

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE BIOLOGÍA CEL·LULAR, FISIOLÓGIA I
D'IMMUNOLOGÍA

Tesis doctoral con el título:

STAT1 EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR
FLUDARABINA E INHIBIDORES DE JAK KINASAS
EN LAS CELULAS DE LLC-B.
PAPEL DE LAS CELULAS ADHERENTES EN LA
APOPTOSIS INDUCIDA POR FLUDARABINA

Presentada para la obtención del título de Doctor en Inmunología por la
Universitat Autònoma de Barcelona

Luis Martinez Lostao
Barcelona, Diciembre del 2004

El Dr. Cándido Juárez Rubio, Jefe de Sección del Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y el Dr. José Luis Rodríguez Sánchez, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Profesor Titular del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, en calidad de codirectores de esta Tesis,

HACEN CONSTAR,

Que el trabajo titulado: **“STAT1 en la apoptosis inducida por fludarabina e inhibidores de JAK kinasas en las células de LLC-B. Papel de las células adherentes en la apoptosis inducida por fludarabina”** presentado como tesis doctoral por Luis Martinez Lostao para optar al grado de Doctor en Inmunología, reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa en su día ante el tribunal correspondiente.

Barcelona, Diciembre del 2.004

Dr. Cándido Juárez Rubio

Dr. José Luis Rodríguez Sánchez

Sin lugar a duda, estas son las líneas más difíciles de escribir. Son muchos los que, de un modo u otro, me han ayudado a que esta tesis haya podido ser escrita y posiblemente algún nombre se me quedará en el tintero, así que antes de nada, pido disculpas por ello.

En primer lugar, darles las gracias al Dr. Cándido Juárez y al Dr. José Luis Rodríguez Sánchez, mis directores de tesis, por su ayuda durante todo el desarrollo de este trabajo pero sobre todo por haber confiado en mí.

Al Dr. Oscar de la Calle y a la Dra. Carmen Gelpí que, junto con los anteriores, me han enseñado Inmunología y mucho más.

A toda la gente de Inmuno de Sant Pau. A Mónica por ser mi compañera pero sobre todo mi amiga. Ya sabes, que le ... A Nenuca por gritarme cuando debía y por mimarme, a Manuela por tropezar constantemente con mi silla, a Beth por saber escucharme, a Marivi, a Elena, a Conchita, a Herminia, a Carmen la "súper", a Gemma, a Antonia, a Tere y a todas las demás "chicas" de Sant Pau. Puede que mi residencia sin vosotras hubiera sido más tranquila pero mucho menos divertida y sobre todo, no hubiera sido posible. A la gente de "cordón", a Silvia, a Mari Paz y a Ana. El "chiringuito" siempre ha sido un lugar donde descansar y ser escuchado.

A la gente de Can Ruti, al Dr. Ricardo Pujol, a Maria José y a las "niñas". A la gente de Recerca. Gracias por unos momentos tan entrañables. A Manel por ser mi amigo.

A mis padres porque por ellos estoy donde estoy. A Carmen y Ana porque siempre han creído en mí, a Raquel y a Jorge, a Agustín y a Paxti por escucharme, aguantarme y apoyarme.

A mis amigos porque después de tantos años, siguen estando a mi lado.

A Pili, mi esposa, mi amiga, mi consuelo, mi descanso y mi alegría.

A todos, ya sé que no es daros mucho pero..., GRACIAS.

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>1. INTRODUCCIÓN A LA VIA DE SEÑALIZACION JAK/STAT</u>	2
<u>2. LA FAMILIA DE LAS JAK KINASAS</u>	2
<u>2.1. Generalidades y estructura</u>	2
<u>2.1.1. Dominio JH1</u>	3
<u>2.1.2. Dominio JH2</u>	4
<u>2.1.3. Dominios del extremo amino terminal (JH3-JH7)</u>	4
<u>2.2. JAK1 kinasa</u>	5
<u>2.3. JAK2 kinasa</u>	5
<u>2.4. JAK3 kinasa</u>	5
<u>2.5. Tyk2 kinasa</u>	6
<u>3. LA FAMILIA DE LOS STAT</u>	7
<u>3.1. Generalidades y estructura</u>	7
<u>3.1.1. Dominio de interacción dímero-dímero</u>	8
<u>3.1.2. Dominio <i>coiled-coil</i></u>	9
<u>3.1.3. Dominio de unión a ADN</u>	9
<u>3.1.4. Dominio SH2</u>	10
<u>3.1.5. Dominio de transactivación</u>	11
<u>3.2. STAT1</u>	11
<u>3.3. STAT2</u>	13
<u>3.4. STAT3</u>	13
<u>3.5. STAT4</u>	15
<u>3.6. STAT5</u>	15
<u>3.7. STAT6</u>	16
<u>4. VIA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT</u>	17
<u>4.1. Vía de señalización de IFN-g</u>	18
<u>4.2. Unión de los STAT al receptor de citocinas</u>	20
<u>4.3. Fosforilación y dimerización de los STAT</u>	21
<u>4.4. Translocación al núcleo y actividad transcripcional de los STAT</u>	22
<u>4.5. Regulación de la vía JAK/STAT</u>	23
<u>4.5.1. La familia SOCS</u>	23
<u>4.5.2. La familia PIAS</u>	25
<u>4.5.3. Tirosina fosfatasas</u>	26
<u>4.5.4. Modificaciones proteicas</u>	27

INDICE

<u>4.6. Relación de la vía JAK/STAT con otras vías</u>	29
5. <u>STAT EN CANCER Y LEUCEMIA</u>	30
<u>5.1. STAT y cáncer</u>	30
<u>5.2. STAT y leucemia</u>	31
<u>5.3. Activación constitutiva de los STAT</u>	32
<u>5.3.1. Activación constitutiva por tirosina kinasas oncogénicas</u>	34
<u>5.3.2. Otros mecanismos de activación constitutiva</u>	38
<u>5.4. Genes regulados por los STAT implicados en la oncogénesis</u>	40
<u>5.4.1. Oncogenes implicados en la progresión del ciclo celular</u>	41
<u>5.4.2. Oncogenes implicados en la apoptosis</u>	43
<u>5.4.3. Otros genes implicados en la oncogénesis</u>	44
<u>5.4.4. STAT1 como supresor tumoral</u>	45
<u>5.5. STAT como diana terapéutica en cáncer</u>	47
6. <u>LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA DE CELULAS B</u>	52
<u>6.1. Generalidades</u>	52
<u>6.2. LLC-B y apoptosis</u>	61
<u>6.3. LLC-B y Nurse Like Cells (NLC)</u>	65
<u>6.4. LLC-B y STAT</u>	67
7. <u>FLUDARABINA</u>	69
<u>7.1. Generalidades</u>	69
<u>7.2. Mecanismos de acción</u>	71
8. <u>TIRFOSTINAS. INHIBIDORES DE TIROSINA KINASAS</u>	76
<u>8.1. Generalidades</u>	76
<u>8.2. Mecanismos de acción</u>	77
<u>8.3. AG490</u>	78
<u>8.4. WHI-P131</u>	79
<u>OBJETIVOS</u>	82
1. <u>HIPOTESIS</u>	83
2. <u>OBJETIVOS CONCRETOS</u>	83
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	84
1. <u>PACIENTES Y CONTROLES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO</u>	85
2. <u>OBTENCIÓN, PURIFICACIÓN Y CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA HUMANA</u>	86

INDICE

<u>3. DROGAS Y REACTIVOS</u>	87
<u>4. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS CELULARES</u>	87
<u>5. CITOMETRIA DE FLUJO</u>	88
<u>6. EMSA (ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY)</u>	89
<u>6.1. Marcaje radioactivo del oligonucleótido de doble hebra de ADN</u>	89
<u>6.2. Preparación del gel para la carrera electrofóretica</u>	90
<u>6.3. Preparación de las muestras. Incubación con la sonda marcada</u>	91
<u>6.4. Electroforesis, secado del gel y autorradiografía</u>	92
<u>6.5. Análisis de los resultados</u>	92
<u>7. WESTERN BLOT</u>	93
<u>7.1. Separación de las proteínas presentes en la muestra en función de su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de Sodium Dodecyl-Sulfate (SDS)</u>	93
<u>7.2. Transferencia de las proteínas separadas a una membrana sintética</u>	94
<u>7.3. Detección del antígeno de interés mediante un anticuerpo específico</u>	94
<u>7.4. Análisis de los resultados</u>	95
<u>8. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL</u>	96
<u>8.1. Preparación de la muestra</u>	96
<u>8.2. Isoelectroenfoque</u>	97
<u>8.3. Segunda dimensión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS</u>	98
<u>8.4. Detección de las proteínas. Tinción de plata</u>	99
<u>8.5. Análisis de los resultados</u>	99
<u>9. ANÁLISIS IN VITRO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B Y LAS CELULAS ADHERENTES A LA PLACA TRAS CULTIVOS PROLONGADOS</u>	99
<u>9.1. Estudio fenotípico de las NLC mediante inmunohistoquímica</u>	100
<u>9.2. Estudio del efecto protector de las NLC en la apoptosis espontánea in vitro de las células LLC-B CD19+/CD5+</u>	102
<u>9.3. Estudio del efecto de fludarabina sobre las NLC</u>	103
<u>9.4. Estudio del efecto protector de las NLC en la apoptosis inducida por fludarabina de las células LLC-B CD19+/CD5+</u>	103
<u>10. ANALISIS ESTADISTICO</u>	105

<u>RESULTADOS</u>	107
1. <u>EL EFECTO IN VITRO DE LA FLUDARABINA Y LOS INHIBIDORES DE JAK KINASAS ES DOSIS DEPENDIENTE</u>	108
2. <u>EL EFECTO IN VITRO DE LA FLUDARABINA Y LOS INHIBIDORES DE JAK KINASAS ES TIEMPO DEPENDIENTE</u>	112
3. <u>CORRELACION ENTRE EL MARCAJE CON ANEXINA V Y LOS CAMBIOS MORFOLOGICOS DE LAS CELULAS TUMORALES DE LLC-B EN LA CITOMETRIA DE FLUJO</u>	114
4. <u>TRATAMIENTOS IN VITRO DE 45 MINUTOS CON FLUDARABINA E INHIBIDORES DE JAK KINASAS DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B. VALORACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVACION DE STAT1 Y DE LA APOPTOSIS CELULAR</u>	117
4.1. <u>Tratamiento in vitro de 45 minutos con fludarabina</u>	117
4.2. <u>Tratamiento in vitro de 45 minutos con AG490</u>	119
4.3. <u>Tratamiento in vitro de 45 minutos con WHI-P131</u>	121
4.4. <u>Tratamiento in vitro de 45 minutos con AG555 y AG494</u>	123
5. <u>TRATAMIENTOS IN VITRO DE 24 HORAS CON FLUDARABINA E INHIBIDORES DE JAK KINASAS DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B. VALORACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVACION DE STAT1 Y DE LA APOPTOSIS CELULAR</u>	125
5.1. <u>Tratamiento in vitro de 24 horas con fludarabina</u>	125
5.2. <u>Tratamiento in vitro de 24 horas con AG490</u>	127
5.3. <u>Tratamiento in vitro de 24 horas con WHI-P131</u>	130
5.4. <u>Tratamiento in vitro de 24 horas con AG555 y AG494</u>	132
6. <u>AFECTACIÓN DE DIVERSAS PROTEINAS DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B TRAS 24 HORAS DE TRATAMIENTO IN VITRO CON FLUDARABINA</u>	133
7. <u>ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CELULAS ADHERENTES EN LA MUERTE CELULAR IN VITRO DE LAS CELULAS MONONUCLEARES DE LLC-B</u>	139
7.1. <u>Las NLC se detectan en cultivos de células mononucleares de pacientes con LLC y expresan marcadores de estirpe monocítica</u>	139

INDICE

<u>7.2. Las NLC protegen a las células LLC-B CD19+/CD5+ de la apoptosis espontánea in vitro</u>	140
<u>7.3. Fludarabina elimina los precursores de las NLC en cultivos de células mononucleares de pacientes con LLC-B e induce la apoptosis de las NLC</u> .	141
<u>7.4. Las NLC no protegen a las células LLC-B CD19+/CD5+ de la apoptosis inducida por fludarabina</u>	143
<u>DISCUSION</u>	145
<u>DISCUSION</u>	146
<u>CONCLUSIONES</u>	154
<u>CONCLUSIONES</u>	155
<u>REFERENCIAS</u>	157
<u>REFERENCIAS</u>	158

INDICE

INDICE DE FIGURAS.

Figura I. 1 Estructura de las JAK kinasas	3
Figura I. 2 Estructura de los STAT.....	8
Figura I. 3 Estructura del complejo STAT1-ADN.....	10
Figura I. 4 Vía de señalización de IFN-g.....	19
Figura I. 5 Estructura de las proteínas de la familia SOCS.....	24
Figura I. 6 Regulación negativa de la vía JAK/STAT.....	28
Figura I. 7 Rutas de activación constitutiva de los STAT en cáncer.....	39
Figura I. 8 Control del crecimiento celular y la apoptosis por los STAT.....	45
Figura I. 9 Frotis de sangre periférica de un LLC-B	53
Figura I. 10 Estructura química de 9- <i>b</i> -D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina (fludarabina, F-ara-A)	70
Figura I. 11 Principales mecanismos de acción de fludarabina	73
Figura I. 12 Estructura química de AG490.....	78
Figura I. 13 Estructura química de WHI-P131.....	79
Figura M. 1 Cálculo del rango de pH de la tira 3-10 NL IPGStrip de 7 cm de longitud.....	98
Figura M. 2 Representación esquemática del experimento TRATAMIENTO CRUZADO 1....	102
Figura M. 3 Representación esquemática del experimento TRATAMIENTO CRUZADO 2....	104
Figura R. 1 Efecto dosis dependiente de la apoptosis inducida por fludarabina en una leucemia representativa	108
Figura R. 2 Efecto dosis dependiente de la apoptosis inducida por AG490 en una leucemia representativa	109
Figura R. 3 Efecto dosis dependiente de la apoptosis inducida por WHI-P131 en una leucemia representativa	110
Figura R. 4 Efecto dosis dependiente de la inhibición de la activación de STAT1 inducida por las drogas en una leucemia representativa.....	111
Figura R. 5 Efecto tiempo dependiente de la apoptosis inducida por las drogas en tres leucemias representativas.....	112

INDICE

<u>Figura R. 6</u> <i>Efecto tiempo dependiente en la inhibición de la activación de STAT1 inducida por las drogas en tres leucemias representativas</i>	113
<u>Figura R. 7</u> <i>Las células CD19+/CD5+ anexina V+ sufren cambios morfológicos</i>	114
<u>Figura R. 8</u> <i>Correlación entre el marcaje con anexina V y los cambios morfológicos en el conjunto de las leucemias</i>	115
<u>Figura R. 9</u> <i>Efecto de la fludarabina en la activación de STAT1 en las células LLC-B</i>	117
<u>Figura R. 10</u> <i>Efecto del AG490 en la activación de STAT1 en las células LLC-B.....</i>	119
<u>Figura R. 11</u> <i>Efecto del WHI-P131 en la activación de STAT1 en las células LLC-B.....</i>	121
<u>Figura R. 12</u> <i>Efecto del AG555 y el AG494 en la activación de STAT1 en las células LLC-B.</i>	123
<u>Figura R. 13</u> <i>Efecto de la fludarabina en la activación de STAT1 en las células LLC-B</i>	126
<u>Figura R. 14</u> <i>Efecto del AG490 en la activación de STAT1 en las células LLC-B.....</i>	128
<u>Figura R. 15</u> <i>Efecto del WHI-P131 en la activación de STAT1 en las células LLC-B.....</i>	130
<u>Figura R. 16</u> <i>Correlación entre la activación de STAT1 y la apoptosis tras el tratamiento con fludarabina</i>	134
<u>Figura R. 17</u> <i>Afectación de distintas proteínas celulares tras el tratamiento con fludarabina..</i>	134
<u>Figura R. 18</u> <i>Efecto generalizado de fludarabina en el patrón protéico en una LLC-B representativa (LLC 42A).....</i>	136
<u>Figura R. 19</u> <i>Estudio comparativo del efecto de fludarabina en el patrón protéico en la LLC-B</i>	138
<u>Figura R. 20</u> <i>Estudio inmunofenotípico de las NLC.....</i>	140
<u>Figura R. 21</u> <i>Las NLC protegen a las células LLC-B de la apoptosis espontánea</i>	141
<u>Figura R. 22</u> <i>Fludarabina induce la muerte celular de las NLC.....</i>	142
<u>Figura R. 23</u> <i>Las NLC no protegen a las células CD19+/CD5+ de la apoptosis inducida por fludarabina</i>	143

INDICE

INDICE DE TABLAS.

