observada en un 50% de los casos de LCM (Chiarle R et al, 2000; Izban KF, 2000).

De forma aberrante, el gen que codifica para p16^{INK4a} puede codificar para otra proteína de la misma familia, p14^{ARF}. La expresión de esta proteína es inducida por la sobreexpresión de proteínas como c-Myc o E2F1, antagonizando el efecto de MDM-2, un regulador de p53. Cuando se produce un daño en el DNA de la célula, p53 para el ciclo celular mediante la activación de p21^{WAF1/CIP1} que induce la reparación de este DNA. Si el daño es excesivo y no puede ser reparado o p21^{WAF1/CIP1} no puede ejercer su función, p53 activa el proceso de apoptosis. p14^{ARF} tiene la capacidad de estabilizar la proteína p53, bloqueando su degradación mediada por MDM-2. De este modo, alteraciones en estas proteínas que participan, junto con la ciclina D1, en la regulación del ciclo celular pueden contribuir al desarrollo de un LCM y a la patogénesis del linfoma. Muchas de estas alteraciones son más frecuentes en las formas blásticas, lo que explica el elevado índice mitótico y peor pronóstico de esta variante (Hernandez L et al, 2005).

La delección de p16^{INK4a} es frecuente en el LCM y suele ir acompañada de codelección de p15^{INK4b}, p14^{ARF} (Gronbaek K et al, 1998; Pinyol M et al, 1998; Pinyol M et al, 2000) y del gen MTAP implicado en la vía de síntesis intrínseca de AMP, necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y de ATP. Estos otros genes suelen estar conjuntamente delecionados con p16^{INK4a} debido a su proximidad en el locus 9p21. Se han detectado alteraciones en p16^{INK4a} en casos que no presentan mutaciones en p53, indicando que ambas alteraciones pueden ser mecanismos independientes de progresión del tumor.

La proteína metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) no está implicada directamente en ciclo celular. Se trata de una enzima fundamental para la síntesis de adenina y metionina a partir de 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina (MTA) que, por acción de MTAP, da lugar a adenina, necesaria para la formación de AMP y la síntesis de ácidos nucleicos y ATP, y 5-metiltioribosa-1-fosfato (MTR-1-P) que es convertida a metionina por una serie de oxidaciones mediadas por la enzima 2-ceto-4-metiltiobutirato (Batova A et al, 2005; Behrmann I et al, 2003). Las células deficientes en MTAP dependen totalmente de la vía de síntesis *de novo* para la síntesis de adenina a partir de inosín-monofosfato (IMP). Como ya he comentado, por su proximidad con el gen *INK4a*, el gen de *MTAP* se ha visto codelecionado con *p16* en gran número de tumores. Sin embargo, también se han detectado algunos casos en los que hay expresión del RNA mensajero de MTAP y expresión de p16 pero no se expresa la proteína MTAP, lo que sugiere que existen otros mecanismos de regulación de esta proteína, entre los que se cuentan la hipermetilación de su promotor (Hellerbrand C et al, 2005; Ishii M et al, 2005).

4.4.3.- Delecciones de 11q y ATM

Entre un 20 y un 40% de los casos de LCM presentan delección de 11q22-23 (Bentz M et al, 2000; Monni O et al, 1998; Stilgenbauer S et al, 1999) relacionada con una pérdida de expresión y inactivación de la proteína ATM en un 75 % de los casos (Camacho E et al, 2002; Fang NY et al, 2003). ATM es una fosfoproteína implicada en la respuesta al daño a DNA y que para el ciclo celular en la fase G₁/S. La pérdida de actividad de ATM se ha visto relacionada con un aumento del riesgo de translocaciones cromosómicas durante el reordenamiento VDJ (Liao MJ and Van Dyke T, 1999; Petiniot LK et al, 2000; Stankovic T et al, 2002). Así, los casos que presentan ATM inactivado padecen un número mayor de alteraciones cromosómicas (Camacho E et al, 2002). Parece que en los LCM la inactivación de ATM podría actuar sinérgicamente con la sobreexpresión de ciclina D1, anulando los puntos de control del ciclo celular y favoreciendo el acúmulo de alteraciones genéticas y el desarrollo del linfoma.

La inactivación del gen *ATM* en los LCM se puede dar por delecciones bialélicas asociadas a mutaciones *sin sentido*, o por mutaciones truncantes que dan lugar a la inestabilidad de la proteína. El hecho de que estas mutaciones se den tanto en variantes

clásicas como agresivas, sugiere que este cambio puede ser un fenómeno inicial en la patogénesis de estos tumores.

Como ya he comentado en otras ocasiones a lo largo de esta tesis, una de las dianas de ATM es la proteína p53. En el LCM, se han detectado mutaciones de ATM tanto en casos con mutación del gen *TP53* como en casos no mutados, sugiriendo que las dos alteraciones pueden actuar de forma independiente en la patogénesis de estos tumores (Rosenwald A et al, 2003).

4.4.4.- Otras alteraciones genómicas

Se ha sugerido que la activación de la ciclina D1 no es suficiente para inducir la transformación maligna de este linfoma. Existen otras alteraciones genómicas implicadas en la evolución del LCM. Así se han descrito ganancias de material genómico que parecen implicar oncogenes y pérdidas que pueden ser regiones potenciales donde se hallan genes supresores de tumores (tabla 4.4.1). La utilización de microarrays ha demostrado que entre 300 y 400 genes se encuentran alterados en el LCM en comparación con los linfocitos B normales, y la expresión diferencial de alrededor de un millar de genes diferencia el LCM de otros linfomas no-Hodgkin de tipo B (LNH-B) (Rosenwald A et al, 2003; Rubio-Moscardo F et al, 2005). Un ejemplo de estos casos son las deleciones del cromosoma 1p21, presente en alrededor de un tercio de los casos de LCM pero ausente en otros LNH-B. Esta región contiene el gen supresor de tumores *CDC14A*, esencial en el control de la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA. Su deleción causa defectos en los cromosomas de las células descendientes (Rubio-Moscardo F et al, 2005).

La deleción de 9q también parece estar implicada con un mal pronóstico. En esta región se han descrito las deleciones de *p16^{INK4a}*, frecuentes en las variantes blásticas del LCM. Recientemente, y debido a su proximidad, se ha postulado una codeleción del gen *MTAP* con el gen *p16^{INK4a}*, ambos implicados en la proliferación celular.