Tabla I. 1	<i>Principales hallazgos en los ratones deficientes en JAK.....</i>	6
Tabla I. 2	<i>Localización cromosómica de los STATs en ratón y humano.....</i>	7
Tabla I. 3	<i>Principales hallazgos en los ratones deficientes en cada STAT.....</i>	17
Tabla I. 4	<i>JAK y STAT activados por citocinas.....</i>	21
Tabla I. 5	<i>Activación de los STAT en líneas celulares tumorales y tumores primarios en humanos</i>	32
Tabla I. 6	<i>Inmunofenotipo de la LLC-B y otras neplasias hematológicas que se le asemejan....</i>	54
Tabla I. 7	<i>Clasificaciones pronósticas por estadios de la LLC-B más usadas.....</i>	58
Tabla I. 8	<i>Principales tirfostinas empleadas en clínica.....</i>	77
Tabla M. 1	<i>Características clínicas y de laboratorio de los pacientes con LLC-B incluidos en el estudio.....</i>	85
Tabla M. 2	<i>Líneas celulares incluidas en el estudio.....</i>	86
Tabla M. 3	<i>Reactivos y anticuerpos utilizados en citometría de flujo.....</i>	88
Tabla M. 4	<i>Anticuerpos primarios utilizados en el Western-blot.....</i>	95
Tabla M. 5	<i>Anticuerpos primarios utilizados en la técnica de Inmunohistoquímica.....</i>	101
Tabla R. 1	<i>Apoptosis de las células LLC-B tras el tratamiento con cuatro dosis de fludarabina</i>	109
Tabla R. 2	<i>Inhibición de la activación de STAT1 tras 24 horas el tratamiento con cuatro dosis de fludarabina.....</i>	111
Tabla R. 3	<i>Correlación entre anexina V y cambios morfológicos.....</i>	116
Tabla R. 4	<i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con fludarabina.....</i>	118
Tabla R. 5	<i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG490.....</i>	120
Tabla R. 6	<i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con WHI-P131.....</i>	122
Tabla R. 7	<i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG555 y AG494.....</i>	124
Tabla R. 8	<i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con fludarabina.....</i>	127
Tabla R. 9	<i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG490.....</i>	129
Tabla R. 10	<i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con WHI-P131.....</i>	131

INDICE

<u>Tabla R. 11</u> <i>Inhibición de la activación de STAT1 tras 24 horas de tratamiento con AG555 y AG494.....</i>	132
<u>Tabla R. 12</u> <i>Apoptosis tras 72 horas de tratamiento con AG555 y AG494.....</i>	133
<u>Tabla R. 13</u> <i>Densitometría del Western-blot de la LLC 46A y un control sano.....</i>	135
<u>Tabla R. 14</u> <i>Punto isoeléctrico y peso molecular aproximado de las proteínas 2 D.....</i>	137
<u>Tabla R. 15</u> <i>Contaje de las NLC después de 10 días de tratamiento con fludarabina.....</i>	142
<u>Tabla R. 16</u> <i>Apoptosis de las células leucémicas de tres pacientes LLC-B durante los tratamientos cruzados.....</i>	144

INTRODUCCION

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION A LA VIA DE SEÑALIZACION JAK/STAT

Muchas de las funciones celulares tales como el crecimiento, diferenciación o activación están finamente reguladas por unos factores solubles entre los que se incluyen las citocinas, factores de crecimiento y hormonas. Estos factores ejercen dichas funciones a través de la interacción con sus receptores específicos en los distintos tipos celulares de modo que la unión con este receptor induce la dimerización del mismo y provoca la activación de diferentes vías de señalización en la célula diana (*Kishimoto, et al 1994*). Una de estas vías de señalización empleada por múltiples citocinas la componen una serie de proteínas denominadas genéricamente JAK (*Janus tyrosine kinases*) y STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (*Leonard and O'Shea 1998*). La vía JAK/STAT se ha demostrado esencial tanto para las citocinas de tipo I (aquellas cuyos receptores son miembros de la superfamilia de los receptores de citocinas el cual contiene cuatro residuos cisteína conservados y un motivo extracelular triptófano-serina-X-triptófano-serina), como para las de tipo II (interferones e interleucina (IL)-10 que posee los cuatro residuos cisteína pero no posee dominios extracelulares) representando una manera de señalización desde la membrana celular hasta el núcleo extraordinariamente rápida. De acuerdo con el término utilizado en urgencias clínicas refiriéndose a una emergencia "STAT" (del latín *statim*: inmediatamente), el acrónimo STAT parece adecuado pues refleja la rapidez en su activación y su habilidad para ejercer sus funciones biológicas.

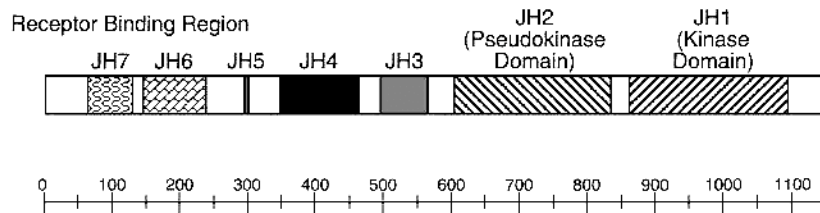
2. LA FAMILIA DE LAS JAK KINASAS

2.1. Generalidades y estructura

Hasta el momento se ha identificado cuatro JAK kinasas: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2. La primera JAK que se identificó fue Tyk2 a partir de una librería de ADN complementario de linfocitos T (*Krolewski, et al 1990*) mientras que las restantes JAK fueron clonadas usando *primers* correspondientes a motivos conservados dentro del dominio catalítico de las tirosin kinasas (*Harpur, et al 1992, Kawamura, et al 1994, Wilks, et al 1991*). Las JAK son kinasas relativamente grandes de unos 1.150 aminoácidos y con un peso molecular de entre 120 a 140 kDa aproximadamente. Los transcritos de ARN que codifican para las JAK varían entre 4.400 a 5.400 pares

INTRODUCCION

de bases. En la estructura de las JAK se pueden observar siete regiones conservadas las cuales utilizando una nomenclatura similar a la usada para los dominios SH (*Src Homology domain*) en la familia de las PTK (*Protein Tyrosin Kinase*) han sido denominadas desde el extremo carboxi terminal de JH1 a JH7 (Figura I1.).



Ortmann R.A., et al. *Arthritis Res*, 2000, 2:16-32.

Figura I1. Estructura de las JAK kinasas. La característica estructural principal de las JAK kinasas es la presencia en tándem de un dominio cinasa (JH1) y un dominio pseudocinasa (JH2) situados en el extremo carboxi terminal. El dominio JH1 posee actividad catalítica mientras que los dominios amino terminales (JH3-JH7) están implicados en la unión de la JAK cinasa a su correspondiente receptor de citocina.

La característica principal que define la estructura de estas proteínas es la existencia en tándem de un dominio cinasa (JH1) y un dominio pseudocinasa (JH2). Esta dualidad es la que precisamente da el nombre a esta familia de tirosina kinasas ya que al igual que el dios romano de las puertas Jano (Janus), las JAK kinasas "tienen dos caras".

2.1.1. Dominio JH1

En el dominio JH1 reside la función catalítica de la proteína de modo que en su asa de activación se han identificado varios sitios de autofosforilación constituidos por residuos de tirosina. Dependiendo de cada JAK, mutaciones en estos sitios pueden producir diferentes consecuencias funcionales. Mientras que la mutación de la tirosina 1007 en JAK2 elimina la actividad cinasa de la proteína (Feng, et al 1997), la mutación en los residuos correspondientes en Tyk2 (tirosina 1054 y tirosina 1055), no suprime dicha actividad catalítica (Gauzzi, et al 1996). En el caso de JAK3, la mutación de la tirosina 980 no elimina la actividad cinasa de JAK3 y en cambio la mutación de la tirosina 981 aumenta la

INTRODUCCION

actividad catalítica de la proteína (Zhou, et al 1997). Por lo tanto, parece que hay diferencias en la regulación de la actividad catalítica de cada uno de las JAK.

2.1.2. Dominio JH2

El dominio JH2 carece de los residuos críticos requeridos para la actividad catalítica de modo que su función debe ser otra. Algunos estudios indican que el dominio JH2 puede tener una función reguladora sobre la actividad catalítica inhibiéndola (Saharinen, et al 2000) mientras que en otros, se postula la necesidad de este dominio precisamente para mantener la función kinasa de las JAK (Yeh, et al 2000). Otra de las funciones en las que se ha implicado al dominio JH2 es el de ser el potencial sitio de unión para los STAT (Fujitani, et al 1997). Resulta interesante el hecho de que algunos de los pacientes que padecen inmunodeficiencia combinada severa (SCID: Severe Combined Immunodeficiency) presentan mutaciones en el dominio JH2 de la kinasa JAK3 (Candotti, et al 1997).

2.1.3. Dominios del extremo amino terminal (JH3-JH7)

El extremo amino terminal de las JAK (JH3-JH7) presenta homología con el dominio FERM (Four point one, Ezrin, Radixin, Moesin). Los dominios amino terminales están involucrados en la unión de la proteína JAK con el receptor de citocina correspondiente (Zhao, et al 1995). Estudios usando construcciones quiméricas en las que se delecciona la región amino terminal de las JAK, se suprime la unión JAK-receptor (Kohlhuber, et al 1997). Mientras que en otras JAK kinasas la interacción con el receptor parece que se extiende más allá de los dominios JH6 y JH7, en el caso de JAK3 estos dos dominios son necesarios y suficientes para la unión a la subunidad γ_c de su receptor (Chen, et al 1997). Por último, se ha descrito que el dominio FERM de las JAK interviene en la unión con el receptor de citocinas y que además regula la actividad catalítica (Hilkens, et al 2001).

A continuación se describe brevemente cada una de los JAK kinasas y sus funciones *in vivo* identificadas principalmente por estudios en ratones deficientes en cada uno de estas JAK.

INTRODUCCION

2.2. JAK1 kinasa

JAK1 es una proteína de un peso molecular de 130 kDa que está expresada en múltiples tejidos. La kinasa JAK1 está asociada con los receptores de los interferones, con los receptores que comparte la subunidad γ_c y con los receptores que comparten la cadena gp130 tal y como lo demuestra la deficiente respuesta a estas tres familias de citocinas que presentan los ratones deficientes en JAK1 (*jak1^{-/-}*) (Rodig, et al 1998). Estos ratones mueren perinatalmente por un defecto que parece ser de índole neurológica, presumiblemente por el defecto de señalización vía gp130 que requiere de JAK1 para la supervivencia neuronal. Además presentan un fallo severo en la linfopoyesis pero no en la mielopoyesis. Consistente con la idea de que JAK1 se une a los receptores que poseen la subunidad γ_c , los ratones *jak1^{-/-}* presentan un cuadro de SCID al igual que los ratones *jak3^{-/-}*.

2.3. JAK2 kinasa

Al igual que JAK1, la kinasa JAK2 está expresada en numerosos tejidos y su peso molecular es de 130 kDa. JAK2 está involucrada en la señalización a través de los receptores de citocinas que comparten la cadena β así como en la señalización de ciertos miembros de las citocinas tipo II. Los ratones deficientes en JAK2 (*jak2^{-/-}*) presentan mortalidad en la fase embrionaria debido a una ausencia total de eritropoyesis (Neubauer, et al 1998, Parganas, et al 1998). JAK2 resulta esencial para la señalización de eritropoyetina, trombopoyetina, IL-3, IL-5, GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) e interferón-gamma (IFN- γ) pero no lo es para G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*), INF-alfa (α), IFN-beta (β) e IL-6. Parece que JAK2 no resulta esencial para el desarrollo de los linfocitos T tal y como lo demuestra la transferencia de hepatocitos fetales *jak2^{-/-}* en un ratón *jak3^{-/-}* irradiado, que resulta en un desarrollo normal de todas las subpoblaciones de linfocitos T.

2.4. JAK3 kinasa

JAK3 es una proteína de 120 kDa cuya expresión tisular a diferencia de los otros miembros de la familia, es más restringida expresándose constitutivamente en células NK (*Natural Killer*) y en timocitos. Además, la expresión de JAK3 es

INTRODUCCION

inducible en linfocitos T, linfocitos B y en células de estirpe mieloide (*Gurniak and Berg 1996, Kawamura, et al 1994*). JAK3 se asocia selectivamente con los receptores de citocinas que comparten la subunidad γ_c . De modo que la existencia de mutaciones en JAK3, al igual que en la subunidad γ_c , resulta en la aparición en humanos de un cuadro de SCID (*Macchi, et al 1995, Russell, et al 1995*). Con respecto a los ratones deficientes en JAK3 (*jak3^{-/-}*) (*Nosaka, et al 1995, Thomis, et al 1995*), presentan un fenotipo inmunológico indistinguible de los ratones deficientes en la cadena γ_c (*DiSanto, et al 1995*). Mientras que en humanos el cuadro se caracteriza por la ausencia de linfocitos T y células NK pero no de linfocitos B, en ratones *jak3^{-/-}* el desarrollo de linfocitos B está severamente afectado. La explicación radica en que la señalización vía IL-7 es necesaria para el desarrollo de linfocitos B en el ratón pero no en el humano (*Kondo, et al 1993*).

Las células linfoides que se producen tienen un incremento en la apoptosis elevado de acuerdo con el papel antiapoptótico otorgado a JAK3 regulando los genes *bax* y *bcl2* en el desarrollo de los linfocitos T (*Wen, et al 2001*).

2.5. Tyk2 kinasa

Tyk2 es una kinasa de 140 kDa que fue primeramente identificada como un componente esencial para la señalización de los interferones de tipo I (IFN- α/β). Sin embargo los ratones deficientes en Tyk2 (*tyk2^{-/-}*) presentan defectos leves en la señalización para IFN- α/β (*Karaghiosoff, et al 2000*). A pesar de que a dosis bajas de interferones de tipo I las células de los ratones *tyk2^{-/-}* no responden, presentan una respuesta antiviral más o menos normal, con una respuesta normal a IL-10 y reducida, pero no ausente a IL-12. A diferencia de las otras JAK, Tyk2 parece que no posee importantes funciones no redundantes *in vivo*.

La Tabla I1. resume las funciones de las JAK kinasas *in vivo* identificadas principalmente por estudios en ratones deficientes en cada de estas kinasas.

Tabla I1. Principales hallazgos en los ratones deficientes en JAK.

Gene	Phenotype of null mice
Jak	
<i>Jak1</i>	Perinatal lethality, defects in lymphoid development
<i>Jak2</i>	Embryonic lethality, failure of erythropoiesis
<i>Jak3</i>	SCID caused by cytokine-signalling defects from γ_c -containing receptors
<i>Tyk2</i>	Hypersensitivity to pathogens due to interferon- and IL-12-signalling defects

Shuai K. and Liu B. *Nat Rev Immunol*, 2003,3:900-911.

INTRODUCCION

3. LA FAMILIA DE LOS STAT

3.1. Generalidades y estructura

Las proteínas STAT1 y STAT2 fueron identificadas por primera vez a partir de la purificación de factores que se unían a genes inducidos por interferón (*Darnell, et al 1994*). Hasta el momento otros cinco STAT (STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6) han sido identificados (*Hou, et al 1995, Liu, et al 1995, Quelle, et al 1995, Yamamoto, et al 1994, Zhong, et al 1994*). A pesar de que se ha realizado diversos intentos basados en la secuenciación a gran escala para identificar nuevos miembros pertenecientes a la familia STAT, han resultado por el momento infructuosos.

Los genes que codifican los siete STAT identificados se agrupan en tres grupos cromosómicos tanto en el ratón como en humanos (Tabla I2.).

Tabla I2. Localización cromosómica de los STAT en ratón y humano.

Family member	Chromosomal location	
	Murine	Human
Stat1	1	2q12-33
Stat4	1	2q12-33
Stat2	10	12q13-14.1
Stat6	10	12q13-14.1
Stat3	11	17q11.2-22
Stat5a	11	17q11.2-22
Stat5b	11	17q11.2-22

Ihle J.N. Cur Opinion Cell Biol, 2001, 13:211-217.

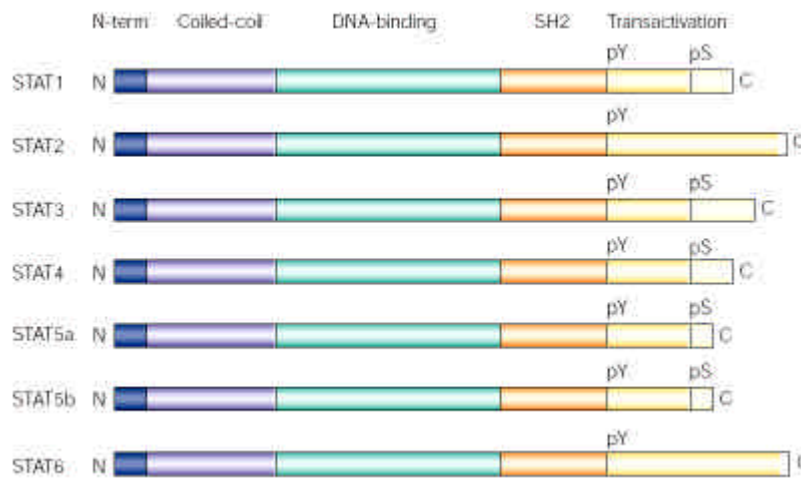
La mayoría de los STAT tienen una longitud de entre 750 a 800 aminoácidos, excepto STAT2 y STAT6 cuya longitud es de aproximadamente 850 aminoácidos. Además mientras que STAT2 y STAT6 carecen del residuo serina conservado en el extremo carboxi terminal (Figura I2.), los otros miembros poseen dicho residuo (*Darnell 1997*). La existencia de una agrupación cromosómica así como estas diferencias estructurales entre STAT2 y STAT6 con el resto de los STAT, sugieren la existencia de un gen común ancestral que inicialmente se fue duplicando y del que posteriormente se produjo una dispersión a diferentes cromosomas.

Genes que codifican para proteínas STAT han sido identificados en otras especies como en *Drosophila*, *Anopheles gambiae*, *Caenorhabditis elegans* y

INTRODUCCION

Dictyostelium (Barillas-Mury, et al 1999, Kawata, et al 1997, Liu, et al 1999, Yan, et al 1996), dato que también apoyaría la hipótesis de un gen ancestral común.

A pesar de las diferencias entre los STAT, todos ellos comparten en su estructura una serie de dominios conservados importantes para ejercer correctamente su función (Figura I2.). Estos dominios desde el extremo amino terminal al extremo carboxi son los siguientes: dominio de interacción dímero-dímero, dominio *coiled-coil*, dominio de unión a ADN, dominio SH2 (*Src-Homology 2*) y dominio de transactivación.



Yu H. and Jove R. *Nat Rev Cancer*, 2004 4(2):97-105.

Figura I2. Estructura de los STAT. Los STAT poseen varios dominios conservados necesarios para ejercer su función. Desde el extremo amino terminal al carboxi se pueden distinguir el dominio de dimerización (N-term), el dominio *coiled-coil*, el dominio de unión a ADN, el dominio SH2 (*src-homology*) que posee un residuo tirosina (pY) cuya fosforilación permite la dimerización de los STAT y por último el dominio de transactivación cuya longitud y secuencia resulta variable entre unos STAT y otros y en el que se encuentra, salvo en STAT2 y STAT6, un residuo serina (pS).

3.1.1. Dominio de interacción dímero-dímero

El dominio de interacción dímero-dímero está constituido por ocho hélices que forman una estructura en forma de gancho que facilita la interacción entre varios dímeros de STAT. Con la excepción de STAT6, el resto de los STAT se unen más o menos indiscriminadamente a las mismas secuencias consenso de ADN. En este caso, la interacción de dímeros de STAT no parece relevante pero resulta importante en caso de la unión a los lugares de unión débil estabilizando la unión a ADN por medio de la interacción con sitios de unión de

INTRODUCCION

baja afinidad situados en tándem (*Vinkemeier, et al 1996*). También ha involucrado a la porción amino terminal de los STAT en la regulación de la translocación al núcleo (*Kisseleva, et al 2002*).

3.1.2. Dominio coiled-coil

El dominio *coiled-coil* consiste en cuatro hélices alfa que proporcionan una estructura apropiada para las interacciones proteína-proteína. Varias son las proteínas descritas que pueden interactuar con los STAT a través de esta región como es el caso de proteínas coactivadoras como la proteína p48 (IRF-9) o la proteína CBP/p300 (*CREB (cAMP Response Element Binding Protein)-Binding Protein / p300*) (*Zhang, et al 1996*). También se pueden unir proteínas con función reguladora como la proteína GCN5 (*General Non-Response 5*) en el caso de STAT2 o como StIP1 (*STAT3-Interacting Protein 1*) para STAT3. Además, otros factores de transcripción como Sp-1 (*Stimulating protein 1*) o NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) (*Look, et al 1995, Shen and Stavnezer 1998*) también pueden unirse a los STAT a través de dominio *coiled-coil*.

Recientemente también se ha involucrado a este dominio en el transporte de los STAT fuera del núcleo celular (*Bhattacharya and Schindler 2003*).

3.1.3. Dominio de unión a ADN

En la parte central de la proteína se encuentra el dominio de unión a ADN de unos 170 aminoácidos de longitud. Este dominio es estructuralmente muy similar a los dominios de unión a ADN tipo inmunoglobulina. Por otra parte, el plegamiento constituido por los aminoácidos 320 a 490 contiene varias láminas β de modo similar a las encontradas en los dominios de unión a ADN de otros factores de transcripción como NF- κ B (*Levy and Darnell 2002*). La unión entre el dímero activado de STAT y el ADN se produce a expensas de relativamente pocos residuos en contacto directo con el ADN de modo que se consigue más bien gracias a una estructura en forma de abrazadera en la que las interacciones fosfotirosina-dominio SH2 entre ambas moléculas de STAT actúa a modo de bisagra (Figura I3.) (*Chen, et al 1998*). Los STAT reconocen dos tipos de motivos en el ADN: el motivo denominado ISRE (*Interferon-Stimulated Response Elements*) cuya secuencia consenso es :AGTTTNCNTTTCC y el motivo

INTRODUCCION

GAS (*Gamma-Activated Sequence*) con una secuencia consenso como sigue: TTCNNGAA. STAT1 y STAT2 se unen a secuencias tipo ISRE mientras que STAT1, STAT3, STAT4, STAT5a y STAT5b se unen a motivos GAS. STAT6 se une a un motivo diferente al resto de los STAT: TTCNNNGAA.

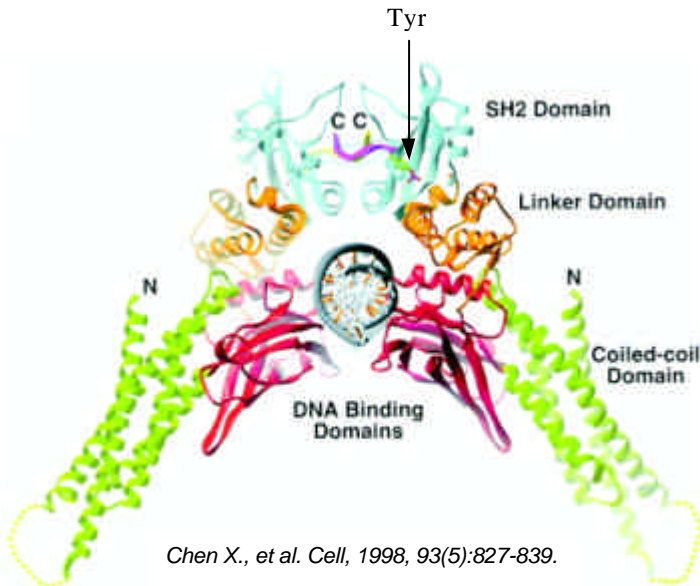


Figura 13. Estructura del complejo STAT1-ADN. Diagrama del dímero de STAT1 unido a ADN en el que se representa desde su extremo amino terminal (N) al carboxi terminal (C) los siguientes dominios: el dominio *coiled-coil* (verde), el dominio de unión a ADN (rojo), el dominio *linker* (naranja) y el dominio SH2 (azul) cuyos extremos están representados en morado y amarillo. En cada uno de los dominios SH2 se encuentra la tirosina fosforilada (flecha). El esqueleto de ADN se muestra en gris.

También se ha involucrado al dominio de unión a ADN en la regulación de la salida del núcleo de los STAT. Tanto a la correcta unión a ADN como a la regulación en la exportación desde el núcleo contribuye una pequeña región situada en posición carboxi terminal al dominio de unión a ADN que se denomina dominio *linker* (Kisseleva, et al 2002).

3.1.4. Dominio SH2

Las proteínas STAT son los únicos factores de transcripción que contienen un dominio SH2 de unión a fosfotirosinas. Este dominio es el más altamente conservado en la familia STAT y está formado por unos cien aminoácidos (aminoácidos 600-700) que sirven para dos funciones fundamentales: la de la unión de la molécula de STAT al receptor de citocina fosforilado y la de ser fosforilados en residuos tirosina conservados por las tirosina kinasas (Schindler 2002). Esta fosforilación en los residuos tirosina propicia la formación de dímeros mediante la interacción fosfotirosina-dominio SH2 entre ambas

INTRODUCCION

moléculas de STAT y además resulta importante en la formación de la estructura necesaria para la unión a ADN.

3.1.5. Dominio de transactivación

En el extremo carboxi terminal de la molécula se sitúa el dominio de transactivación. Este dominio que está conservado entre STAT homólogos (p ej. entre ratón y humano) con la excepción de STAT2, en cambio varía considerablemente tanto en su longitud como en su secuencia entre los distintos miembros de la familia STAT. Además de la fosforilación en tirosinas, se ha descrito que algunos STAT (STAT1, 3, 4 y 5) son también fosforilados en residuos serina que se encuentran dentro del dominio de transactivación (*Beadling, et al 1996, Cho, et al 1996, Wen, et al 1995*). La fosforilación en estas serinas promueve la actividad transcripcional y aumenta la expresión génica. La serina susceptible de ser fosforilada, en la posición 727 para STAT1 y STAT3 y en posiciones análogas en STAT4 y STAT5, supone un motivo putativo de fosforilación para las MAPK kinasas (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (*David, et al 1995b*). Cuando los STAT carecen de este dominio, todavía se unen al ADN pero en este caso normalmente actúan como formas dominantes negativas en contrapartida a los correspondientes STAT cuya molécula está completa (*Caldenhoven, et al 1996*). Estas formas truncadas se han identificado como variantes por *splicing* que ocurren naturalmente aunque su función biológica no está clara.

En los siguientes apartados se hace una breve descripción de cada uno de los STAT y sus funciones *in vivo* identificadas principalmente por estudios en ratones deficientes en cada uno de estos STAT.

3.2. STAT1

La proteína STAT1 presenta dos isoformas de 84 y 91 kDa respectivamente cuya importancia en la señalización por parte de los interferones tanto de tipo I como de tipo II fue claramente establecida con la generación de ratones deficientes en STAT1 (*stat1^{-/-}*) confirmando los datos iniciales vistos en líneas celulares (*Darnell, et al 1994*). Los ratones *stat1^{-/-}* presentan una elevada

INTRODUCCION

susceptibilidad a infecciones microbianas y víricas y a la formación de tumores debido a una respuesta severamente disminuida a las acciones dependientes de interferón (*Durbin, et al 1996, Meraz, et al 1996*). Aunque son varias las citocinas y factores de crecimiento que pueden activar STAT1, hasta el momento no se han identificado en estos ratones déficit en el desarrollo o en otras respuestas que se puedan atribuir a la señalización por vías diferentes a la de los interferones. Una mutación en el gen de STAT1 fue identificada en un paciente afectado de infecciones producidas por micobacterias atípicas pero no por infecciones virales (*Dupuis, et al 2001*). En este paciente la acumulación nuclear de dímeros activados de STAT1 denominados GAF (*Gamma-Activated Factor*) estaba disminuida pero no de la acumulación de ISGF3 (*Interferon Stimulated Gamma Factor 3*) implicando por lo tanto a la respuesta a IFN- γ en los efectos antimicobacterianos pero no en los antivirales. Posteriormente el mismo grupo ha descrito los casos de dos niños en los que mutaciones en STAT1 que afectan tanto a la respuesta a IFN- α/β como IFN- γ provocan que ambos niños sufrieran infecciones por micobacterias pero que ambos murieran debido a infecciones víricas (*Dupuis, et al 2003*) confirmando que la respuesta antiviral en humanos depende de la activación de STAT1 por IFN- α/β .

Por otra parte, los linfocitos T CD4⁺ pueden diferenciarse hacia el tipo Th1 (*T helper 1*) produciendo IFN- γ que promueve la respuesta inmune celular. El factor de transcripción T-bet (*T-box expressed in T cells*) es un regulador importante de la diferenciación hacia Th1 cuya expresión es inducida por IFN- γ en un mecanismo de retroalimentación aumentando la habilidad de los linfocitos T para producir IFN- γ dependiendo esta regulación de STAT1 (*Lighvani, et al 2001*). Sin embargo la expresión de T-bet no está completamente ausente en los ratones *stat1*^{-/-} de modo que debe haber mecanismos de regulación de T-bet independientes de STAT1. Este hecho junto con la observación que el ratón *stat1*^{-/-} es menos susceptible a las infecciones que los ratones con mutaciones en los genes que codifican para los receptores de IFN- γ e IFN- α/β están en consonancia con el conocimiento de vías de señalización de IFN- γ independientes de STAT1 (*Ramana, et al 2002*). De hecho, cuando se usa la tecnología de *microarrays* se encuentra un número importante de genes inducidos por IFN- γ y que son independientes de STAT1.

Además STAT1 tiene funciones en la regulación de la apoptosis como demuestra los hechos de que la apoptosis dependiente de TNF (*Tumor Necrosis Factor*)- α esta afectada en el ratón *stat1*^{-/-} debido a una expresión disminuida de

INTRODUCCION

diversas caspasas y que en la apoptosis inducida por los interferones de tipo I en células infectadas por virus, STAT1 juega un papel principal (*Tanaka, et al 1998*).

Los interferones se ha considerado como inhibidores del crecimiento aunque el papel de STAT1 en la señalización por factores de crecimiento *in vivo* no es del todo conocido. Un trabajo en el que la disregulación del FGF (*Fibroblast Growth Factor*) debido a una serie de mutaciones que llevan a un cuadro severo de caroniosinostosis y dwarfismo es contrarrestado por la ausencia de STAT1 implicando a STAT1 como regulador negativo del crecimiento celular en este modelo (*Sahni, et al 2001*).

El papel que STAT1 puede jugar en la transformación celular y oncogénesis se desarrollará más detenidamente en una sección posterior.

3.3. STAT2

STAT2 es una proteína de 113 kDa implicada en la señalización de los interferones. De hecho, se ha descrito a los interferones de tipo I (IFN- α/β) como las únicas citocinas capaces de activar a STAT2 (*Darnell, et al 1994*). A diferencia de otros STAT, STAT2 requiere de STAT1 y la proteína p48 para formar el complejo ISGF3 e interaccionar con el ADN (*Bluyssen and Levy 1997*). El ratón deficiente en STAT2 (*stat2^{-/-}*) es viable, fértil y se desarrolla normalmente pero resulta ser susceptible a las infecciones virales y tienen un fallo en la respuesta al estímulo por IFN- α/β (*Park, et al 2000*). En células *stat2^{-/-}* el aumento de STAT1 en respuesta a IFN- α está también disminuida. Consecuentemente, la inducción de genes dependientes de la activación de secuencias de tipo GAS, que presumiblemente no son directamente dependientes de STAT2, resulta deficiente. Sin embargo esta ausencia de respuesta de los genes dependientes de secuencias GAS no resulta aparente en los macrófagos *stat2^{-/-}* que expresan niveles normales de STAT1.

3.4. STAT3

STAT3 es una proteína de 92 kDa identificada en primer lugar como un factor activado por las citocinas que señalizan a través de receptores con la subunidad gp130. La generación de un ratón deficiente en STAT3 (*stat3^{-/-}*) ha resultado en un modelo letal en la fase embrionaria previa a la gastrulación (*Takeda, et al 1997*). La causa de esta letalidad tan temprana y la expresión de altos niveles de STAT3 en

INTRODUCCION

el endodermo visceral extraembrionario, sugiere que las células extraembrionarias son incapaces de iniciar la implantación (Akira 2000). La citocina LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) activa potentemente a STAT3 y de su correcto funcionamiento depende la implantación del blastocisto por lo que la deficiencia de la señal de LIF en los ratones *stat3*^{-/-} parece que está implicada en la letalidad de los mismos. Debido a la letalidad tan temprana de estos ratones, se ha tenido que recurrir a otro tipo de estrategias como la generación de tejidos específicos *stat3*^{-/-} para estudiar los efectos del déficit de STAT3 (Akira 2000). En general la deficiencia de STAT3 en un tejido en concreto no supone problemas importantes en el desarrollo pero sin embargo sí se observa otras consecuencias. La deficiencia de STAT3 en células T no impide su desarrollo pero supone un importante defecto en la respuesta de estas células a IL-6 (Takeda, et al 1998). Esta deficiente respuesta a IL-6 también se observa en hepatocitos deficientes en STAT3 (Alonzi, et al 2001). La delección de STAT3 en macrófagos conlleva su activación constitutiva con una susceptibilidad incrementada frente al lipopolisacárido (LPS) haciendo de los animales con macrófagos *stat3*^{-/-} muy susceptibles al shock endotóxico. Este fenotipo se atribuye al papel esencial de STAT3 en la respuesta anti-inflamatoria inducida por IL-10 (Takeda, et al 1999). La delección selectiva de STAT3 en la glándula mamaria conlleva un desarrollo normal de la misma pero se produce un retraso en la involución de la misma debido a un descenso en la apoptosis (Chapman, et al 1999). En queratinocitos, la deficiencia selectiva de STAT3 no altera el desarrollo normal de la epidermis pero produce una alteración en los procesos de remodelación así como un retraso en la cicatrización debido a una emigración defectuosa de las células epidermales (Sano, et al 1999). En el tejido tímico la presencia de STAT3 resulta fundamental para el desarrollo una arquitectura tisular normal (Sano, et al 2001).

La conclusión general de todos estos estudios basados en la delección selectiva de STAT3 en diversos tejidos es que este factor de transcripción no parece un regulador general del ciclo celular sino que más bien, tiene efectos muy específicos para cada tipo celular.

Otro de los campos en los que STAT3 parece jugar un papel muy importante es la transformación celular y oncogénesis. Este apartado se desarrollará con más detenimiento en una sección posterior.

INTRODUCCION

3.5. STAT4

STAT4 es una proteína de 89 kDa que esta implicada fundamentalmente en la señalización vía IL-12. Los ratones deficientes en STAT4 (*stat4^{-/-}*) (Kaplan, et al 1996, Thierfelder, et al 1996) presentan un fenotipo similar al de los ratones deficientes en IL-12 o en el receptor de la IL-12 con una disminución severa de la diferenciación de los linfocitos T hacia el tipo Th1 y una disminución de la producción de IFN- γ , de la inmunidad celular y de la expresión de los receptores para IL-12 e IL-18 en los linfocitos Th1. Los ratones *stat4^{-/-}* son pues más resistentes a padecer enfermedades autoinmunes caracterizadas por una respuesta Th1 como artritis, diabetes y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Chitnis, et al 2001). En cambio estos ratones tienen una susceptibilidad aumentada a padecer infecciones por microorganismos intracelulares. STAT4 también es activado por IL-23 (Oppmann, et al 2000) y además los interferones de tipo I inducen en humanos, pero no en ratones, la fosforilación de STAT4. A su vez, STAT4 parece ser importante en la producción de IFN- γ por parte de las células no linfoides.