Existen dos tipos de alteraciones diferentes que afectan el cromosoma 10p, una en la región 10p12 que implica la amplificación del gen *BMI1*, oncogen de un grupo *policomb* que coopera con *c-myc* en la generación de linfomas y regula el ciclo celular a través de la represión de *p16^{INK4a}* (Rosenwald A et al, 2003; Rubio-Moscardo F et al, 2005). A 200kb de este gen se encuentra el gen *PIP5K2A*, que se ha visto también amplificado en algunos casos de LCM. La otra alteración descrita se ha detectado en la región 10p14, y conlleva la pérdida de expresión del gen *PRKCQ* que codifica para la forma PKC ζ , la serín-treonín-quinasa necesaria para la activación inducida por el receptor de célula T de NF- κ B. Esta deleción no es única del LCM pero sí la deleción simultánea a la amplificación de 10p12 (Rubio-Moscardo F et al, 2005).

En aproximadamente un 50% de los casos de LCM, se han detectado deleciones de los genes microRNA, *miR-15* y *miR-16* (13q14), que regulan la expresión de otros genes.

Estas deleciones suponen una ventaja selectiva y la posibilidad de adquirir mutaciones adicionales para las células de LCM.

También se han descrito alteraciones que diferencian entre los distintos subtipos de LCM, así las formas leucemizadas de LCM se caracterizan por presentar frecuentes mutaciones en el gen IgV_H , lo que le confiere un curso clínico más indolente que las formas de LCM nodal. El LCM leucemizado se asocia a pérdidas del cromosoma 8p, con deleciones del gen que codifica para los receptores de Trail, siendo más frecuente la pérdida de expresión del receptor DR5 de Trail (Rubio-Moscardo F et al, 2005).

Alteraciones en 8q22-24 implican el oncogen *c-Myc*, que se encuentra sobreexpresado en algunos casos de LCM (Bea S et al, 1999; Hernandez L et al, 1999; Hofmann WK et al, 2001; Martinez-Climent JA et al, 2001) confiriendo un efecto sinérgico de la sobreexpresión de ciclina D1. Se ha visto que la sobreexpresión de *c-Myc* en ratones transgénicos deficientes en $p14^{ARF}$ acelera la formación de linfomas y los índices de proliferación *ex vivo* de células B malignas son más altos (Rosenwald A et al, 2003).

El LCM en fase leucémica presenta una elevada frecuencia de inactivación de p53 por mutaciones o deleciones del gen *TP53*, más frecuente en la variante blástica que en la clásica (Hernandez L et al, 1996), y/o sobreexpresión de *MDM-2* (Solenthaler M et al, 2002) que puede alterar la función de p53. Estos casos están asociados a mal pronóstico y una supervivencia más corta. Algunas veces estos linfomas presentan alteraciones conjuntas de p53 y $p14^{ARF}$, lo que contribuye a un mayor aumento de las tasas de proliferación (Rosenwald A et al, 2003).

Tabla 4.4.1. Regiones de amplificación y deleción de DNA en el LCM.

	Porcentaje de casos (%)	Genes implicados conocidos
Amplificaciones		
8q22-24	15-40	c-Myc
10p12-13	5-15	BMI-1
Deleciones		
13q14-21	40-60	miR-15, miR-16
17p13	15-55	TP53
11q22-23	20-40	ATM
9p21	15-30	p16, p15, p14
8p21-22	30	receptores Trail
1p21-22	25-30	CDC14A
10p14-15	15	PRKCQ

Todo ello conlleva a la aceptación de que los genes implicados en el desarrollo del ciclo celular y la proliferación de estos linfomas constituyen un integrador cuantitativo de los eventos oncogénicos que predicen la supervivencia de los pacientes con LCM (Rosenwald A et al, 2003).

5.- AGENTES QUIMIOTERÁPICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN

5.1.- Análogos de purinas

Actualmente, los análogos de purinas son el tratamiento más utilizado en la LLC-B, y entre ellos, la **fludarabina** (9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenina), la **cladribina** (2-cloro-2'-deoxyadenosina) y la **pentostatina** (deoxicofomicina) son los más utilizados para el tratamiento de los síndromes linfoproliferativos crónicos. De forma general, los análogos de nucleótidos actúan afectando la integridad estructural del DNA por incorporación a la cadena durante la replicación o la reparación, lo que activa los sensores de daño al DNA, ATM, ATR, DNA-PK y p53, que, a su vez, activan las vías necesarias para que se de una parada de ciclo celular y se activen las vías de reparación. Cuando el daño provocado es irreparable, estos sensores activan vías de señalización que conducen a la apoptosis (Pettitt AR, 2003; Sampath D et al, 2003). En células proliferantes, la fludarabina se incorpora al DNA durante el proceso de replicación e inhibe las enzimas involucradas en la síntesis y replicación del DNA provocando la terminación de la cadena. En células quiescentes, se atribuyen dos efectos de la fludarabina: la inhibición del proceso de reparación del DNA, y la incorporación al RNA provocando una terminación prematura de la transcripción (Damaraju VL et al, 2003; Huang P et al, 2000), el bloqueo de la actividad de la RNA polimerasa II (Huang P and Plunkett W, 1991) y una disminución de los niveles de proteínas antiapoptóticas de vida corta, como Mcl-1 y XIAP, proteínas que se degradan rápidamente por proteasoma (Kitada S et al, 1998), y la inducción de apoptosis.

Los análogos de purinas deben entrar en las células donde serán metabolizados a sus formas activas (F-AraATP y 2-CdATP) que generarán el efecto. La fludarabina se administra en forma de derivado monofosfato (F-araAMP), que será defosforilado (F-araA) por fosfatasas presentes en el plasma. F-araA será transportada al interior de las células mediante transportadores de membrana y, una vez en el interior de la célula, será fosforilada de nuevo por la enzima deoxicitidina quinasa (dCK) hasta su forma activa trifosfato (F-araATP). Puede haber muchos aspectos relacionados con la resistencia a estos fármacos, como alteraciones en los sensores de daño al DNA, alteraciones en las enzimas implicadas en el metabolismo de estos fármacos o defectos en el transporte al interior de las células, como veremos más adelante en otro capítulo.

5.2.- Agentes alquilantes

Fármacos como el **clorambucilo** o la **ciclofosfamida** actúan interaccionando con las bases nitrogenadas de la cadena de DNA provocando una escisión de la doble cadena y la activación de los sensores de daño al DNA que activarán mecanismos de reparación o inducción de apoptosis.

Durante las dos últimas décadas, el tratamiento de elección para muchos tumores fue el clorambucilo, solo o combinado con otros fármacos como adriamicina, vincristina o corticoesteroides. Sin embargo, el desarrollo de los análogos de purinas ha permitido alcanzar mejores grados de respuesta, aunque esto no se traduzca en una mayor supervivencia a largo plazo (Andritsos L and Khoury H, 2002; Johnson AJ et al, 2003; Kitada S et al, 2002).

La ciclofosfamida es un derivado de las mostazas nitrogenadas que es metabolizada a nivel hepático por el citocromo P-450 a la forma 4-hidroxiciclofosfamida, que es hidrolizada espontáneamente al interior de las células generando los compuestos activos, mostaza fosforamida y acroleína, que interfieren con la replicación del DNA y la transcripción del RNA. La combinación de la ciclofosfamida con el análogo de purinas, fludarabina, induce un efecto sinérgico en la LLC-B (Bellosillo B et al, 1999).

5.3.- Inhibidores de la topoisomerasa II

La topoisomerasa II es una enzima esencial para la replicación, transcripción, recombinación y reparación del DNA. Esta enzima se une mediante un enlace covalente al DNA produciendo un corte en las dos cadenas de uno de los dúplex de DNA. La inhibición de esta enzima impide la reparación y religación de la cadena de DNA. El inhibidor de la topoisomerasa II más utilizado en el tratamiento de la LLC-B es la **mitoxantrona**, un fármaco independiente del transporte al interior de la célula (Bailly JD et al, 1997; Bellosillo B et al, 1998) que bloquea a la topoisomerasa II en el momento en que se han generado los cortes impidiendo así la religación del DNA. Se ha descrito que la mitoxantrona es un fármaco genotóxico que induce apoptosis en esas células sensibles a su efecto, mientras que provoca parada de ciclo en fase G₂-M en células resistentes.

La incorporación de mitoxantrona a la combinación de fludarabina y ciclofosfamida en la LLC-B induce un incremento citotóxico significativo en esos casos pretratados anteriormente (Bellosillo B et al, 1999). La combinación de mitoxantrona y mafosfamida en síndromes linfoproliferativos induce un efecto aditivo, probablemente debido a la inducción de daño en el DNA generado por la mafosfamida y la imposibilidad de reparar este daño por la inhibición que ejerce la mitoxantrona sobre la topoisomerasa II.

5.4.- Anticuerpos monoclonales

Durante los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas y más selectivas, entre las que se encuentran el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra

células tumorales. Estos anticuerpos monoclonales pueden ejercer su efecto antitumoral mediante diferentes mecanismos, entre los que están la fijación y activación del sistema del complemento, la inducción de citotoxicidad dependiente de anticuerpo y la activación de vías de transducción de señales que alteren la biología de la célula.

El rituximab es un anticuerpo quimérico de humano y ratón dirigido contra el marcador de membrana CD20. Su eficacia depende de los niveles de expresión de la proteína CD20 en las células tumorales. Las células de LCM y LF (linfoma folicular) expresan altos niveles de CD20, mientras que los niveles de esta proteína en la LLC-B son variables y más bien bajos, lo que supone que la eficacia del rituximab como agente único sea más bien limitada en la LLC-B. Sin embargo, diversos estudios demuestran resultados prometedores en la combinación de rituximab con otros fármacos, en especial la fludarabina (Byrd JC et al, 2003). El efecto apoptótico mediado por el rituximab implica tres mecanismos diferentes: 1) una citotoxicidad dependiente de anticuerpos y mediada por células, 2) citotoxicidad mediada por el complemento y 3) inducción directa de señales antiproliferativas y apoptóticas de la célula tumoral (Bellosillo B et al, 2001; Shan D et al, 1998). El mecanismo de acción *in vivo* aún no se conoce con exactitud. El rituximab provoca una disminución de los niveles de Mcl-1 y XIAP pero este efecto no es suficiente para inducir apoptosis, aunque sí podría estar sensibilizando a las células a ser atacadas por otros agentes antitumorales (Reed JC et al, 2002). Actualmente, su uso se aplica a enfermedades malignas de células B de bajo grado y es especialmente efectivo en el LF.

Otro anticuerpo monoclonal utilizado en la terapia de leucemias y linfomas es el Campath-1, dirigido contra el marcador CD52. Se trata de la forma humanizada de un anticuerpo anti-CD52 de rata. Diversos estudios muestran buenos resultados en el uso de Campath-1H en pacientes pretratados, refractarios a los tratamientos clásicos y como primera línea de tratamiento (Rai K and Hallek M, 2002).

Otra línea de aplicación de estos anticuerpos monoclonales es la ligada a radioisótopos, lo que se conoce con el nombre de radioinmunoterapia (RIT), o como vectores de citotóxicos.

Tabla 5.1. Fármacos utilizados en en tratamiento de la LLC-B y el LCM.

TIPO	FÁRMACOS
Análogos de purinas	Fludrabina, cladribina, pentostatina
Agentes alquilantes	Clorambucilo, ciclofosfamida, melfalan
Inhibidores topoisomerasa II	Mitoxantrona, adriamicina (doxorubicina)
Glucocorticoides	Prednisona
Inhibidores del huso mitótico	Vincristina
Anticuerpos monoclonales	Rituximab, Campath-1H
Terapia antisentido	

Tabla 5.2. Combinaciones de fármacos utilizados en el tratamiento de la LLC-B y el LCM.

COMBINACIÓN	FÁRMACOS
COP	Ciclofosfamida + vincristina + prednisona
CAP	Ciclofosfamida + adriamicina + prednisona
CMP	Ciclofosfamida + melfalan + prednisona
CHOP	Ciclofosfamida + adriamicina + vincristina + prednisona
HyperCVAD	Adriamicina + vincristina + ciclofosfamida + decadron + citarabina + metotrexate
FCM	Fludarabina + ciclofosfamida + mitoxantrona
Fludarabina + Rituximab	
Fludarabina + Campath-1H	

5.5. Inhibidores de la vía de síntesis de ácidos nucleicos

SDX-102 (L-alanosina) es una pequeña molécula que inhibe la síntesis de **AMP**, el precursor para la síntesis de ATP, la principal fuente de energía de una célula, y ácidos nucleicos. Existen dos vías de síntesis de AMP, una vía *de novo* y una vía alternativa. SDX-102 actúa bloqueando la vía de síntesis *de novo* (Batova A et al, 1999; Harasawa H et al, 2002). Está descrito que tumores con deleciones en 9p21 tienen alterada la vía alternativa de síntesis de AMP por la deleción de una de las principales enzimas de la vía, la metiltioadenosina fosforilasa (**MTAP**) (Harasawa H et al, 2002). En estos casos, el bloqueo de la vía *de novo* por la acción de la L-alanosina sobre la enzima adenilsuccinato sintasa, responsable de la conversión de IMP a AMP, podría suponer una terapia selectiva en la que sólo se afectarían las células con deleción de *MTAP*. Sin embargo se ha visto que la L-alanosina también tiene cierto citotóxico sobre células que sí expresan la proteína *MTAP*. Recientemente, se ha descrito una molécula análoga de MTA, la **9-β-D-eritrofuranosiladenina (EFA)**, que aumenta el sustrato de *MTAP* permitiendo rescatar las células que presentan *MTAP* del efecto citotóxico ejercido por la L-alanosina (Batova A et al, 2005).