3.6. STAT5

Se han descrito dos genes estrechamente relacionados y cromosómicamente ligados: STAT5a y STAT5b que codifican para dos proteínas que son idénticas en un 96% de su secuencia de aminoácidos y cuyos pesos moleculares son de 94 y 96 kDa respectivamente. La alta homología entre ambas proteínas hizo pensar que ambas proteínas debían tener funciones comunes en la regulación del crecimiento. Sin embargo, los ratones deficientes en STAT5a (*stat5a^{-/-}*) (Liu, et al 1997), en STAT5b (*stat5b^{-/-}*) (Udy, et al 1997) y en STAT5a/b (*stat5a/b^{-/-}*) (Teglund, et al 1998) mostraron funciones tanto comunes como específicas para cada proteína. El ratón *stat5a^{-/-}* tiene una ausencia del desarrollo de la glándula mamaria dependiente de prolactina. La ausencia de STAT5b da lugar a un retardo en el dimorfismo sexual así como un defecto en la regulación de la expresión génica en el hígado dependiente de la hormona del crecimiento (GH: *Growth Hormone*). En cuanto al ratón *stat5a/b^{-/-}*, ambos sexos son de pequeño tamaño, presentan una elevada mortalidad pocas semanas después del nacimiento, y en caso de las hembras las que sobreviven son infértiles debido a un desarrollo deficiente del cuerpo lúteo teniendo el desarrollo mamario también afectado. Además presentan niveles bajos

INTRODUCCION

de IGF-1 (*Insuline-like Growth Factor 1*), una médula ósea hipocelular, linfopenia, neutrofilia y una discreta anemia y trombocitopenia (*Snow, et al 2002*).

El análisis de sistema inmune en los ratones *stat5a^{-/-}* y *stat5b^{-/-}* así como del doble deficiente *stat5a/b^{-/-}* sugieren también la existencia tanto de funciones redundantes como no redundantes para cada STAT5 (*Moriggl, et al 1999*). En cuanto al ratón deficiente en ambos STAT el desarrollo linfoide es más o menos normal pero los linfocitos T muestran un profundo defecto en la proliferación, en la progresión del ciclo celular además de presentar un defecto en el desarrollo de las células NK. Estos resultados muestran que las proteínas STAT5 son esenciales en la señalización vía IL-2 en los linfocitos T. Estos ratones tienen también un número reducido de precursores de los linfocitos B y las células B maduras tienen una respuesta disminuida a IL-7 pero con una producción normal de inmunoglobulinas (*Sexl, et al 2000*).

Otro de los campos en los que STAT5 juega un papel importante es la transformación celular y oncogénesis. Este apartado se desarrollará con más detenimiento en una sección posterior.

3.7. STAT6

STAT6 es una proteína de 120 kDa que fue primeramente identificada como un factor de transcripción inducido por IL-4 (*Hou, et al 1994*). Puesto que STAT6 es crítico para la diferenciación de los linfocitos al tipo Th2 (*T helper 2*) es lógico que el ratón deficiente en STAT6 (*stat6^{-/-}*) presente un fallo en la diferenciación hacia Th2 y en la respuesta a IL-4 e IL-13. STAT6 regula la expresión de los factores de transcripción GATA-3 (*GATA binding protein-3*) y c-Maf (*cellular-musculoaponeurotic fibrosarcoma*), dos factores de transcripción envueltos en la correcta función Th2 así como en el remodelación de la cromatina en el locus de IL-4. El ratón *stat6^{-/-}* tiene un fallo en el aumento de expresión de las moléculas de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de clase II, de CD23 y de la cadena α del receptor de la IL-4 en respuesta a IL-4, además de un fallo en la producción de inmunoglobulina (Ig)E (*Shimoda, et al 1996*). En el ratón deficiente en STAT6 se observa un descenso en las enfermedades alérgicas, asmáticas (*Kuperman, et al 1998*), un defecto en la eliminación de parásitos (*Kaplan, et al 1998b*) y un aumento pronunciado en la severidad de las patologías mediadas por una respuesta Th1

INTRODUCCION

como en el caso de la EAE (*Chitnis, et al 2001*). De hecho, IL-4 vía STAT6 antagoniza la respuesta Th1 aunque una diferenciación residual hacia Th1 independiente de STAT4 llega a ser observable en el ratón doble deficiente en STAT4 y STAT6. Por último, la deficiencia de STAT6 se observado que está asociada con un incremento de la respuesta inmune frente a tumores (*Terabe, et al 2000*).

En la Tabla I3. se resumen los principales hallazgos en los ratones deficientes para cada uno de los STAT.

Tabla I3. Principales hallazgos en los ratones deficientes en cada STAT.

Family member	Physiological functions
STAT1	Response to types I and II IFNs, IL-2, IL-6, EGF, PDGF, GM-CSF
STAT2	Response to type I IFN
STAT3	Embriogenesis, skin remodelling, involution of the post-lactating mammary gland
STAT4	Response to IL-12 for the development of type I T-helper cells
STAT5a	Development of the mammary gland and lactogenesis
STAT5b	Response to the GH, regulation of sexual dimorphism and development of NK cells
STAT6	Response to IL-4 and IL-13 for the development of type II T-helper cells

Calo V., et al. J Cell Physiol, 2003, 197:157-168.

4. VIA DE SEÑALIZACION JAK/STAT

Como ya se ha dicho al principio, la señalización a través del sistema JAK/STAT es utilizado por numerosas citocinas y factores de crecimiento y supone un modo de señalización desde la membrana celular hasta el núcleo extraordinariamente rápida. Aunque diferentes citocinas señalizan a través de diferentes STAT, cada una de ellas con sus peculiaridades propias, en todos los casos la señalización vía JAK/STAT posee unas características, una secuencia temporal y unos requerimientos funcionales

INTRODUCCION

comunes. En el siguiente apartado se explica brevemente, como modelo típico de señalización por esta vía, la manera en que IFN- γ transmite sus señales al interior de la célula diana utilizando la vía JAK/STAT.

4.1. Vía de señalización de IFN- γ

El receptor de citocinas de tipo II consiste en dos cadenas polipeptídicas disociadas cuando no hay ningún ligando (Figura I4.a.). La cadena α (IFNGR1: *IFN Gamma Receptor 1*) está principalmente implicada en la unión con la citocina mientras que la cadena β (IFNGR2: *IFN Gamma Receptor 2*) se encarga de la transducción de señales jugando un papel secundario en la interacción con el ligando. Cada una de las subunidades del receptor están asociadas con JAK kinasas inactivas. La subunidad α se asocia con JAK1 mientras que JAK2 se asocia con la subunidad β (Bach, et al 1996). La unión de IFN- γ con su receptor provoca la dimerización de las dos subunidades α y β y la yuxtaposición de las JAK asociadas a ambas (Figura I4.b.). El acercamiento de ambas JAK propicia la transfosforilación de los residuos tirosina que se encuentran en su asa de activación dentro del dominio JH1 (Figura I4.c.). Esta fosforilación conlleva el aumento de la actividad catalítica y por ende la activación de ambas JAK kinasas. Estas JAK kinasas activadas a su vez fosforilan específicamente un residuo tirosina situado dentro de la cadena α del receptor generando un lugar de unión para STAT (Figura I4.d.), concretamente en humanos el residuo 440 (Greenlund, et al 1995). En el caso de INF- γ , el miembro de la familia STAT involucrado es STAT1 de modo que éste interacciona con este residuo tirosina de la subunidad α a través de su dominio SH2 (Figura I4.e.). Mientras está asociado con la subunidad α , STAT1 es fosforilado por las JAK activadas en un residuo tirosina conservado situado en el extremo carboxi-terminal de la molécula (Figura I4.f.). En el caso de STAT1 el residuo tirosina ocupa la posición 701. Las moléculas de STAT1 activadas por la fosforilación se disocian de la cadena α del receptor del IFN- γ para dimerizar entre sí de modo que cada dímero de STAT1 vuelve a ser fosforilado, esta vez en un residuo serina situado en el dominio de transactivación convirtiendo al dímero en un factor de transcripción activo (Figura I4.g.) (Greenlund, et al 1995). El dímero se transloca al núcleo donde reconoce las secuencias tipo GAS en la región promotora de los genes diana induciendo su expresión (Figura I4.h.) (Darnell 1997).

INTRODUCCION

Una vez en el núcleo, son varias las proteínas que interaccionan con STAT1 actuando como moduladores de su actividad transcripcional. Entre estas proteínas se encuentra CBP/p300 que posee actividad histona acetiltransferasa y actúa como coactivador (Zhang, et al 1996). Otras proteínas que interaccionan con STAT1 son MCM5 (Minichromosome Maintenance 5) (Zhang, et al 1998) y BRCA1 (Breast Cancer susceptibility gene 1) (Ouchi, et al 2000) que se asocian con el residuo fosforilado de serina y que actúan aumentando la transactivación.

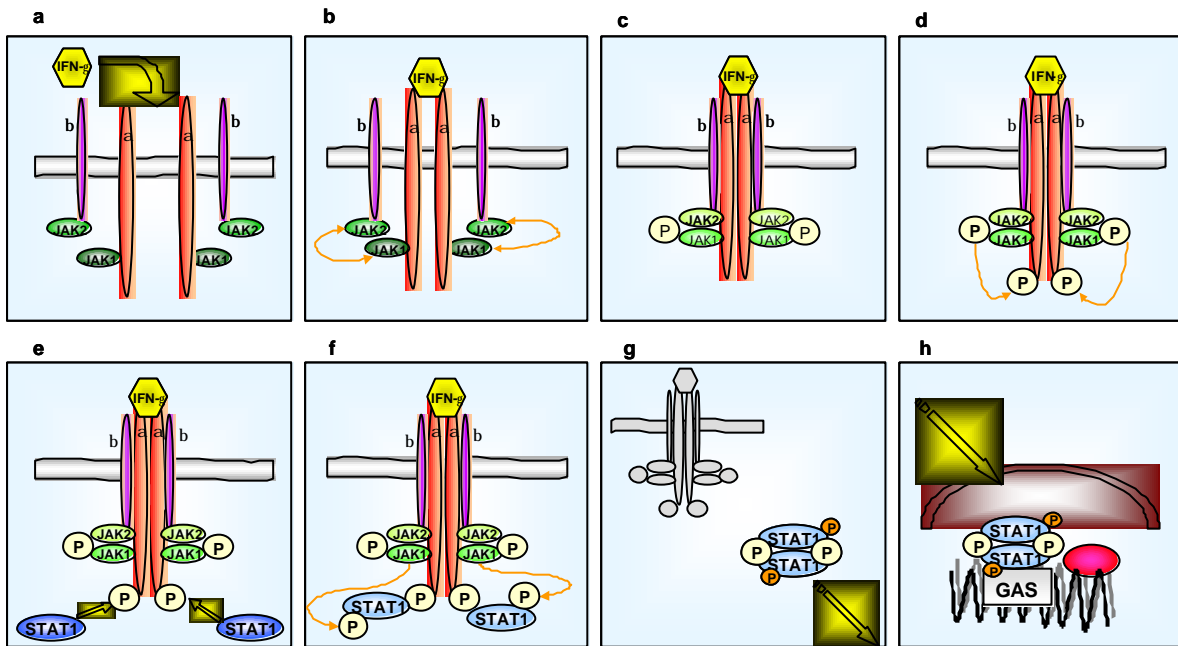


Figura 14. Vía de señalización de IFN-g. El receptor del IFN- γ posee dos cadenas α (IFNGR1) y dos cadenas β (IFNGR2) (a) que oligomerizan cuando IFN- γ se une al receptor propiciado la yuxtaposición de JAK1 y JAK2 que están asociadas a las cadenas α y β respectivamente (b). Este hecho propicia la activación por transfosforilación de ambas JAK (c) y la fosforilación en la cadena α del receptor por parte de las JAK activadas (d) creando un sitio de unión para STAT1 (e). Dos moléculas de STAT1 se unen a dichos sitios y son fosforiladas en residuos tirosina por las JAK (f) favoreciendo la formación de un dímero de STAT1 que a su vez es fosforilado en residuos serina (g) y transloca al núcleo donde se une a secuencias tipo GAS en el ADN induciendo la expresión génica (h).

Tras la estimulación con IFN- γ , también se produce un homodímero de la isoforma β de STAT1 (Horvath 2000). Esta isoforma se diferencia de la molécula normal de STAT1 (STAT1 α) en que carece de los 38 últimos aminoácidos del extremo carboxi terminal y no posee de actividad transcripcional. Este dato sugiere que los sitios necesarios para la interacción con el complejo de la ARN polimerasa

INTRODUCCION

o con moléculas coactivadoras de la transcripción deben residir en la región ausente en esta isoforma β .

En resumen, de la descripción de la señalización de IFN- γ por la vía JAK/STAT se deducen una serie de pasos y requerimientos funcionales comunes a todas las citocinas y los factores de crecimiento que utilizan la vía JAK/STAT como son: la formación de los sitios de unión para los STAT para su unión al receptor; la activación de los STAT mediante fosforilación y su dimerización; la translocación de los STAT al núcleo y por último la unión del dímero al ADN para regular la expresión génica.

En los siguientes apartados se van a desarrollar más detenidamente algunos de estos procesos que se producen durante la señalización JAK/STAT.

4.2. Unión de los STAT al receptor de citocinas

La unión de la molécula de STAT al correspondiente receptor de citocina se realiza a través del dominio SH2. Uno de los mecanismos para la especificidad de la unión reside en el hecho de que los dominios SH2 de los diferentes STAT difieren entre sí lo suficiente como para reconocer diferentes motivos fosforilados (*Lin, et al 1995*). En la Tabla I4. se resume los JAK y STAT activados por las citocinas que utilizan la vía JAK/STAT. El reclutamiento de un único grupo de STAT para cada familia de receptores de citocinas supone un hecho crítico para definir la especificidad de la respuesta biológica subsiguiente.

Algunos receptores de citocinas tienen un único sitio de anclaje para STAT mientras que otros poseen más de un sitio de unión. La presencia de más de un sitio de unión permite que dos moléculas de STAT puedan ser activadas simultáneamente facilitando la dimerización (*Stahl, et al 1995*).

En general, el anclaje de los STAT se produce en los sitios de unión que se crean en la cadena del receptor. En algunas situaciones como en la estimulación por interferones de tipo I, STAT2 se une a la cadena del receptor IFNAR2 y la fosforilación de STAT2 por parte de JAK2 y Tyk2 crea en STAT2 un sitio de unión para STAT1 (*Li, et al 1997b*) de modo que la unión de STAT1 a IFNAR2 depende de STAT2 pero no viceversa.

En otros casos, las JAK kinasas son las que proporcionan el sitio de unión para los STAT (*Fujitani, et al 1997*).

INTRODUCCION

Tabla I4. JAK y STAT activados por citocinas.

Type I Cytokines	Jaks	STATs
<i>Cytokines whose receptors share γ_c</i>		
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	Jak1, Jak3	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-4	Jak1, Jak3	Stat6
IL-13*	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat6
<i>Cytokines whose receptors share β_c</i>		
IL-3, IL-5, GM-CSF	Jak2	Stat5a, Stat5b
<i>Cytokines whose receptors share gp130</i>		
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat3
IL-12 [†]	Jak2, Tyk2	Stat4
Leptin [‡]		Stat3
<i>Cytokines with homodimeric receptors</i>		
Growth hormone	Jak2	Stat5a, Stat5b, Stat3
Prolactin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Erythropoietin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Thrombopoietin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Type II Cytokines		
<i>Interferons</i>		
IFN α , IFN β	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat2
IFN γ	Jak1, Jak2	Stat1
IL-10 [‡]	Jak1, Tyk2	Stat3

*IL-13 does not share γ_c , but uses IL-4R α .

[†]IL-12 and leptin do not share gp130, but their receptors are related to gp130.

[‡]IL-10 is not an interferon, but its receptor is a type II cytokine receptor.

Ravandi F., et al. *Brit J Haematol* 2002 116:57-77.

4.3. Fosforilación y dimerización de los STAT

Como ya se ha descrito anteriormente, los STAT tienen un residuo tirosina conservado aproximadamente en la posición 700 cuya fosforilación resulta esencial para la activación y la formación de dímeros de STAT.

La fosforilación de los STAT, tal y como hemos visto en el modelo de señalización de IFN- γ , generalmente es llevada a cabo por las JAK kinasas. Las JAK kinasas son activadas por la oligomerización del receptor de una manera parcialmente específica ya que diferentes citocinas pueden activar las mismas JAK (*Schindler 2002*). En otras ocasiones, como el caso de los factores de crecimiento EGF (*Epidermal Growth Factor*) y PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) la fosforilación es llevada por los propios receptores que poseen una actividad tirosina kinasa intrínseca (*Darnell 1997*). Los receptores tipo *serpentine* que atraviesan siete veces la membrana citoplasmática como el receptor de la angiotensina II, serotonina o melatonina son capaces de activar los STAT (*Williams*

INTRODUCCION

1999). A veces, los factores de crecimiento pueden reclutar tirosina kinasas de la familia Src (*Sarcoma*) para activar los STAT (*Chaturvedi, et al 1998*).

La dimerización se produce por interacción entre el dominio SH2 de una de las moléculas de STAT con la tirosina fosforilada de la otra molécula. Puesto que cada molécula de STAT posee un dominio SH2 y un residuo tirosina fosforilado la interacción que estabiliza los dímeros formados es bivalente. Esta naturaleza bivalente de la interacción ayuda a entender por qué la dimerización de STAT se ve favorecida sobre la interacción monovalente entre la molécula de STAT y la cadena fosforilada del receptor. La homodimerización o heterodimerización se basa en la especificidad del dominio SH2 y el microambiente en el que se produce la fosforilación del residuo tirosina (*Leonard and O'Shea 1998*). De este modo, la formación de ciertos heterodímeros como STAT1 con STAT2 o STAT3 (*Horvath and Darnell 1997*) y de STAT5a con STAT5b (*Mui, et al 1995*) pueden producirse mientras que otros no son posibles. En el caso de STAT2 solamente puede formar heterodímeros con STAT1 pero no homodímeros STAT2-STAT2.