Distintos estudios han demostrado que la sensibilidad a SDX-102 depende del estado de *MTAP* del tumor (Behrmann I et al, 2003). El fármaco actuaría provocando depleción de los niveles de ATP en la célula e impidiendo la proliferación de ésta por inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, de modo que la célula entraría en un proceso de muerte celular.

5.6.- Problemas de la terapia actual

A pesar de que la tasa de remisiones completas con la quimioterapia ha aumentado con el uso de las terapias combinadas en la LLC-B, los efectos secundarios de los actuales agentes quimioterápicos (especialmente mielosupresión y inmunosupresión) son limitantes. Además, la mayoría de los pacientes presentan recidivas de la enfermedad y acaban generando resistencias.

La mayoría de los agentes usados en quimioterapia no son selectivos para las células tumorales, lo que causa los efectos adversos observados en los pacientes pudiendo llegar a la interrupción del tratamiento. Uno de los principales efectos adversos es la inmunosupresión. Estos pacientes tienen afectada la inmunidad humoral, ya que los linfocitos tumorales son inmunológicamente poco funcionales y deficientes en la producción de anticuerpos. Tanto el clorambucilo como los análogos de las purinas inducen, también, apoptosis en las células T normales de los pacientes, independientemente de su eficacia sobre las células tumorales (Andritsos L and Khoury H, 2002). Los pacientes con síndromes linfoproliferativos crónicos, especialmente los tratados con análogos de purinas, tienen un mayor riesgo a padecer infecciones por defectos en la inmunidad celular. Se ha descrito un amplio espectro de patógenos asociados a la linfopenia y depleción de linfocitos T CD4+ causadas por la terapia con análogos de purinas. Todo ello es importante teniendo en cuenta que una de las principales causas de complicación y muerte de la LLC-B es la aparición de infecciones.

Otro factor limitante en el uso de la quimioterapia es la aparición de resistencias al tratamiento. Los mecanismos de resistencia a la quimioterapia en el LCM y en la LLC-B han sido poco estudiados hasta el momento y debido a ello, no se ha encontrado una terapia eficaz para esta enfermedad. La resistencia de un fármaco se puede dar a diferentes niveles: entrada del fármaco a la célula, metabolismo a su forma activa, cambios en su diana y alteraciones en proteínas que intervienen en el mecanismo de acción del fármaco y la respuesta celular. Una de las principales y más descritas causas de resistencia de las células tumorales a la quimioterapia es la alteración de p53 o otras proteínas de la vía. La resistencia a la quimioterapia es causada, sobretodo, por la inhibición o bloqueo de la apoptosis, ya sea por la aparición de alteraciones genéticas en proteínas implicadas, o bien, por la presencia de señales intra o extracelulares que inducen supervivencia de las células. De este modo, recientemente se ha postulado que alteraciones que afectan a la maquinaria apoptótica de las células del LCM pueden contribuir al desarrollo del tumor (Hofmann WK et al, 2001; Martinez N et al, 2003).

Por lo tanto, es necesario identificar nuevos fármacos y terapias con toxicidad selectiva para las células B malignas y que puedan obviar estos mecanismos de resistencia (Reed JC and Pellecchia M, 2005).

5.7.- Desarrollo de nuevas terapias

En fases de estudio se encuentran nuevos tratamientos basados en el diseño de moléculas dirigidas contra dianas específicas. Algunas estrategias usadas en la búsqueda de nuevos fármacos son la inhibición de la vía PI3K/Akt, la inhibición de la vía PKC, de las fosfodiesterasas, la inhibición de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, la inhibición de FLIP o la síntesis de nuevos retinoides y anticuerpos monoclonales (Johnson AJ et al, 2003; Mavromatis BH and Cheson BD, 2004; Reed JC and Pellecchia M, 2005).

Bcl-2 y Bcl-X_L están sobreexpresadas en un gran número de cánceres humanos, provocando resistencia a la apoptosis. La sobreexpresión de Bcl-2, por ejemplo, está asociada a baja respuesta a la quimioterapia y peor pronóstico en diversos tumores (Reed JC, 1998a). Durante los últimos años se han desarrollado estrategias para diseñar agentes que modulen la expresión y función de las proteínas antiapoptóticas de esta familia, especialmente dirigidos contra Bcl-2, Bcl-X_L y/o Mcl-1. Una de estas estrategias se basa en la administración de oligonucleótidos antisentido (G3139) que actúan disminuyendo los niveles de la proteína Bcl-2 (Gutierrez-Puente Y et al, 2002; Pei XY et al, 2003). También, el conocimiento de las estructuras de Bcl-2 y Bcl-X_L ha permitido identificar un número importante de pequeños péptidos y moléculas orgánicas con capacidad de inhibir la función de estas proteínas. Para el caso del mieloma múltiple se diseñó un inhibidor de Bcl-2, HA14-1, una pequeña molécula de interacción que induce daño mitocondrial, activación de caspasas y apoptosis (Wang JL et al, 2000) y que parece ejercer un efecto sinérgico combinado con bortezomib, un inhibidor de proteasoma (Pei XY et al, 2003).

Más recientemente, se ha descrito la molécula ABT-737 como un inhibidor de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w, más potente que los descritos hasta el momento (Becattini B et al, 2004; Kutzki O et al, 2002; Walensky LD et al, 2004). Este compuesto está basado en la hélice α de proteínas "BH3 only". ABT-737 no inicia el proceso apoptótico por sí solo pero incrementa la señal de muerte celular actuando de forma sinérgica con quimioterapia y/o radioterapia y permitiendo, así, la media de la concentración efectiva (EC₅₀) necesaria del fármaco (Oltersdorf T et al, 2005). Estos nuevos agentes podrían tener un efecto sensibilizador a la quimioterapia y radioterapia en los tumores que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-X_L, así como tener por sí mismos un efecto inductor de apoptosis. Los inhibidores de Bcl-2 pueden ser componentes útiles en muchos regímenes de quimioterapia en linfomas y otros tipos de tumores.

Actualmente, también está en estudio la técnica del RNA de interferencia (RNAi) para bloquear la actividad de determinados genes (Hannon GJ, 2002).

En fases de estudio se encuentran las combinaciones de fármacos como fludarabina con anticuerpos monoclonales como el rituximab (anti-CD20) o alemtuzumab (anti-CD52) en la LLC-B. Las altas tasas de remisiones completas obtenidas hasta el momento en los distintos ensayos clínicos hacen de esta terapia una buena estrategia a seguir (Byrd JC et al, 2004; Robak T, 2005). Otras estrategias para la LLC-B son el

desarrollo de vacunas y la terapia celular. La inyección de vectores para translucir la expresión del gen que codifica para CD154, el ligando de CD40, en células de LLC-B, ha permitido observar que tras la unión de CD40 se produce un aumento de en la expresión del receptor de Fas y de DR5, uno de los receptores de Trail, en estas células haciéndolas más sensibles a señales apoptóticas (Dicker F et al, 2005). El empleo de vacunas también se ha visto para la fusión de células dendríticas presentadoras de antígeno con células tumorales antológicas, técnica terapéutica que está aún en fases iniciales de estudio (Orsini E et al, 2004; Wierda WG et al, 2005).

Pacientes con LLC-B también son infundidos con células T obtenidas por leucaféresis y cultivadas en presencia de IL-2 y anticuerpos contra CD3 y CD28 para activarlas y aumentar su capacidad de responder contra un antígeno. Por otro lado, células T activadas que expresen Fas-L y Trail pueden actuar induciendo la muerte de células de LLC-B (Wierda WG et al, 2005).

En el caso del LCM, actualmente se están analizando terapias dirigidas como la inhibición del proteasoma. Existen dos ensayos clínicos con el inhibidor de proteasoma bortezomib que han demostrado unas tasas de respuesta superiores al 40% y un tiempo de duración de la respuesta relativamente largo. Al mismo tiempo, estudios *in vitro* con bortezomib han demostrado que este fármaco ejerce un buen efecto citotóxico sobre células de LCM mediante la generación de especies reactivas de oxígeno y la inducción de Noxa, la cuál contraresta la acumulación de Mcl-1 inducida por la inhibición de la degradación vía proteasoma (Salaverria I et al, 2006). También debe considerarse la posibilidad de utilizar inhibidores de los componentes implicados en el ciclo celular debido a que, como ya he comentado, las formas agresivas de LCM se correlacionan con la presencia de alteraciones en genes implicados en la proliferación celular (Rosenwald A et al, 2003). En este sentido se han realizado ensayos clínicos con inhibidores de CDK como el flavopiridol o inhibidores de rapamicina. Otro fármaco que parece tener importantes efectos sobre las células de LCM es la talidomida, un agente inmunomodulador del que se está analizando su efecto solo o combinado con rituximab (Salaverria I et al, 2006; Witzig TE, 2005). En casos en que los pacientes son menores de 75 años y candidatos a un posible trasplante de células madre, se aplican terapias de combinación con rituximab y CHOP o rituximab y HyperCVAD anterior al trasplante (Witzig TE, 2005). La inactivación de la vía de síntesis *de novo* de AMP en esos casos con codeleción de p16^{INK4a} y MTAP, también es una estrategia a tener en cuenta.

6.- IMPLICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE NUCLEÓSIDOS EN LA RESISTENCIA A FÁRMACOS

6.1.- Mecanismos de resistencia

El tratamiento con análogos de nucleósidos puede inducir o seleccionar células resistentes a la quimioterapia. Estas resistencias constituyen un desafío al estudio de estos tratamientos. Las resistencias cruzadas entre diferentes clases de agentes antineoplásicos pueden poner en peligro el éxito conseguido por las terapias combinadas, por lo que es importante conocer los mecanismos por los cuales las células se vuelven resistentes a un determinado fármaco para intentar solucionar el problema y mejorar las terapias existentes y diseñar nuevos fármacos más activos (Loffi K et al, 2001).

La resistencia a fármacos requiere un proceso de selección celular, con poblaciones de células resistentes que sobreviven y se expanden durante repetidos ciclos. Las células pueden ser resistentes inicialmente o pueden adquirir la resistencia a medida que avanzan los ciclos de tratamiento. A nivel molecular pueden haber diferentes mecanismos a través de los cuales se pueden adquirir estas resistencias: 1) una concentración de fármaco activo insuficiente por un transporte deficiente, 2) deficiencias en la metabolización del fármaco por alteraciones en las nucleósido quininas responsables de la fosforilación de los nucleósidos a nucleótidos activos, 3) incapacidad de alterar de forma eficiente las cadenas de DNA debido a una afinidad alterada por las dianas de los metabolitos activos o 4) defectos en la inducción de la maquinaria apoptótica (Mansson E et al, 2001).

6.2.- Transportadores de nucleósidos

Los nucleósidos y análogos de nucleósidos son moléculas hidrófilas, por lo que su internalización en la célula para ejercer su efecto, depende de transportadores específicos de membrana. Los transportadores de nucleósidos son determinantes en la regulación de muchos procesos fisiológicos, modulan los niveles extracelulares de los sustratos que internalizan, fundamentalmente la adenosina, y representan el canal de entrada de muchos análogos de nucleósidos utilizados en la terapia del cáncer (Pastor-Anglada M et al, 1998), así, la eficacia clínica de muchos análogos de nucleósidos depende del transporte al interior de la célula y del eflujo de estos fármacos.

Históricamente, los transportadores de nucleósidos han sido definidos en base a sus características cinéticas, lo que ha llevado a la identificación de, como mínimo, siete actividades distintas responsables de la captación de sustratos. Estas actividades se han clasificado como un transporte equilibrativo (**ENT**, *Equilibrative Nucleoside Transporters*), independiente de sodio y que permite una difusión facilitada por un gradiente transmembrana de concentración, y transporte concentrativo dependiente de sodio (**CNT**, *Concentrative Nucleoside Transporter*), que contribuye a la acumulación de nucleósidos en el interior de la célula con un consiguiente gasto energético (Baldwin SA et al, 1999; Griffith

DA and Jarvis SM, 1996; Pastor-Anglada M et al, 1998). La mayoría de las células animales combinan diversos sistemas de transporte de nucleósidos. Aunque inicialmente las entidades equilibrativas se creyeron mayoritarias, de forma que el transporte concentrativo quedaría relegado a los epitelios especializados, actualmente se sabe que ambos tipos de sistemas presentan una amplia distribución tisular, coexistiendo en un gran número de tipos celulares. Incluso parece existir un cambio en la dotación de estos sistemas de transporte a medida que la célula progresa hacia estadios malignos. Un gran número de células neoplásicas humanas expresan fundamentalmente actividades equilibrativas en oposición al transporte concentrativo mayoritario en células no transformadas. Este hecho adquiere importancia a nivel del estudio de nuevos agentes quimioterápicos (Baldwin SA et al, 1999; Pastor-Anglada M et al, 1998).