4.4. Translocación al núcleo y actividad transcripcional de los STAT

Los STAT carecen de una señal de localización nuclear y aunque se cree que la fosforilación del residuo tirosina y la dimerización son esenciales para la translocación nuclear, no parecen ser suficientes. De hecho, la fosforilación de la tirosina es necesaria para retener STAT1 en el núcleo teniendo que ser defosforilada para que lo abandone (*McBride, et al 2000*). La porción amino terminal de la molécula cuyos últimos 125 aminoácidos están bien conservados, contribuyen a regular la translocación al núcleo (*Strehlow and Schindler 1998*). En el caso de STAT1, la translocación al núcleo es dependiente de la actividad de una GTPasa denominada Ran y de la implicación del sistema de transporte de las importinas (*McBride, et al 2002, Sekimoto, et al 1996*). En cualquier caso, el tráfico intracelular de los STAT no está del todo aclarado.

La actividad transcripcional de los STAT es regulada por la fosforilación de un residuo serina situado en el dominio de transactivación. Este residuo serina se ha identificado en todos los STAT (con la excepción de STAT2 y STAT6 que carecen del mismo). En STAT1 y STAT3 la alteración de esta serina reduce su actividad transcripcional a un 20% (*Imada and Leonard 2000*). La activación por IFN- γ propicia la fosforilación tanto en el residuo tirosina como en el serina de modo que éste

INTRODUCCION

último no requiere de la previa fosforilación de la tirosina (*Zhu, et al 1997*). La fosforilación en serinas de STAT1 y STAT3 dependiente de EGF, es dependiente de las quinasas de la familia ERK (*Extracellular-signal-Regulated Kinase*) mientras que la fosforilación en serina de STAT3 tras el estímulo de IL-6 es independiente de la actividad ERK (*Chung, et al 1997*). Por otra parte, la fosforilación en serina en algunos casos regula negativamente la fosforilación de la tirosina, la unión a ADN y la actividad transcripcional (*Lim and Cao 1999*).

Estos hechos resultan de interés porque supondría la interrelación entre las vías de señalización de JAK/STAT y la de las MAPK quinasas. Sin embargo la naturaleza de esta interacción parece depender de cada estímulo en particular y del contexto celular en qué se produce. Además, la identidad de la quinasa o quinasas responsables de la fosforilación de los residuos serina sigue siendo controvertida.

4.5. Regulación de la vía JAK/STAT

Tan importante como la habilidad para iniciar la respuesta frente al estímulo producido por una citocina o factor de crecimiento resulta la terminación de la misma. De hecho, resulta lógico pensar que la falta de la regulación de las vías JAK/STAT puede ser importante en la patogénesis de distintas enfermedades de índole variada. La duración de la activación de los STAT es pues limitada decayendo su respuesta en un tiempo limitado. Los mecanismos implicados en esta limitación de la activación no están del todo bien definidos aunque sí que se conocen algunos de ellos. En los apartados siguientes vamos a hacer una breve descripción de los más importantes.

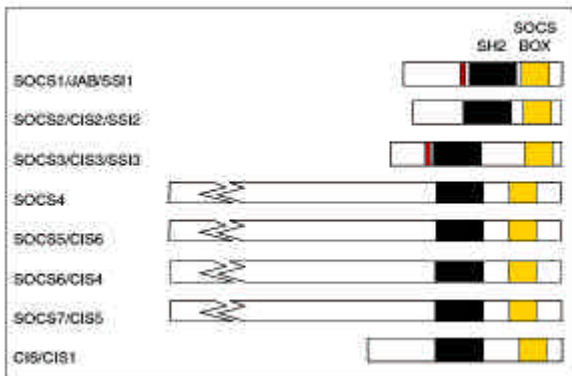
4.5.1. La familia SOCS

El primer miembro de la familia SOCS (*Supressors of Cytokine Signaling*) fue clonado en 1997 por tres grupos distintos utilizando distintas aproximaciones experimentales (*Endo, et al 1997, Naka, et al 1997, Starr, et al 1997*). La búsqueda en bases de datos usando la secuencia predicha de SOCS1 mostró que al menos 20 proteínas en ratón y humano compartían homología en su secuencia en los últimos 40 residuos del motivo carboxi terminal denominado SOCS *box*. Estas 20 proteínas fueron clasificadas en 5 subfamilias en función

INTRODUCCION

del dominio proteico situado en la región central de la molécula. La familia de proteínas con un dominio SH2 se denominó SOCS con un total de 8 miembros: CIS (*Cytokine Inducible SH2-domain protein*) y las proteínas SOCS designadas de SOCS-1 a SOCS-7 (Figura I5.) (Krebs and Hilton 2001).

Entre los miembros de la familia SOCS, el papel de SOCS1, SOCS2, SOCS3 y CIS ha sido bien estudiado por lo que nos centraremos en ellos.



Krebs D.L. and Hilton D.J. *Stem Cells* 2001 19:378-387.

Figura I5. Estructura de las proteínas de la familia SOCS. Las proteínas SOCS (Supressors of Cytokine Signaling) poseen en su extremo carboxi terminal un región de unos 40 aminoácidos que se denominan SOCS box. En la región central presentan un dominio SH2. El extremo amino terminal es variable en longitud, desde 50 hasta 380 aminoácidos Cuando se compara la secuencia aminoacídica del extremo amino terminal se observa que existe una similitud entre parejas de SOCS: CIS y SOCS2, SOCS1 y SOCS3, SOCS4 y SOCS5 y por último SOCS6 y SOCS7

La función *in vivo* de los SOCS ha sido investigada mediante la generación de los ratones deficientes en los correspondientes SOCS. El ratón deficiente en SOCS1 (*socs1*^{-/-}) nace normalmente pero presenta un crecimiento deficiente y muere a las tres semanas con un síndrome caracterizado por linfopenia severa, activación de los linfocitos T, degeneración grasa con necrosis hepática e infiltración a expensas de macrófagos en los órganos principales (Alexander, et al 1999, Marine, et al 1999). Este cuadro se produce principalmente debido a una disregulación de la respuesta a IFN- γ .

El ratón deficiente en SOCS3 (*socs3*^{-/-}) muere en la época embrionaria debido a una insuficiencia placentaria probablemente por una falta de regulación en la respuesta frente a LIF (Takahashi, et al 2003). Por otra parte, estudios en macrófagos *socs3*^{-/-} han mostrado un importante papel de SOCS3 en la regulación de la señalización de IL-6 (Croker, et al 2003).

En cuanto al ratón deficiente en SOCS2 (*socs2*^{-/-}) (Metcalf, et al 2000), una falta de regulación en la GH propicia que a partir de la tercera semana de edad muestre un aumento del crecimiento corporal de un 30%-40% a expensas de

INTRODUCCION

un incremento en el peso de las vísceras, un incremento de la longitud corporal en general y de los huesos en particular y un engrosamiento de la dermis. Recientemente, se ha descrito en los ratones *socs2*^{-/-} un déficit en la diferenciación neuronal también debido a un fallo en la regulación de la GH (Turnley, et al 2002).

Generalmente estas proteínas están expresadas a bajos niveles en células sin estimular y son rápidamente inducidos tras la estimulación por parte de las citocinas de modo que su transcripción está mediada por los STAT (Cohney, et al 1999, Davey, et al 1999).

Las proteínas SOCS inhiben la vía JAK/STAT mediante un clásico mecanismo de retroalimentación negativa presentando especificidad por las citocinas y no por las JAK o los STAT (Greenhalgh and Hilton 2001). Los SOCS pueden inhibir el estímulo de las citocinas mediante diversos mecanismos (Figura 16.). SOCS1 puede unirse directamente a través de su dominio SH2 a las JAK fosforiladas en tirosinas (Endo, et al 1997, Naka, et al 1997). El mecanismo de acción de CIS parece ser la inhibición competitiva con los STAT por los sitios de unión en el receptor (Ram and Waxman 2000). La inhibición de la señalización de las citocinas por parte de SOCS3 requiere la unión al receptor activado de citocinas (Nicholson, et al 2000). Por último, se ha involucrado a los SOCS en la degradación de proteínas de señalización a través de la vía de ubiquitinización-proteasoma de modo que a través del motivo SOCS box pueden unirse a las elonginas B y C (Zhang, et al 1999).

4.5.2. La familia PIAS

La proteína PIAS1 (*Protein Inhibitor of Activated STAT*), también denominada GBP (*Gu/RNA helicase II Binding Protein*), fue identificada mediante ensayos de doble híbrido en levaduras usando STAT1 β como "cebo" (Valdez, et al 1997). La familia PIAS consiste en cuatro miembros: PIAS1, PIAS3, PIASX y PIASY de las cuales existen diversas variantes generadas por *splicing*. En la estructura de las proteínas PIAS destaca un dominio RLD (*RING-finger-like-zinc-binding domain*) en la parte central de la molécula y se ha descrito un dominio putativo denominado SAP (*Scaffold attachment factor A/B*) en el extremo amino terminal de la proteína. Este dominio se une específicamente a las regiones de cromatina que se unen a la matriz nuclear (Aravind and Koonin

INTRODUCCION

2000) y podría estar involucrado en la organización de la cromatina y expresión génica. Las proteínas PIAS contienen, también en el extremo amino terminal un motivo conservado consistente en LXXLL, presente en otras moléculas coreguladoras y que interacciona con receptores nucleares.

La interacción de las proteínas PIAS con los distintos STAT parece que exhibe cierta especificidad (*Greenhalgh and Hilton 2001*) y es dependiente del estímulo por citocinas de modo que en células sin estimular no se produce la interacción PIAS-STAT. Han sido descritos distintos mecanismos de acción de las proteínas PIAS (Figura 16.) como la inhibición de la unión a ADN de los STAT (*Liu, et al 1998*) o el reclutamiento de histonas deacetilasas que actuarían como moléculas corepresoras (*Tussie-Luna, et al 2002*). Las proteínas PIAS tienen actividad SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) E3 ligasa de modo que se ha demostrado que las proteínas PIAS pueden llevar a cabo la conjugación de STAT1 con la molécula SUMO (*Ungureanu, et al 2003*).

Las proteínas PIAS regulan otros factores de transcripción a parte de los STAT como las proteínas SMAD o el receptor de andrógenos en este último caso aumentando su actividad transcripcional (*Gross, et al 2001*).

En cualquier caso papel fisiológico de las proteínas de la familia PIAS en la regulación de la señalización de los STAT no está del todo definido y requiere futuros estudios para su mejor comprensión.

4.5.3. Tirosina fosfatasas

Otro de los mecanismos de regulación de la vía JAK/STAT supone la defosforilación de sus componentes activados (Figura 16.). Varias son las tirosina fosfatasas que han sido identificadas regulando tanto a las JAK como a los STAT. La fosfatasa SHP-1 (*SH2 containing domain Phosphatase-1*) que se haya expresada principalmente en células hematopoyéticas, está asociada a varios receptores como la cadena β del receptor de la IL-3 y el receptor de la Eritropoyetina y se le ha implicado en la defosforilación tanto de JAK2 (*Klingmuller, et al 1995*) como de JAK1 (*David, et al 1995a*). La fosfatasa SHP-2 también se ha implicado en la defosforilación JAK kinasas además de la defosforilación de los STAT tanto a nivel citoplasmático (*Chen, et al 2003b*) como a nivel nuclear (*Wu, et al 2002*).

INTRODUCCION

La fosfatasa CD45 expresada a altos niveles en células hematopoyéticas y que tiene un papel crucial en la señalización antígeno-receptor en linfocitos T y B, puede unirse directamente y defosforilar a todos las JAK (Irie-Sasaki, et al 2001) aunque su papel fisiológico aún debe ser establecido.

Las fosfatasas PTP1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1B*) y TCPTP (*T-cell Protein Tyrosine Phosphatase*) son dos fosfatasas altamente relacionadas que también se han involucrado en la defosforilación de las JAK (Myers, et al 2001). Además de actuar sobre las JAK, se ha visto que PTP1B cuando está sobreexpresada defosforila STAT5 (Aoki and Matsuda 2000) y la isoforma nuclear de la fosfatasa TCPTP, denominada TC45, está involucrada en la defosforilación en núcleo de varios STAT. Las células que carecen de esta fosfatasa retienen STAT1 fosforilado en el núcleo por mucho más tiempo que las células normales (ten Hoeve, et al 2002). Recientemente la fosfatasa TC45 también se implicado en la defosforilación de JAK1 y JAK3 en citoplasma (Simoncic, et al 2002).

4.5.4. Modificaciones proteicas

Tanto las JAK como los STAT pueden sufrir diversas modificaciones post-translacionales siendo la más importante como hemos visto la fosforilación en residuos tirosina. Otras de estas modificaciones, pueden ser importantes en la regulación tanto de las JAK como de los STAT.

La vía de ubiquitinación-proteasoma se ha implicado en la regulación de la vía JAK/STAT. JAK2 es ubiquitinada tanto *in vitro* como *in vivo* (Ungureanu, et al 2002). El motivo SOCS *box* de SOCS1 que interacciona con las elonginas B y C es necesario para la ubiquitinación de JAK2 de modo que la kinasa JAK2 poliubiquitinada es rápidamente degradada. STAT1 también puede conjugarse con ubiquitinas (Kim and Maniatis 1996). Aunque el significado de la ubiquitinación en la regulación de los STAT no está claro resulta interesante que existen virus que evaden el sistema inmune induciendo la degradación de algunos STAT mediante su conjugación con ubiquitinas (Ulane, et al 2003).

Otra modificación post-transduccional que puede sufrir las JAK y los STAT es la conjugación con ISG15 (*Interferon Stimulated Gene 15*) (Malakhova, et al 2003). La falta de eliminación de la conjugación con ISG15 en STAT1 conlleva

INTRODUCCION

una prolongación en la fosforilación en tirosinas, en la unión a ADN y en la activación génica. Parece que la conjugación con ISG15 actúa como un mecanismo de retroalimentación positivo.

La conjugación con la proteína SUMO es otra de las modificaciones a las que los STAT se pueden ver sometidos. Como ya hemos visto las proteínas PIAS tienen actividad SUMO E3 ligasa de modo que se ha demostrado que estas proteínas PIAS pueden promover la conjugación de STAT1 con la molécula SUMO, aunque el papel de la conjugación con SUMO debe ser aún clarificado.

Otras de las modificaciones post-transduccionales que se han descrito son la metilación de residuos arginina en STAT1 que incrementa su unión a ADN posiblemente debido a una inhibición de la interacción de STAT1 con PIAS1 (Mowen, et al 2001) y la acetilación por CBP/p300 en el caso de STAT6 (Shankaranarayanan, et al 2001) que aumenta su actividad transcripcional. Por último, la ruptura de la porción carboxi terminal por serina proteasas, como la calpaina cisteína proteasa puede actuar sobre algunos STAT generando formas truncadas que pueden actuar como dominantes negativos que podrían tener un papel en la diferenciación mieloide (Azam, et al 1997).

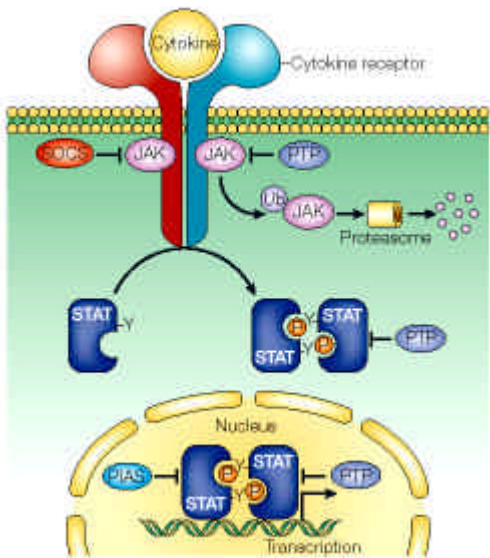


Figura I6. Regulación negativa de la vía JAK/STAT.

Representación esquemática de algunas de las vías de regulación de la vía JAK/STAT. Las JAK kinasas pueden ser reguladas a distintos niveles: proteínas SOCS, PTP (*Protein Tyrosine Phosphatases*) y mediante degradación mediada por conjugación con ubiquitininas. Los STAT pueden ser regulados a través de las proteínas PIAS y también por las PTP que pueden actuar tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear.

Shuai K. and Liu B. *Nat Rev Immunol*, 2003,3:900-911.

INTRODUCCION

4.6. Relación de la vía JAK/STAT con otras vías

Tal y como se ha apuntado en anteriores secciones, existe una interrelación de la vía de señalización JAK/STAT con otras vías así como entre distintas vías JAK/STAT, activadas por la misma o diferentes citocinas, entre sí. En esta sección se describe brevemente las principales vías que de un modo u otro entran en relación con la vía JAK/STAT.

Como ya se ha apuntado, el residuo serina que se fosforila en los STAT es un motivo putativo de fosforilación para las MAPK kinasas. Aunque la naturaleza de la interacción entre ambas vías parece que depende de cada estímulo en particular y el tipo celular en qué se produce. Mientras que el estímulo de EGF produce fosforilación en serinas tanto en STAT1 como en STAT3 y es dependiente de kinasas ERK, el estímulo de IL-6 produce fosforilación en la serina de STAT3 de manera independiente de la actividad de las kinasas ERK (*Chung, et al 1997*).