6.2.1.- Transportadores Equilibrativos (ENT)

6.2.1.1.- Propiedades cinéticas

Los transportadores equilibrativos (**ENT**), clasificados como la familia de transportadores SLC29, son proteínas que facilitan la difusión de nucleósidos a través de la membrana plasmática a favor de un gradiente de concentración, independiente de sodio. Son transportadores bidireccionales que permiten tanto el influjo como el eflujo de solutos y presentan una amplia especificidad de sustrato, pudiendo transportar tanto sustratos purínicos como pirimidínicos. Han sido descritos en un amplio espectro de tejidos, normales y tumorales (Belt JA et al, 1993).

Dentro de los ENT's existen dos tipos de transportadores en función de su sensibilidad a un análogo estructural de la adenosina, el NBTI (*nitrobenziltioinosina*). Así, se habla de transportadores equilibrativos sensibles (**es**), inhibibles por NBTI a concentraciones de nM hasta 1 μ M, y transportadores equilibrativos insensibles (**ei**), que no se inhiben ni con concentraciones superiores a 1 μ M de NBTI (Damaraju VL et al, 2003).

Se han descrito otros agentes inhibidores como el dilazep, la draflazina, el dipiridamol o el NBMPR (*nitrobenzilmercaptapurina ribonucleósido*). Los tres primeros inhibidores, sin embargo, a pesar de que siguen presentando mayor sensibilidad para el sistema **es** (rango nM), también son capaces de inhibir el sistema **ei**.

Recientemente, se han identificado dos nuevas formas dentro de esta familia de proteínas, los transportadores ENT3 (Baldwin SA et al, 2004; Hyde RJ et al, 2001) y ENT4 (Baldwin SA et al, 2004), pero su papel en el transporte de nucleósidos no ha sido aún establecido. hENT3 es un transportador no inhibible por los inhibidores clásicos, ya que se requieren concentraciones 10 veces superiores a las necesarias para bloquear la actividad de hENT1. Presenta alta afinidad para transportar tanto nucleósidos purínicos como pirimidínicos y transporta de forma eficiente tanto adenina como uridina (Griffiths M et al, 1997; Ward JL et al, 2000) y los análogos cladribina, cordicepina y turbecidina, sin embargo

no es tan eficaz para el transporte de hipoxantina, fludarabina y gemcitabina (Baldwin SA et al, 2005).

6.2.1.2.- Características moleculares y estructurales

El gen *ENT1* se localiza en el cromosoma 6p21.1-p21.2 (Coe IR et al, 1997), y codifica para la proteína glicosilada **hENT1** (*human Equilibrative Nucleoside Transporter-1*) de 456 residuos (50kDa). Esta molécula, que presenta todas las características funcionales de los transportadores de tipo **es**, consta de 11 dominios transmembrana conectados por regiones hidrofílicas cortas, a excepción de dos *loops*, comprendidos entre los dominios 1-2 y 6-7, que contendrían tres posibles lugares de N-glicosilación.

Posteriormente, se clonó la isoforma **hENT2**. El gen de *ENT2* se localiza en el locus 11q13 y codifica para una proteína de 465 aminoácidos con un 69% de identidad con hENT1. Su estructura es similar a la de hENT1 y contiene dos lugares de N-glicosilación en el primer *loop* (figura 6.2.1) (Crawford CR et al, 1998).

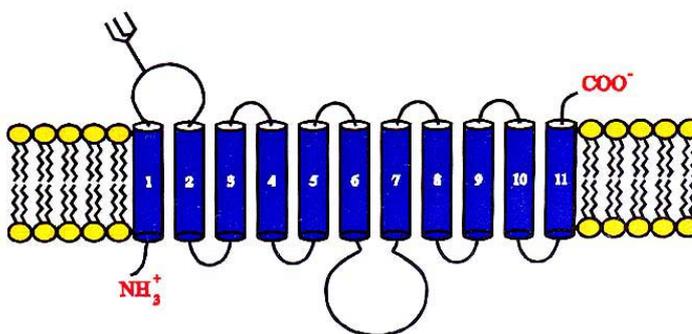


Figura 6.2.1. Estructura molecular para la familia génica de transportadores equilibrativos de nucleósidos (ENT's).

Tanto hENT1 como hENT2 se han detectado distribuidos por una amplia variedad de tejidos, atribuyéndoles importancia en el flujo de nucleótidos tanto fisiológicos como quimioterapéuticos (Damaraju VL et al, 2003; Pennycooke M et al, 2001).

Recientemente, se ha clonado el gen *ENT3* que da lugar a una proteína de 457 residuos (60kDa) con un 73% de aminoácidos y entre un 22 y un 33% de identidad con las otras isoformas de esta familia. Presenta la misma topología de 11 dominios

transmembrana con un dominio N-terminal citoplasmático y uno C-terminal extracelular (Hyde RJ et al, 2001), pero se diferencia en que hENT3 presenta un motivo de anclaje lisosomal (Bonifacino JS and Traub LM, 2003), [DE]XXXL[LI] con dos residuos de leucina, en la región hidrofílica que precede la primera región transmembrana. La presencia de este motivo hace que esta proteína no se encuentre localizada en la membrana de las células sino que ocupa una posición intracelular asociada a lisosomas. Esta localización intracelular contribuye, probablemente, al hecho de que haya muy poco transporte asociado a esta proteína en humanos, y que se relacione con un transporte de exportación de nucleósidos desde el interior lisosomal (Baldwin SA et al, 2005).

6.2.2.- Transportadores Concentrativos (CNT)

6.2.2.1.- Propiedades cinéticas

Los transportadores concentrativos (CNT) pertenecen a la familia SLC28 y se clasifican en función a su especificidad por el sustrato, conociéndose hasta 5 subtipos diferentes. Son transportadores dependientes de un gradiente de sodio e insensibles a NBTI. Los dos sistemas mayoritarios, **CNT1** y **CNT2** (actividades N2 y N1, respectivamente), tienen una especificidad restringida a nucleósidos pirimidínicos y purínicos, respectivamente. El tercer sistema que se describió, **CNT3** (actividad N3), transporta tanto nucleósidos purínicos como pirimidínicos (Damaraju VL et al, 2003; Larrayoz IM et al, 2004).

6.2.2.2.- Características moleculares y estructurales

El aislamiento de un cDNA de 2.4kb, correspondiente a la actividad de transporte N2 (Huang QQ et al, 1994), dio lugar a la identificación de una proteína transportadora de nucleósidos de 648 aminoácidos (71kDa), **CNT1** (*Concentrative Nucleoside Transporter-1*). Este sistema transportaba timidina de forma saturable e inhibible por uridina y histidina pero no por guanosina.

CNT1 está involucrada en la absorción intestinal y renal de nucleósidos y análogos de nucleósidos pirimidínicos empleados en tratamientos antivirales y antitumorales como la zidovudina (AZT) y la didesoxicitidina (ddC) (Fang X et al, 1996). Se han aislado una serie de cDNA's que codifican para las isoformas humanas **hCNT1a** y **hCNT1b** (Ritzel MW et al, 1997). hCNT1a está formada por 650 aminoácidos. Se cree que las pequeñas diferencias observadas entre estas dos proteínas son debidas a un polimorfismo génico que no afectaría a la actividad de transporte. El gen de hCNT1 se mapó en el cromosoma 15q25-26 (Ritzel MW et al, 1997).

Posteriormente, se aisló el cDNA correspondiente a la actividad concentrativa purino-preferente N1 en humano. Inicialmente se aisló una proteína, **hSPNT1**, de 658 residuos aminoacídicos que difería en la estructura primaria del extremo N-terminal y presentaba un elemento repetitivo Alu en la región 3'-no traducida del cDNA. El gen de esta

proteína se localizó en el cromosoma 15q15 (Ritzel MW et al, 1998; Wang J et al, 1997). Cuando se clonó la proteína **hCNT2** (Ritzel MW et al, 1998) se observó que presentaba las mismas características que hSPNT1, pero contenía un cambio de Arg por Ser en el residuo 75.

Estudios desarrollados en base a la reciente generación de anticuerpos apuntan hacia una estructura de estos transportadores de 13 dominios transmembrana (Dufrot S et al, 2002; Hamilton SR et al, 2001) con un dominio N-terminal citoplasmático. Ambas o una de las asparginas, Asn^{605/648}, situadas en el extremo C-terminal estarían glicosiladas lo que confiere su ubicación en el espacio extracelular. Los potenciales lugares de N-glicosilación en el dominio N-terminal o entre los dominios transmembrana 4 y 5, se mantendrían sin cadenas oligosacáridas (figura 6.2.2).

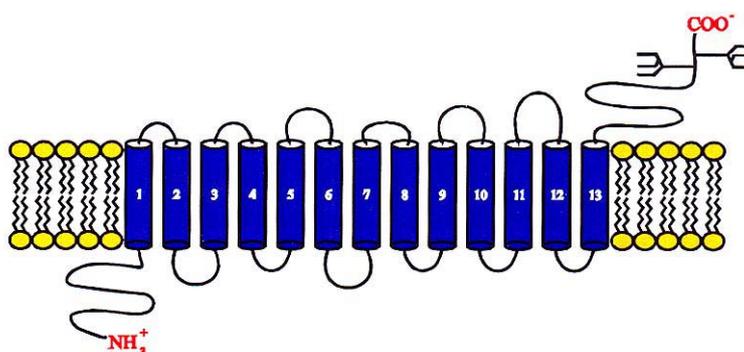


Figura 6.2.2. Estructura secundaria predicha para la familia génica de transportadores concentrativos de nucleósidos (CNT's).

6.2.2.3.- CNT3

Recientemente, se ha clonado el cDNA humano de la actividad funcional CNT3. Se han buscado entidades del tipo CNT como potenciales representantes del transporte N3, lo que ha llevado a la identificación de secuencias **EST** (*Expressed Sequences Tags*) que codifican para regiones parcialmente solapadas correspondientes al extremo C-terminal de un nuevo CNT humano, diferente a hCNT1/2 y no identificado previamente. Este cDNA codifica para una proteína de 691 aminoácidos (77kDa) que se ha atribuido a **hCNT3** (Ritzel MW et al, 2001). En concordancia con el resto de CNT's, este transportador se caracteriza por 13 hélices transmembrana y numerosos lugares potenciales de N-glicosilación en el

extremo C-terminal. hCNT3 presenta poca identidad con hCNT1 y hCNT2 (48 y 47%, respectivamente) con diferencias marcadas en los extremos N- y C-terminales. Todo ello, ha llevado a su clasificación dentro de una subfamilia génica de los CNT's, diferente a la que pertenecen hCNT1 y 2. hCNT3, como ya se había descrito cinéticamente, transporta una amplia variedad de nucleósidos. El gen de este transportador se localiza en el cromosoma 9q22.2 (Ritzel MW et al, 2001).

Finalmente, también se han definido las actividades N4 y N5, pero aún no han sido clonadas.

Una característica común en los diferentes transportadores concentrativos es que se han visto distribuidos y expresados, principal y mayoritariamente, en tejidos altamente diferenciados (Cass CE et al, 1999; Damaraju VL et al, 2003; Pennycooke M et al, 2001), en contraposición con los transportadores equilibrativos que, como ya he comentado, se expresan más en tejidos neoplásicos.

6.3.- Implicación del transporte en la resistencia

Los análogos de nucleósidos actúan sobre las células mediante un proceso que comprende tres etapas: la captación, la metabolización, y la activación y acción del fármaco. Las bases moleculares de estas tres etapas presentan aún bastantes interrogantes. El transporte de los fármacos al interior de las células a través de la membrana plasmática es uno de los factores limitantes de su bioasequibilidad y subsiguiente acción, lo que apoya la idea de que la sensibilidad o resistencia al fármaco pueda ser debida, en parte, a una asequebilidad deficiente (Pastor-Anglada M et al, 1998). Sin embargo, los estudios de asequebilidad de fármacos no se han podido llevar a cabo hasta hace poco debido a que la mayoría de transportadores involucrados en la captación de los análogos de nucleósidos no han sido clonados antes.

En células aisladas de leucemias, la sensibilidad a fludarabina, ara-C y 2-CdA se correlaciona con la abundancia celular de hENT1, medida a través de la unión de NBTI (Gati WP et al, 1998; Gati WP et al, 1997). Debido a que las tasas iniciales de captación de fármacos son, en general, proporcionales a la abundancia de hENT1, se sugiere que la deficiencia del transporte es la que induce el fenotipo resistente en estas células. Dentro de la misma línea, ya se habían observado anteriormente, tasas bajas de transporte ligadas a bajas respuestas clínicas a la ara-C en células de leucemia aguda mieloide (Wiley JS et al, 1982). Por otro lado, se describió que la fludarabina y la 2-CdA poseían un mecanismo alternativo para potenciar su toxicidad, regulando positivamente la expresión del transportador equilibrativo ENT1 (Gandhi V et al, 1989; Petersen AJ et al, 1996).

En 1997, tras la clonación de la isoforma humana hENT1, se demostró que la actividad de transporte de uridina era inhibida por cladribina, citarabina, fludarabina y gemcitabina (Griffiths M et al, 1997).