La familia de NF- κ B es un grupo de factores de transcripción que se encuentran de forma latente en el citoplasma y que son activados por diversas señales como el TNF, IL-1 y LPS. La vía de NF- κ B tiene un papel importante en la regulación inmune y en la activación de varios genes con funciones antivirales e inmunorreguladoras que requieren la cooperación de esta vía y la vía JAK/STAT (*Li and Verma 2002*). Parece que la interacción entre ambas vías se realizaría a través de las proteínas SOCS que pueden ser inducidas por citocinas que usan la vía JAK/STAT o la vía de NF- κ B (*Starr, et al 1997*). En los macrófagos, SOCS1 es rápidamente inducido por LPS inhibiendo la activación de NF- κ B y de STAT1 inducida por LPS (*Kinjyo, et al 2002*). Además, SOCS1 interactúa con un componente de la vía de activación de NF- κ B por LPS denominado IRAK (*IL-1 Receptor Associated Kinase*), de modo que SOCS1 podría tener un efecto inhibitorio sobre la misma. Por otra parte SOCS1 está involucrado en la señalización de TNF tal y como lo muestra el hecho de que los fibroblastos *socs1*^{-/-} son más susceptibles a la apoptosis inducida por TNF (*Morita, et al 2000*).

Otra vía con la que la señalización JAK/STAT interacciona es la vía TGF (*Transforming Growth Factor*)- β /SMAD. La vía JAK/STAT activada por IFN- γ regula negativamente la vía TGF- β /SMAD a través de la inducción de un SMAD inhibidor,

INTRODUCCION

SMAD7 (Ulloa, et al 1999). Las proteínas LIF y BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein-2*) que son respectivamente activados por la vía STAT y la vía SMAD tienen un efecto sinérgico en la inducción de astrocitos a partir de progenitores neuronales mediante la formación de un complejo STAT3-SMAD1 (Nakashima, et al 1999).

La vía JAK/STAT también se ha relacionado con la vía de la PKC- ϵ (*Protein Kinase C- ϵ*) implicada en la señalización de las integrinas. La activación de STAT1 por IFN- γ atenúa el desprendimiento de la matriz tanto en líneas celulares humanas como murinas implicando también a la vía JAK/STAT en la adhesión celular (Ivaska, et al 2003). En ausencia de PKC- ϵ la fosforilación del residuo tirosina de STAT1 está inhibida. Aunque la relación entre PKC- ϵ y la vía JAK/STAT no está del todo aclarada, parece que la primera media en la relación entre la vía de las integrinas y la señalización de IFN- γ regulando la activación de la vía JAK/STAT.

5. STAT EN CANCER Y LEUCEMIA

5.1. STAT y cáncer

La generación del cáncer es el resultado final de un proceso en el que se combinan múltiples eventos que llevan a una transformación de las células normales en células tumorales. Entre estos eventos se encuentra la pérdida por parte de las células de su capacidad para reparar el ADN, la pérdida de la capacidad para regular el ciclo celular y la apoptosis. Por otra parte, las células adquieren patrones anormales de respuesta frente a los estímulos generados por factores de crecimiento, la capacidad de generación de nuevos vasos sanguíneos y de un crecimiento invasivo. Aunque la vía JAK/STAT no contribuye directamente en la reparación del ADN ni actúa directamente en la regulación del ciclo celular, interviene en la oncogénesis debido a una disregulación de las vías de señalización en las que los STAT están implicados. En cambio los STAT tienen un efecto directo en la prevención de la apoptosis, así como en la señalización de diversos factores de crecimiento o en la angiogénesis. Por lo tanto, la falta de regulación de la vía JAK/STAT puede ser fundamental en la generación de diversos tumores por su implicación ya sea directa o indirecta en varios de los procesos fundamentales implicados en la oncogénesis (Bromberg 2002). Por otra parte, los componentes de

INTRODUCCION

la vía JAK/STAT juegan un papel importante en la respuesta inmune de modo que una señalización alterada por esta vía puede suponer un compromiso en la vigilancia inmunológica sobre tumores favoreciendo el desarrollo de los mismos.

5.2. STAT y leucemia

Entre las múltiples funciones biológicas en las que los STAT se han visto implicados se encuentran la hematopoyesis y la regulación de la función de las células hematopoyéticas en respuesta a diversas citocinas y factores de crecimiento. En este sentido, STAT3 y STAT5 son los principales miembros de la familia STAT que intervienen en el control de la hematopoyesis (*Smithgall, et al 2000*). STAT3 parece necesario para la diferenciación de las células de linaje mieloide mediada por las citocinas que comparten la cadena gp130 en su receptor (*Minami, et al 1996*). STAT5 también se ha implicado en la diferenciación mieloide (*Nosaka, et al 1999*) de modo que la actividad antiapoptótica de STAT5 es necesaria en las últimas fases de la diferenciación mieloide. Se requiere STAT5 para la diferenciación de los granulocitos promoviendo la supervivencia y la proliferación de los progenitores mieloides diferenciados.

Los primeros estudios que implicaron a la vía JAK/STAT en la génesis de leucemias se realizaron en *Drosophila melanogaster* que expresa proteínas homólogas de JAK (llamado *hop* y codificado por el locus *hopscotch*) y de STAT (denominado D-STAT y codificado por el gen *d-stat*). En *Drosophila melanogaster*, la mutación en el homólogo *hop*, denominada *hop^{Tum-1}* que lleva a la sustitución del residuo aminoacídico de la posición 341, causa un aumento en la función produciendo una proliferación clonal de plasmocitos similar a la leucemia humana (*Luo, et al 1995*). La proteína homóloga *hop* mutada hiperfosforilaba e hiperactivaba a D-STAT. La tumorigenicidad de *hop^{Tum-1}* era específica de tejido de modo que la expresión de la misma en otros tejidos no resultaba en la formación de tumores. Estos resultados obtenidos en *Drosophila* llevaron a pensar que la vía JAK/STAT podría estar igualmente disregulada en neoplasias hematológicas en humanos.

A continuación se detalla algunos de los aspectos más importantes de la implicación de los STAT en la patogénesis del cáncer, incluidas las leucemias.

INTRODUCCION

5.3. Activación constitutiva de los STAT

La duración de la activación de los STAT en condiciones fisiológicas es limitada durando entre unos pocos minutos a varias horas. Sin embargo, poco después del descubrimiento de los STAT se describió en varios estudios la activación constitutiva de estas proteínas en diversas líneas celulares derivadas de tumores así como en tumores primarios. Independientemente del mecanismo que lleve a la activación persistente de los STAT, la consecuencia que se desprende de este hecho es la continua regulación génica debido a una presencia constante del STAT activado en el núcleo. Puesto que los STAT están involucrados en numerosos procesos biológicos de gran importancia, la alteración permanente del programa genético de la célula tumoral debe tener un profundo impacto biológico.

La persistencia de la activación en tumores se ha visto principalmente en STAT1, STAT3 y STAT5 (Tabla I5.). De todos los miembros de la familia STAT, el que más frecuentemente se encuentra constitutivamente activado en el cáncer en humanos, parece ser STAT3 (*Buettner, et al 2002*).

Tabla I5. Activación de los STAT en líneas celulares tumorales y tumores primarios en humanos.

	Activated STAT
Blood tumors	
Multiple myeloma	Stat1, Stat3
Leukemias	
HIV-1-dependent	Stat3, Stat5
Erythroleukemia	Stat1, Stat5
Acute lymphocytic leukemia	Stat1, Stat5
Chronic lymphocytic leukemia	Stat1, Stat3
Acute myelogenous leukemia	Stat1, Stat3, Stat5
Chronic myelogenous leukemia	Stat5
Megakaryotic leukemia	Stat5
Large granular lymphocyte leukemia	Stat3
Lymphomas	
EBV-related/Burkitt's	Stat3
Mycosis fungoides	Stat3
HSV saimiri-dependent (T-cell)	Stat3
Cutaneous T-cell lymphoma	Stat3
Hodgkin's disease	Stat3
Solid tumors	
Breast cancer	Stat1, Stat3
SCCHN*	Stat1, Stat3
Renal cell carcinoma	Stat3
Melanoma	Stat3
Ovarian carcinoma	Stat3
Lung cancer	Stat3
Prostate carcinoma	Stat3
Pancreatic adenocarcinoma	Stat3

* SCCNH: Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck

Buettner R., et al. Clin Cancer Res, 2002,8:945-954.

INTRODUCCION

La activación constitutiva de los STAT3 en líneas celulares transformadas por la oncoproteína Src fue la primera evidencia del papel que dicha activación podía jugar en la oncogénesis (*Yu, et al 1995*). La evidencia genética del papel que STAT3 tenía en la transformación celular vino con la demostración de que la forma mutada denominada STAT3C capaz de dimerizar en ausencia de fosforilación en tirosinas y que por tanto estaba constitutivamente activada, era capaz de transformar fibroblastos en cultivo permitiéndoles formar tumores en ratón (*Bromberg, et al 1999*).

No se conoce que haya mutaciones de STAT3 que ocurran naturalmente y que lleven a su activación constitutiva y la subsiguiente transformación celular. En todos los tumores que se desarrollan de forma natural así como en las células transformadas por oncogenes, la activación de STAT3 es dependiente de sus correspondientes JAK kinasas o receptores de factores de crecimiento con actividad quinasa que se encuentran disregulados.

La primera evidencia del papel de los STAT en el cáncer en humanos viene de la demostración del requerimiento de la activación constitutiva de STAT3 para el crecimiento de células tumorales de cáncer de cabeza y cuello (*Grandis, et al 1998*). Posteriormente, la activación constitutiva de STAT3 se ha detectado en numerosas líneas celulares tumorales y cánceres. La activación constitutiva de STAT3, y también de STAT1, se ha visto en líneas celulares de tumores de mama y en extractos nucleares de carcinoma de mama humano pero no en líneas celulares derivadas de epitelio glandular mamario no maligno o tejido mamario sano (*García, et al 1997, Watson and Miller 1995*). El estímulo de IL-6 induce el crecimiento de líneas celulares tumorales y de ciertos tumores acompañándose de la activación constitutiva de STAT3 (*Catlett-Falcone, et al 1999, Sriuranpong, et al 2003*). En algunas líneas derivadas de cánceres de cabeza y cuello la señal responsable de la activación de STAT3 es la mediada por la señalización autocrina del TGF- α /EGFR (*Grandis, et al 1998*). La activación de STAT3 por Src también se ha visto en melanoma (*Niu, et al 2002a*). Además de en tumores sólidos, STAT3 se ha visto constitutivamente activado en numerosas leucemias y linfomas (*Sternberg and Gilliland 2004*).

Al igual que de STAT3, también se ha descrito la activación constitutiva de STAT5 en líneas celulares y en tumores, particularmente en leucemias y linfomas (*Benekli, et al 2003, Ward, et al 2000*). Al igual que en caso de STAT3, existen formas recombinantes de STAT5 que contienen mutaciones que generan una activación

INTRODUCCION

constitutiva induciendo proliferación celular independiente de la señalización por citocinas (*Onishi, et al 1998*).

STAT1 también se ha descrito constitutivamente activado en diversas líneas celulares tumorales y cánceres especialmente en los de estirpe sanguínea (*Aronica, et al 1996, Kirito, et al 2002, Weber-Nordt, et al 1996*).

5.3.1. Activación constitutiva por tirosina kinasas oncogénicas

Las tirosina kinasas se encuentran entre las proteínas oncogénicas más frecuentemente activadas en las células tumorales (*Levitzki 1999*). Por lo tanto, no resulta sorprendente que los STAT puedan llegar a estar persistentemente activados en numerosos cánceres debido a que la regulación de una o varias de las tirosina kinasas encargadas de su activación se encuentre alterada ya sea por causas genéticas o epigenéticas. Es por esto que la identificación de las tirosina kinasas (y en algunos casos de las serina kinasas) disreguladas que pueden llevar a una activación constitutiva de los STAT resulta importante en la implicación de éstos en la oncogénesis.

Puesto que las proteínas de la familia JAK son las principales tirosina kinasas implicadas en la activación de los STAT, la actividad anormalmente aumentada de éstas es el mecanismo más común en la activación constitutiva de los STAT. La translocación cromosómica t(9:12)(p24:p13) que se encuentra en pacientes con LLA (leucemia linfocítica aguda) (*Lacronique, et al 1997*) y en LMC (leucemia mieloide crónica) (*Peeters, et al 1997*) supone la translocación del brazo corto del cromosoma 9, que contiene el dominio kinasa JH1 de JAK2, al brazo corto del cromosoma 12 que contiene el dominio de oligomerización del factor de transcripción Tel. Esta translocación da como resultado una proteína de fusión denominada Tel-JAK2 que posee actividad kinasa constitutiva induciendo a su vez la activación constitutiva de los STAT y la transcripción génica dependiente de los mismos (*Ho, et al 1999*). La transfección en ratones con un retrovirus que expresa esta proteína quimérica induce un síndrome mixto linfó y mieloproliferativo fatal (*Schwaller, et al 1998*). El ratón transgénico Tel-JAK2 desarrolla una leucemia de células T en asociación con la activación constitutiva de STAT1 y STAT5 (*Carron, et al 2000*). Las proteínas de fusión formadas por Tel con cualquiera de las otras JAK kinasas comparte las mismas

INTRODUCCION

funciones que Tel-JAK2 en una línea hematopoyética murina dependiente de IL-3 (*Lacronique, et al 2000*).

Otra familia de tirosina kinasas implicadas en la activación constitutiva de los STAT es la de las Src kinasas. Se ha descrito la activación constitutiva de la proteína STAT3 en la línea fibroblástica murina NIH3T3 transformada por la tirosina kinasa oncogénica v-Src correlacionándose directamente su actividad con la transformación oncogénica inducida por Src (*Yu, et al 1995*). La capacidad de transformación era suprimida por mutantes dominantes negativos de STAT3 demostrando que la activación constitutiva de STAT3 es necesaria en la transformación celular por la oncoproteína Src (*Bromberg, et al 1998, Turkson, et al 1998*). Por otra parte, se ha demostrado que JAK1 colabora con Src para activar STAT3 en la línea celular NIH3T3 sugiriendo que reclutaría STAT3 hacia Src antes de la fosforilación y activación de STAT3 por esta oncoproteína (*Bowman, et al 2000*). En líneas celulares humanas derivadas de carcinoma de vesícula biliar y de células epiteliales mamarias la oncoproteína v-Src también es capaz de activar constitutivamente STAT3 (*Murakami, et al 1998, Smith and Crompton 1998*).

Aunque seguramente la activación de STAT3 es sólo una de la muchas vías requeridas para la transformación por la kinasa Src, resulta significativo que únicamente con la disrupción de STAT3 se bloquea la transformación celular. Probablemente la activación de STAT3 contribuye en la oncogénesis generando cambios permanentes en el programa genético requeridos para la iniciación o el mantenimiento de la transformación (*Bowman, et al 2000*). Otro kinasa relacionada con la familia Src cuya expresión se ha visto aumentada en tumores, concretamente en el linfoma de células T, es la proteína Lck. Esta sobreexpresión está asociada con la activación tanto de JAK kinasas (JAK1 y JAK2), como de STAT (STAT3 y STAT5) (*Yu, et al 1997*).

La familia de las kinasas Abl (*Abelson leukemia protein*) también está implicada en la activación constitutiva de los STAT. En linfocitos pre-B transformados por la tirosina kinasa oncogénica v-Abl se observa una activación constitutiva de STAT1 y STAT5 (*Danial, et al 1995*) requiriendo esta oncoproteína de la asociación física con JAK1 para ejercer su acción. De hecho, la ausencia en Abl del dominio de interacción con JAK1 da lugar a un fallo en la

INTRODUCCION

acción de esta kinasa y no se produce el crecimiento celular independiente de factores ni se inducen tumores en ratón (*Daniel, et al 1998*).

La translocación t(9;22), conocida como cromosoma Filadelfia, genera una proteína de fusión entre BCR (*Breakpoint Cluster Region*) y Abl que está presente en prácticamente todos los pacientes con LMC encontrándose constitutivamente activada y resultando esencial para la progresión de este tipo de neoplasia hematológica (*Pendergast, et al 1991*). Además de en LMC, la presencia de BCR-Abl también se ha visto en pacientes con LLA y en LNC (leucemia neutrofílica crónica). En líneas celulares que expresan la proteína de 210 kDa producto de este oncogén se ha visto que STAT5, y en menor medida STAT1 y STAT3, presentan una fosforilación en residuos tirosina y una unión a ADN incrementada (*Ilaria and Van Etten 1996*). Otra proteína de 190 kDa generada por este oncogen además de activar a los anteriores STAT también activa STAT6. La activación de los STAT por BCR-Abl en líneas hematopoyéticas no requiere de la presencia de JAK kinasas constitutivamente activadas (*Carlesso, et al 1996*). En cambio, recientemente se describió el requerimiento de kinasas de la familia Src, concretamente la kinasa Hck, en la fosforilación de STAT5 por BCR-Abl en células mieloides (*Klejman, et al 2002*).

La interacción entre BCR-Abl y STAT5 se ha demostrado mediante estudios mutacionales en los que se ha visto que la delección del dominio SH2 de BCR-Abl junto con la delección o mutación en su dominio SH3 provoca una abolición en la activación de STAT5 y un fallo en la protección frente a la apoptosis (*Klejman, et al 2002*). Otros trabajos en los que el uso de dominantes negativos de STAT5 o inhibidores selectivos de la proteína BCR-Abl en líneas transformadas por este oncogén, disminuye el crecimiento celular y la viabilidad y aumenta la sensibilidad a agentes quimioterápicos demuestran que la implicación de STAT5 en la transformación celular inducida por BCR-Abl es esencial (*de Groot, et al 1999, Huang, et al 2002*). Sin embargo, en leucemias murinas inducidas BCR-Abl no se requiere de la presencia de STAT5 probablemente porque éste no tiene un papel crítico en la hematopoyesis aunque sí que puede tener cierta importancia en el control de la proliferación de las células de estirpe mieloide.