Estudios llevados a cabo en doce líneas celulares humanas con actividades de transporte de nucleósidos bien definidas han permitido demostrar que las células deficientes en estos transportadores son altamente resistentes a la gemcitabina (Mackey JR et al, 1998). Una observación derivada es que el tratamiento con NBTI o dipiridamol de aquellas células que sólo presentaban actividades equilibrativas incrementa la resistencia al fármaco. En células transfectadas con cDNA para hENT1 o hENT2, la gemcitabina también se incorpora a través de los sistemas dependientes de Na^+ , siendo la eficiencia de captación definida en células con un único sistema de transporte. La microinyección individual de los mRNA's correspondientes a los sistemas en oocitos de *Xenopus laevis* ha permitido corroborar que la gemcitabina es internalizada a través de la mayoría de ellos, con la excepción de CNT2 (Lostao MP et al, 2000; Mackey JR et al, 1999).

Como ya he mencionado, existen muchos fármacos que son transportados al interior de la célula a través de los sistemas de transporte de nucleósidos concentrativos (CNT's), con constantes cinéticas de afinidad inferiores a las de los sistemas equilibrativos (ENT's). Si el tumor presenta CNT's, inhibidores de los sistemas equilibrativos como el NBTI o el dipiridamol podrían bloquear el eflujo, disminuyendo la IC_{50} de los fármacos y aumentando el potencial antitumoral. En cambio, si el tumor no tiene CNT's, los análogos de nucleósidos deben acceder a las células vía ENT's que, una vez bloqueados, imposibilitarían el influjo, aumentando la IC_{50} y haciendo el tumor resistente. La bioasequibilidad del fármaco tiene que comprender una compleja regulación entre la entrada y la salida del fármaco (Baldwin SA et al, 1999; Lostao MP et al, 2000).

A pesar de todas estas observaciones, la relevancia farmacológica de la falta o deficiencia de determinados tipos de transportadores de nucleósidos como causa directa de ciertos tipos de resistencias, *in vivo*, no está del todo bien establecida. Esto es debido, en parte, a la dificultad intrínseca que supone hacer estudios de transporte en muestras clínicas, a la posible y previsible contribución e interrelación entre las diferentes isoformas de transportadores y a las dificultades técnicas asociadas a la cuantificación de éstas por contaminación de los clones neoplásicos con tejido normal (Baldwin SA et al, 1999; Galmarini CM et al, 2001). En este aspecto, se han realizado estudios de correlación del transporte de nucleósidos con la toxicidad *ex vivo* de la fludarabina en células de pacientes con leucemia linfática crónica de tipo B (LLC-B), resultando en una acumulación del fármaco debida, casi exclusivamente, a una actividad equilibrativa de transporte, lo que ha revelado un papel importante y clave del transporte tipo ENT en la respuesta al tratamiento de la LLC-B *in vivo* (Molina-Arcas M et al, 2003).

En otros estudios, se buscaron correlaciones entre los niveles de mRNA de las diferentes isoformas de transportadores de nucleósidos en un banco de 50 líneas celulares y no se encontró correlación entre la sensibilidad a análogos y otros fármacos y los niveles de expresión. La máxima correlación, sin embargo, se encontró entre la expresión de CNT1 y la toxicidad a 2-metilguanina y entre ENT2 y la toxicidad a hidroxurea. Se observó,

también, que el estado de p53 afectaba a la correlación entre ENT1 y la toxicidad del fármaco (Lu X et al, 2002). Así pues, la expresión de los transportadores de nucleósidos puede estar influida de forma tejido-específica por la expresión y actividad de otros genes. En relación a ello, se describió que la expresión de CNT y ENT en los diferentes tejidos podía estar modulada por p53 (Acimovic Y and Coe IR, 2002).

Tampoco se observaron correlaciones con la expresión de transportadores **es** en el linfoma de Hodgkin, aunque un 60% de los tumores tenían una baja expresión de hENT1 (Reiman T et al, 2002). Sin embargo, en células de leucemia aguda mieloblástica (LAM), se observó que la disminución de la expresión de hENT1 se correlacionaba con un tiempo de supervivencia libre de enfermedad (DFS) más corto en estos pacientes (Galmarini CM et al, 2002c). De la misma forma, se observó una correlación de la expresión de **es** con la toxicidad a ara-C en la leucemia aguda linfoblástica (LAL) (Wright AM et al, 2002). Resulta difícil, también, determinar las correlaciones existentes entre la expresión de los transportadores y la citotoxicidad de los fármacos debido a que muchos análogos de nucleósidos pueden ser transportados por más de un transportador, como la gemcitabina, por ejemplo, que es transportada mayoritariamente por hENT1 pero también por hENT2, hCNT1 y/o hCNT3. Al mismo tiempo, por modificaciones postranscripcionales, puede no existir una correlación directa entre la expresión del mRNA y la expresión de la proteína transportadora (Damaraju VL et al, 2003; Lu X et al, 2002).

La utilización de anticuerpos monoclonales para determinar inmunohistoquímicamente la expresión de hENT1 en líneas celulares de tumores de mama demostró una resistencia aumentada a 5-dFUr asociada a una baja expresión de hENT1 (Mackey JR et al, 2002).

En relación al papel de los transportadores concentrativos, se introdujeron hCNT2 a células de leucemia deficientes en el transporte de nucleósidos y se observó que esta reintroducción causaba un aumento en la sensibilidad a cladribina, 5'-dFUr y 5'-Fud, pero no a fludarabina (Lang TT et al, 2001).

En resumen, se ha encontrado correlación entre la actividad de transporte de nucleósidos equilibrativos sensible a NBTI (**es**) y la sensibilidad a análogos de nucleósidos, aunque aún no está claro el papel que puede tener esta actividad en tipos celulares que coexpresen actividades concentrativas de alta afinidad.

Por otro lado y recientemente, se han detectado la presencia de variaciones genéticas en regiones reguladoras y codificantes de los genes de estos transportadores que conllevan a fenotipos resistentes y variaciones en la respuesta al tratamiento en las poblaciones de pacientes. Dentro de estas variantes se han detectado un 90% de **SNP** (*single nucleotide polymorphisms*) (Damaraju VL et al, 2003). Estos polimorfismos podrían explicar muchos de los casos de resistencias, por lo que son necesarios estudios más detallados.

Como ya hemos comentado en algunos capítulos anteriores, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento más elegido para un gran número de neoplasias. Por ello, es necesario conocer mejor los mecanismos de resistencia para poder diseñar mejores y nuevas terapias. Adicionalmente, el estudio de la expresión diferencial e individual de los transportadores de nucleósidos en los diferentes tipos de tumores, y en especial en la LLC-B y el LCM, en lo que se basa esta tesis, resulta imprescindible para la elección de una u otra terapia.