Otras tirosina kinasas se han implicado en la activación constitutiva de los STAT. La activación de la tirosina kinasa Flt3 asociada a duplicaciones del

INTRODUCCION

dominio yuxtamembrana o mutaciones puntuales en el lugar de activación se ha observado en pacientes con LMA (leucemia mieloide aguda) asociándose además a un mal pronóstico de la enfermedad (*Kottaridis, et al 2001*). Estas mutaciones de Flt3 se asocian con un incremento en fosforilación en tirosina y unión a ADN de STAT5 resultando en un papel crítico de STAT5a en la proliferación de células hematopoyéticas murinas dependiente de Flt3. Apoyando la relación entre Flt3 y STAT5, el uso de un inhibidor específico de esta tirosina kinasa bloquea la señal a través de STAT5 en pacientes con LMA (*Levis, et al 2002*).

Otras oncoproteínas como v-Sis, v-Fps, v-Ros, Etk y Etk/BMX se han visto capaces de activar diversos miembros de la familia STAT en diversos modelos celulares, fundamentalmente STAT3 en líneas celulares fibroblásticas, aunque el perfil de los STAT activados por una oncoproteína dada depende de diversos factores como la especificidad de la misma así como del tipo celular estudiado (*Bromberg 2002*).

Los receptores de factores crecimiento con actividad kinasa también se han implicado en la activación constitutiva de los STAT en la tumorigénesis. En células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello pero no en células epiteliales normales se observa una sobre expresión del receptor de EGF (*Song and Grandis 2000*) de modo que el crecimiento y transformación de células epiteliales tras la unión con su ligando, TNF- α , es dependiente de la activación de STAT3. La interrupción de esta vía de señalización con el empleo de dominantes negativos de STAT3 suprime el crecimiento dependiente de TNF- α de estas células (*Grandis, et al 1998*). En cánceres de mama la activación de STAT3 también depende de la actividad aberrante del recetor EGF además de JAK y c-Src (*Garcia, et al 2001*).

La señalización del HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) a través de su receptor, una tirosina kinasa transmembrana producto del oncogene c-Met se asocia en cooperación con Src con la transformación en células de leiomiomas así como en células de cáncer de mama (*Zhang, et al 2002b*).

La expresión de la forma mutada de c-Kit, otro receptor con actividad tirosina kinasa, causa la fosforilación y unión a ADN de STAT3 provocando la supervivencia y crecimiento en ausencia de factores de crecimiento de las células leucémicas humanas (*Ning, et al 2001*).

INTRODUCCION

Otros receptores como el de IGF en la línea fibroblástica murina NIH3T3 (Zong, *et al* 1998), el receptor Ret en cáncer de tiroides (Schuringa, *et al* 2001) también producen la activación constitutiva de STAT3.

Con respecto al receptor de PDGF en la LMMC (leucemia mielomonocítica crónica), la translocación t(5;12) produce una proteína de fusión entre el dominio de unión a ADN de la proteína Tel y el dominio citoplasmático del receptor β de PDGF (PDGF β R). La proteína de fusión Tel-PDGF β R produce la activación de STAT5 que en colaboración con la PI (Phosphoinositol) 3-kinasa y PL (Phospholipase) C- γ produce la transformación en varios modelos de LMMC (Sternberg, *et al* 2001, Tomasson, *et al* 2000). La proteína de fusión Hip (Huntingtin interacting protein) 1-PDGF β R generada por la translocación t(5;7) en LMMC también causa fosforilación y unión a ADN de STAT5 (Ross and Gilliland 1999).

Por ultimo, una delección en el cromosoma 17 en pacientes con leucemia promielocítica aguda produce una proteína de fusión entre el receptor del ácido retinóico y STAT5b (RAR α -STAT5b) y que resulta de interés puesto que es la primera proteína de fusión en la que un STAT participa directamente (Arnould, *et al* 1999).

5.3.2. Otros mecanismos de activación constitutiva

Como se ha visto anteriormente la familia SOCS comprende un grupo de proteínas inducibles por el estímulo de diversas citocinas que actúan regulando la vía JAK/STAT mediante la unión e inhibición de las JAK kinasas. Alteraciones en estas proteínas pueden estar relacionadas con la tumorigénesis. Se ha visto que una delección en el brazo corto del cromosoma 16 que contiene el gen que codifica para SOCS1 aparece en la mitad de los pacientes con carcinoma hepatocelular primario (Koyama, *et al* 1999). Resulta interesante que en líneas celulares derivadas de carcinoma hepatocelular (Yoshikawa, *et al* 2001), así como en mieloma múltiple y LMA, la supresión inducida por metilación del gen que codifica SOCS1 produce una activación constitutiva de STAT3 (Chen, *et al* 2003a, Galm, *et al* 2003).

Estos datos abren la posibilidad de que la inactivación del gen *socs1* pueda participar en la génesis de hepatocarcinomas y más generalmente que los

INTRODUCCION

reguladores negativos de la vía JAK/STAT puedan jugar un papel importante en el control de la progresión de tumores.

La familia PIAS comprende otro grupo de proteínas que interviene en la regulación de la vía JAK/STAT, en este caso interactuando con los STAT. Concretamente se ha visto que en el linfoma anaplásico de células grandes la proteína PIAS3 esta regulada a la baja siendo en parte responsable del mantenimiento de altos niveles de STAT3 activado (Zhang, et al 2002a).

Por otra parte se ha implicado a miembros de la familia PIAS en la señalización por estrógenos y andrógenos (Wang, et al 2001). La activación de STAT3 por IL-6 tiene un papel muy importante en mieloma múltiple. En estas células, cuando son tratadas previamente con estrógenos, se produce un incremento en la síntesis de PIAS3 debido a la estimulación del receptor de estrógenos. PIAS3 se une al STAT3 activado por IL-6 de modo que bloquea la unión de STAT3 a ADN. Dada la importancia de IL-6 en el mieloma múltiple, la interacción entre el receptor de estrógenos, PIAS3 y STAT3 podría tener un papel crítico en la progresión de esta enfermedad teniendo además posibles implicaciones terapéuticas.

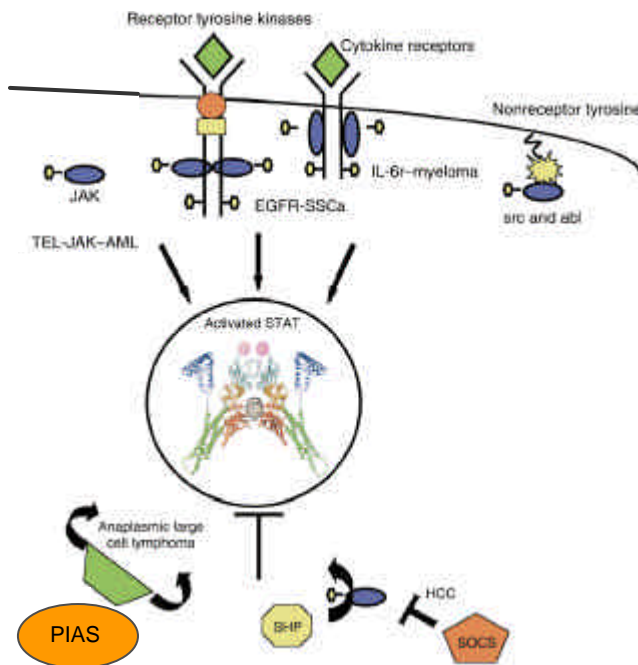


Figura 17. Rutas de activación constitutiva de los STAT en cáncer. Los STAT, especialmente STAT3, están persistentemente activados en numerosos tumores. Los mecanismos de activación son diversos. La proteína de fusión Tel-JAK2 actúa como kinasa y activa STAT1, STAT3 y STAT5 en LMA. La sobre expresión y disregulación del receptor EGFR y su ligando TNF- α estimula la actividad kinasa intrínseca del receptor llevando a la activación constitutiva de STAT3 en carcinoma de células escamosas. La sobre expresión y disregulación del receptor de IL6 y su ligando IL6 estimulan la actividad de STAT3 en mieloma múltiple. La regulación anormal de las oncoproteínas Src y Abl llevan a una fosforilación constitutiva de STAT3 en sarcomas y LMC entre otros tumores. La inhibición de SOCS1 debida a metilación activa constitutivamente a STAT3 en carcinomas hepatocelulares. La pérdida de la expresión de PIAS3 da lugar a una actividad disregulada de STAT3 en linfoma anaplásico de células grandes.

Basado en: Bromberg J. *J Clin Invest*, 2002, 109 (9):1139-1142.

INTRODUCCION

En cuanto al papel de la fosforilación en residuos serina en la oncogénesis no está del todo aclarado. La fosforilación en el residuo serina se requiere para la máxima capacidad transcripcional de algunos STAT como es el caso de STAT3. Cuando se usan dominantes negativos de STAT3 en el que la serina 727 ha sido sustituida o se inhibe la proteína p38, una serina kinasa que media en la fosforilación de la serina en STAT3, se bloquea la fosforilación en serina y también la señalización por STAT3, de modo que la transformación celular inducida por Src es suprimida (*Bromberg, et al 1998, Turkson, et al 1998*). En este caso, la fosforilación en residuos tirosina en STAT3 no es suficiente para el papel que éste tiene en el caso de la oncogénesis inducida por Src.

La fosforilación constitutiva en residuos serina pero no en tirosinas se ha visto en pacientes con LLC-B (*Frank, et al 1997*) y en linfomas (*Nielsen, et al 1997*). Sin embargo el papel de la fosforilación constitutiva no está aclarado ya que cuando los pacientes con LLC-B son tratados con briostatina 1 que induce la diferenciación de las células tumorales, no se ve afectada la fosforilación constitutiva del residuo serina (*Battle and Frank 2003*).

5.4. Genes regulados por los STAT implicados en la oncogénesis

En la transducción de señales, la transmisión del estímulo desde la superficie celular hasta el núcleo implica la puesta en marcha de programas genéticos específicos que permiten a la célula responder apropiadamente al estímulo recibido. En las células normales los mecanismos de transducción de señales están altamente regulados para permitir una expresión génica correcta e impedir respuestas biológicas inapropiadas. Sin embargo, la expresión de genes dependiente de la activación constitutiva de los STAT puede contribuir en la oncogénesis induciendo la expresión elevada de genes clave para iniciar o mantener la transformación celular. La dependencia de uno u otro STAT para regular los genes que controlan la proliferación y la supervivencia varía entre los distintos tipos de tumores debido a las diferencias en la interacción entre los STAT y las proteínas implicadas así como con otros factores de transcripción (*Yu and Jove 2004*).

Son numerosos los estudios y los genes regulados por los STAT implicados en la formación de tumores. En las siguientes secciones se discuten los principales genes involucrados en la oncogénesis en los que se ha visto una implicación

INTRODUCCION

directa de los STAT, bien porque regulan la progresión del ciclo celular o la apoptosis.

5.4.1. Oncogenes implicados en la progresión del ciclo celular

En los tejidos normales, la proliferación celular es controlada por una entrada de manera irreversible en un estado post-mitótico de diferenciación. Las células tumorales escapan de esta diferenciación terminal que está regulada, al menos en parte por la proteína codificada por el gen *c-myc* (Yu and Jove 2004). El gen *c-myc* está sobre expresado en numerosas neoplasias humanas (Dang, et al 1999). En la regulación transcripcional de *c-myc* en respuesta al estímulo a través de la cadena gp130 es necesaria la función de STAT3. Los niveles ARN mensajero de *c-myc* están elevados en líneas fibroblásticas murinas que expresan STAT3C (Bromberg, et al 1999). La expresión de *c-myc* inducida por STAT3 es necesaria para la transformación por Src en fibroblastos murinos y en la mitogénesis inducida por PDGF en células normales (Bowman, et al 2001).

STAT5 también está implicado en la regulación del gen *c-myc*. En líneas celulares linfoides, STAT5 a través del estímulo por el receptor de IL-2 induce la expresión de varios genes implicados en la proliferación celular entre ellos *c-myc* (Lord, et al 2000). La inhibición de la señalización vía BCR-Abl y STAT5 producida por un inhibidor selectivo de BCR-Abl produce una inhibición del crecimiento que se correlaciona con la regulación negativa de *c-myc* (Huang, et al 2002).

La regulación de la progresión en el ciclo celular depende de la formación y activación de complejos específicos entre las ciclinas y las kinasas CDK (Cyclin Dependent Kinase). En numerosas neoplasias se ha detectado la alteración en la expresión de estas proteínas y en algunos casos, esta alteración es debida a la activación constitutiva de diversos STAT. La expresión de la ciclina D1 que se asocia a CDK4 y CDK6 y que controla la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular, esta elevada en las células que expresan STAT3C (Bromberg, et al 1999). Los niveles del ARN mensajero y de la proteína ciclina D1 están incrementados en fibroblastos murinos transformados por v-Src y en líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello de modo que su expresión es

INTRODUCCION

bloqueada por un dominante negativo de STAT3 (*Masuda, et al 2002, Sinibaldi, et al 2000*).

El estudio empleando dominantes negativos en distintos modelos celulares han implicado también a STAT5 en la regulación de las ciclinas D1 y D2 (*de Groot, et al 2000*).

La proteína p21^{waf1} es un inhibidor de kinasas CDK que ha sido asociada normalmente con la detención del ciclo celular y cuyo promotor contiene lugares de unión para STAT1 y para STAT3. Sin embargo en fibroblastos murinos transformados por v-Src en los que STAT3 está activado, los niveles de ARN mensajero y de proteína de p21^{waf1} están incrementados en comparación con los fibroblastos no transformados (*Sinibaldi, et al 2000*). Además en varios estudios se ha observado que los niveles de p21^{waf1} están elevados en varios tumores en humanos (*Barboule, et al 1998, Pindzola, et al 1998*). Esta aparente contradicción en la función de p21^{waf1} puede explicarse por el hecho que además de su función inhibitoria en el crecimiento, p21^{waf1} también juega un papel esencial promoviendo el ensamblaje ciclina D1-CDK. Por lo tanto, en las células transformadas por v-Src que proliferan más rápidamente que las no transformadas, el incremento coordinado de p21^{waf1} y la ciclina D1 puede ser esencial en la progresión del ciclo celular (*Bowman, et al 2000*).

La proteína p53 es considerada el inhibidor de la proliferación celular e inductor de la apoptosis más difundido por su capacidad de integrar las señales provenientes de diversas fuentes para activar numerosos genes que son cruciales en la detención del crecimiento y en la apoptosis (*Slee, et al 2004, Vogelstein, et al 2000*). Tanto en el crecimiento normal como en oncogénesis, STAT3 puede regular negativamente la expresión del gen *TP53* (cromosoma 17p13.1) que codifica para la proteína p53. En este sentido, la función de p53 en células tumorales puede ser restaurada inhibiendo la señalización de STAT3. Esto podría dar explicación al hecho de por qué tanto el crecimiento normal como el desarrollo de tumores pueden producirse sin mutaciones en p53 o en proteínas que interaccionan con ella (*Yu and Jove 2004*).

INTRODUCCION

5.4.2. Oncogenes implicados en la apoptosis

Los genes de la familia Bcl2 juegan un papel central en los mecanismos de apoptosis por lo que no resulta extraño que el fallo en la regulación de algunas de las proteínas de esta familia esté implicado en la alteración de los mecanismos de apoptosis en el cáncer.

Son varios los estudios que han demostrado que la proteína antiapoptótica de la familia Bcl2 codificada por el gen *bcl-x_L* es diana de la acción de STAT3 y STAT5. El aumento en la expresión de *bcl-x_L* en células de mieloma múltiple y de carcinoma escamoso de cabeza y cuello es dependiente de la activación constitutiva de STAT3 de modo que la inhibición de la señalización por STAT3 bloquea la expresión de *bcl-x_L* en estas células sensibilizándolas a la apoptosis (Catlett-Falcone, et al 1999, Grandis, et al 2000). El empleo de inhibidores de tirosina kinasas en fibroblastos murinos transformados con v-Src disminuyen la expresión de *bcl-x_L* inducida por v-Src de una manera dependiente de STAT3 (Karni, et al 1999). STAT5 puede conferir resistencia a la apoptosis en parte por una regulación positiva de *bcl-x_L* (Socolovsky, et al 1999). El bloqueo de la actividad de BCR-Abl suprime la expresión *bcl-x_L* dependiente de la actividad de STA5 e induce la apoptosis en células de LMC (Horita, et al 2000).

Otro gen antiapoptótico de la familia Bcl2 regulado por los STAT es *Mcl-1*. En la leucemia de linfocitos grandes granulares existe una activación constitutiva de STAT3 y JAK2 (Epling-Burnette, et al 2001). Cuando se bloquea la expresión de STAT3 o su función, se produce la muerte de las células tumorales debido a una regulación positiva de la proteína proapoptótica Fas y una regulación negativa de *Mcl-1*. En células de pacientes con LMC, es la activación constitutiva de STAT5 la que regula la sobre expresión de *Mcl-1* de modo que el tratamiento con un inhibidor de STAT5, produce la regulación negativa de *Mcl-1* (Huang, et al 2002).

La activación constitutiva de los STAT también produce la expresión de otros genes antiapoptóticos. En el caso de STAT3 se ha observado que induce la expresión de la survivina, un miembro de la familia IAP (Aoki, et al 2003). La activación constitutiva de STAT5 también se asocia a un aumento de la

INTRODUCCION

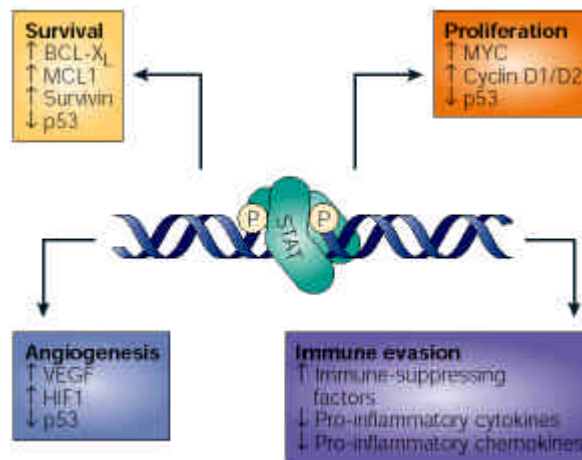
expresión de la serina-treonina kinasa pim-1 y el gen antiapoptótico A1 (*Aoki, et al 2003, Nieborowska-Skorska, et al 2002*).

5.4.3. Otros genes implicados en la oncogénesis

La capacidad intrínseca de proliferar descontroladamente y de resistir a la apoptosis son características a menudo requeridas pero no suficientes para el desarrollo de tumores. La formación de nuevos vasos o angiogénesis juega un papel crucial en la formación de los tumores. Las células tumorales producen niveles aumentados de VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*), uno de los más potentes inductores de angiogénesis. Recientemente se ha visto que STAT3 es un factor de transcripción que activa el gen de VEGF (*Niu, et al 2002b*). La forma constitutivamente activada de STAT3, STAT3C es suficiente para incrementar la expresión de *vegf* e inducir angiogénesis *in vivo*. Así, cuando se bloquea la señalización de STAT3, se inhibe la regulación positiva inducida por IL-6 (*Wei, et al 2003*).

La habilidad de los tumores para evadir al sistema inmune no se ha considerado una característica principal en el cáncer a pesar de los avances en el campo de la inmunología tumoral (*Pardoll 2003*). Recientemente se ha descrito que la activación constitutiva de STAT3 en tumores inhibe la producción de señales proinflamatorias de modo que el bloqueo de la señal de STAT3 en estas células aumenta la producción de citocinas proinflamatorias activando la respuesta inmune frente al tumor (*Wang, et al 2004*). La maduración de las células dendríticas que suponen el punto de unión crucial entre la inmunidad innata y la adaptativa está afectada en ciertos tumores llevando a una cierta situación de tolerancia frente al mismo. El bloqueo de la señal de STAT3 en ciertos tumores suprime la inhibición en la maduración de las células dendríticas mediada por el tumor (*Yu and Jove 2004*).

INTRODUCCION



Yu H. and Jove R. *Nat Rev Cancer*, 2004 4(2):97-105.

Figura 18. Control del crecimiento celular y la apoptosis por los STAT. En la progresión tumoral están involucradas la capacidad por parte de las células tumorales de proliferación incontrolada, de resistir a la apoptosis, de generar nuevos vasos y de escapar de la vigilancia del sistema inmune. Los STAT regulan directa o indirectamente genes que intervienen en proliferación, apoptosis, angiogénesis y en la respuesta inmune facilitando la génesis o progresión de numerosos tumores.

5.4.4. STAT1 como supresor tumoral

Como hemos visto hasta ahora, hay numerosas evidencias de la implicación de miembros de la familia STAT, fundamentalmente STAT3 y STAT5, en la génesis y progresión de diversos tipos de tumores regulando de forma directa o indirecta genes implicados, sobre todo en la progresión en el ciclo celular y en la apoptosis, facilitando la proliferación de las células tumorales y la resistencia de éstas a las señales de muerte. Respecto a STAT1, este factor de transcripción se ha considerado como un supresor tumoral puesto que inhibe el crecimiento celular y actúa como un factor inductor de apoptosis (*Bromberg 2002, Calo, et al 2003*). Se requiere de STAT1 para la señalización por parte de los interferones que además de su importante papel en la inmunidad innata, son potentes inhibidores del crecimiento y promotores de la apoptosis. Aunque el ratón *stat1*^{-/-} no desarrolla de manera espontánea tumores, tiene una elevada susceptibilidad a la tumorigénesis inducida por agentes químicos. Cuando se genera un tumor por el tratamiento con agentes carcinógenos en un ratón normal y se transplanta a un ratón *stat1*^{-/-}, crece más rápidamente que cuando se hace sobre un ratón normal. El ratón deficiente en STAT1 y p53

INTRODUCCION

desarrolla un más amplio espectro de tumores y más rápidamente que el ratón deficiente únicamente en p53 (*Kaplan, et al 1998a*). Estos datos en conjunto, indican que STAT1 está implicado en la vigilancia tumoral y que la pérdida de STAT1 favorece la oncogénesis.

La involucración de STAT1 en la detención del crecimiento celular y en la apoptosis en numerosos tipos celulares ha sido explicada por su capacidad de regular positivamente las caspasas y el inhibidor de kinasas CDK, la proteína p21 (*Bromberg, et al 1996, Lee, et al 2000*). Como hemos visto, la proteína p21 contiene lugares de unión para STAT1 y para STAT3 y aunque se ha observado que los niveles de p21 están elevados en varios tumores en humanos, su expresión se asocia normalmente con la detención en el ciclo celular.

En el cáncer de mama, en la activación de p21 por STAT1 también está implicada la proteína BRCA1 que es un supresor tumoral importante en el carcinoma hereditario de mama. BRCA1 contribuye sinérgicamente con STAT1 en la transcripción de p21^{waf1} por medio de la interacción entre los aminoácidos 502-802 de BRCA1 y el dominio de transactivación de STAT1 que contiene el residuo serina importante para la actividad transcripcional de STAT1 y en el reclutamiento de moléculas coestimuladoras (*Ouchi, et al 2000*). La mutación de STAT1 causa un defecto en la unión de STAT1 con BRCA1 que puede tener consecuencias en la vigilancia tumoral dependiente de IFN- γ .

Por otra parte, STAT1 puede actuar en respuesta a IFN- γ y a PDGF disminuyendo la expresión de c-myc favoreciendo de esta manera la detención del crecimiento (*Ramana, et al 2000*). La forma no fosforilada de STAT1 también es capaz de regular la expresión génica suprimiendo entre otras la expresión del gen antiapoptótico *bcl-x_L* (*Chatterjee-Kishore, et al 2000*).

Pero determinar si la función de STAT1 está deteriorada en tumores primarios *in vivo* no resulta fácil donde la función de señalización depende del ambiente en donde se produce. Sin embargo, no sería sorprendente encontrar mutaciones de STAT1 en tumores humanos. Determinar si las mutaciones de STAT1 que se han observado en familias con una susceptibilidad heredada a infecciones por micobacterias también llevan a un incremento en el riesgo de padecer cáncer podría esclarecer el papel de STAT1 en la génesis de tumores.

Aunque STAT1 parece jugar un papel importante en la inhibición del crecimiento, se ha visto que está activado en diversos tumores. La activación de STAT1 suele ocurrir conjuntamente con la activación de STAT3 y STAT5. Sin

INTRODUCCION

embargo la activación simultánea de STAT1 con otros STAT tiene efectos distintos en distintos tipos celulares. Por ejemplo, en células escamosas tumorales el estímulo por parte del receptor de EGF produce la activación constitutiva de STAT1 y STAT3 de modo que los efectos de uno y otro son distintos (*Grandis, et al 1998*). La inhibición de STAT3 ocasiona inhibición en el crecimiento mientras que la inhibición de STAT1 no tiene ningún efecto sobre la proliferación. La pregunta que surge es por qué la activación de STAT1 no previene la oncogénesis en aquellos tumores en los que se ha detectado. Una posibilidad es que los efectos proliferativos de los otros STAT activados, STAT3 y STAT5, podrían predominar sobre los efectos antiproliferativos de STAT1 (*Bowman, et al 2000*).

Al igual que STAT1, STAT6 ha sido involucrado en la oncogénesis, teniendo un papel en la inhibición del crecimiento y en la inducción de la apoptosis (*Gooch, et al 2002*). En líneas celulares derivadas de cáncer de mama, la expresión de STAT6 origina una inhibición de la proliferación y una inducción de la apoptosis. Por otra parte, la deficiencia de STAT6 se ha observado que está asociada con un incremento en la inmunidad frente a tumores. En este incremento de la vigilancia frente a tumores en el ratón *stat6*^{-/-} se ha implicado a linfocitos T y parece dependiente de IFN- γ (*Ostrand-Rosenberg, et al 2002*).

5.5. STAT como diana terapéutica en cáncer

Por todo lo visto anteriormente, la señalización aberrante de la vía JAK/STAT contribuye a una alteración permanente de programa genético que en última instancia lleva a la génesis y progresión del cáncer. Puesto que las proteínas STAT están involucradas en la regulación de procesos biológicos fundamentales la intervención terapéutica sobre la vía de señalización de los STAT en los tumores en cuyo crecimiento están implicados estos factores de transcripción resulta lógica. Para ser una diana terapéutica ideal en el tratamiento del cáncer, una molécula debe cumplir una serie de requisitos. En primer lugar debe estar hiperactiva en un porcentaje elevado de células en diferentes tipos de tumores de modo que esta actividad determina la expresión génica de patrones en los que no sólo se facilita la proliferación y la supervivencia de las células tumorales sino que también se promueve otras propiedades tumorales como son la angiogénesis y la evasión del sistema inmune. Otra característica de una buena diana terapéutica debe ser la

INTRODUCCION

susceptibilidad a la inhibición específica por drogas consistentes en moléculas de relativamente pequeño tamaño. Además, esta sensibilidad debe ser mayor en las células tumorales que deben ser más dependientes de la molécula diana que las células normales. En este sentido, STAT3 cuya deficiencia en el ratón resulta letal por su necesidad crítica en la embriogénesis no resulta fundamental en numerosos tipos celulares no tumorales en los que se ha delecionado selectivamente STAT3 y que muestran una buena proliferación y supervivencia tanto *in vivo* como *in vitro* (Akira 2000). Sin embargo, la inhibición selectiva de STAT3 en numerosos tumores lleva a una detención del crecimiento y una inducción de la apoptosis (Bowman, et al 2001, Catlett-Falcone, et al 1999, Garcia, et al 2001, Niu, et al 2002a, Turkson, et al 2001). Una explicación de esta sensibilidad a la apoptosis de las células tumorales respecto a las células normales puede ser la dependencia irreversible por parte de las primeras de altos niveles de STAT activados para mantener su supervivencia mientras que las segundas son capaces de mantenerse con bajos niveles de STAT o de usar vías alternativas para su crecimiento y supervivencia (Yu and Jove 2004). Por todo esto, los STAT pueden ser una óptima diana terapéutica en cáncer.

Son muchas y variadas las aproximaciones terapéuticas en cáncer tal y como se detalla a continuación, que se han explorado teniendo como diana de manera directa o indirecta a los STAT.

Una de las aproximaciones ha consistido en el bloqueo de la activación autocrina y paracrina de receptores de citocinas y factores de crecimiento que lleva a la activación de los STAT y que participan en la progresión de diversos tumores. Este bloqueo se realiza mediante la generación de antagonistas de las citocinas o factores de crecimiento o el uso de anticuerpos que neutralizan la interacción del ligando con su receptor. Por ejemplo, la progresión del mieloma múltiple depende de la señalización de IL-6 y el uso de una molécula antagonista de IL-6 denominada Sant7 produce una significativa reducción de la unión de STAT3 en estas células tumorales inhibiendo su proliferación (Catlett-Falcone, et al 1999, Dalton and Jove 1999). Los anticuerpos neutralizantes como el caso de los anticuerpos anti-EGFR se han usado diversos tipos de tumores que expresan estos receptores (Baselga 2000).

La activación constitutiva de los STAT en tumores depende principalmente, como hemos visto, de la acción de diversas tirosina kinasas. El aumento de la

INTRODUCCION

expresión o de la actividad kinasa de JAK kinasas, Src, Abl, BCR-Abl, Flt3 esta asociada con numerosos tumores humanos de modo que su bloqueo produce la inhibición de la proliferación y a la apoptosis de las células tumorales. Por lo tanto, la inhibición de estas kinasas también es uno de los posibles mecanismos de acción terapéutica en el tratamiento del cáncer llevando a una inhibición del crecimiento e inducción de la muerte celular. Los inhibidores de la actividad tirosina kinasa del receptor de EGF han mostrado actividad antitumoral en distintos tipos de neoplasias (Lin, et al 2002, Vincent, et al 2000). El empleo de inhibidores selectivos de la kinasa BCR-Abl bloquea la señalización de STAT5 acompañándose de inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis en tumores sólidos así como en leucemias como LMC (Druker, et al 2001, Huang, et al 2002). También se ha empleado inhibidores de la tirosina kinasa Flt3 en leucemias como LMA donde se observa un bloqueo de la activación de los STAT y un efecto citotóxico asociado (Weisberg, et al 2002). La tirfostina AG490 que posee actividad contra JAK2 se ha usado en diversos tipos de tumores especialmente leucemias. En células leucémicas de pacientes con LLA el tratamiento con AG490 inhibe la proliferación sin tener efectos adversos en la hematopoyesis normal (Meydan, et al 1996). En modelos de mieloma múltiple, el tratamiento con AG490 bloquea la activación de STAT3, bloqueando su unión a ADN, inhibiendo la proliferación e induciendo apoptosis (Catlett-Falcone, et al 1999). Líneas celulares leucémicas tanto de estirpe B como T, incluyendo las que contienen la translocación 11q23 y el cromosoma Filadelfia, son sensibles al tratamiento con AG490 (Miyamoto, et al 2001). En la leucemia de linfocitos grandes granulares el tratamiento con AG490 reduce significativamente la expresión del gen antiapoptótico *Mcl-1* (Epling-Burnette, et al 2001).

Además, el tratamiento conjunto con diversos inhibidores de tirosina kinasas entre sí o con otras moléculas puede tener efectos antitumorales sinérgicos. En líneas celulares con actividad BCR-Abl el tratamiento conjunto con STI571, un inhibidor de la actividad kinasa de BCR-Abl, y con AG490 tiene un efecto sinérgico (Sun, et al 2001). En pacientes con LMC en fase crónica la combinación de STI571 y AG490 tiene un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación celular (Marley, et al 2002). El tratamiento en combinación entre AG490 e IL-12, cuyo papel en el efecto antitumoral de los macrófagos e IFN- γ resulta importante, exhibe mayores efectos antitumorales que el uso de cada agente por separado (Burdelya, et al 2002).

Además de la actividad tirosina kinasa, la actividad serina kinasa elevada también está asociada con la oncogénesis (Frank 1999), de modo que una

INTRODUCCION

fosforilación constitutiva en residuos serina en STAT1 y STAT3 se ha visto en paciente con LLC-B (*Frank, et al 1997*). En relación con esto, el bloqueo de la fosforilación en el residuo serina de STAT3 en fibroblastos transformados con la oncoproteína Src inhibe su crecimiento (*Turkson, et al 1999*).

Otras de las aproximaciones terapéuticas en el tratamiento del cáncer es la que consiste en interferir en la unión de los STAT al ADN utilizando distintas aproximaciones.

Las moléculas coactivadoras de los STAT juegan un papel muy importante garantizando una correcta unión de éstos al ADN para que ejerzan correctamente su actividad transcripcional. Por lo tanto el uso de moléculas pseudocoestimuladoras con una alta afinidad por los STAT que compitan con los coestimuladores naturales, puede ser otro mecanismo de intervención terapéutica en el cáncer. El problema es que estas moléculas coestimuladoras en muchos casos tiene otras funciones conocidas de modo que el uso de antagonistas podría no tener un efecto enteramente específico sobre la señalización de los STAT (*Yu and Jove 2004*).

Otra aproximación terapéutica que actúa directamente sobre los STAT es la utilización de pequeñas moléculas que interfieren sobre la unión de éstos al ADN. Entre estas moléculas se encuentran los oligonucleótidos señuelo que consisten en pequeños fragmentos de ADN sintético que contienen la secuencia del lugar de unión conocido del STAT diana de modo que se une a éste y lo secuestra funcionalmente. Esta estrategia se ha empleado en células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, de modo que la inhibición de STAT3 mediante un oligonucleótido señuelo bloquea el crecimiento de las células cancerosas (*Leong, et al 2003*).

Además de este tipo de oligonucleótidos, también se han usado oligonucleótidos antisentido que bloquean específicamente la expresión de los transcritos ARN mensajeros de los STAT en diversos tipos de tumores y leucemias llevando a una detención del crecimiento celular y un aumento de la apoptosis (*Epling-Burnette, et al 2001, Grandis, et al 1998, Mora, et al 2002*).

Recientemente se ha empleado la tecnología de los siRNA (*small interfering RNA*) para bloquear la activación constitutiva de STAT3 en varias líneas celulares provenientes de astrocitomas (*Konnikova, et al 2003*).

INTRODUCCION

Otra de las formas de actuación terapéutica directa sobre los STAT es el empleo de dominantes negativos. Existen formas truncadas de diversos STAT que pueden actuar ejerciendo una función inhibitoria en la señalización. En el desarrollo de secciones anteriores se ha comentado como el uso de estos dominantes negativos tiene una función inhibitoria en la activación constitutiva de los STAT llevando a un bloqueo en la proliferación celular y a un aumento de la susceptibilidad a la apoptosis en distintas líneas celulares transformadas y tumores (*de Groot, et al 2000, Huang, et al 2000a, Turkson, et al 1998*).

Resulta interesante el uso de la terapia génica en un modelo murino de melanoma (*Niu, et al 1999*). En este trabajo, ratones singénicos con el tumor inducido por una línea celular de melanoma en la que STAT3 está activado constitutivamente, son inyectados intratumoralmente con un vector que expresa STAT3 β , una forma dominante negativa de STAT3. En este ratón se observa la regresión del tumor debido a una masiva apoptosis *in vivo* comparado con el ratón que únicamente recibe el vector vacío. Aunque en este ensayo solamente de un 10 a un 15% de las células tumorales fueron transfectadas *in vivo*, el efecto antitumoral inducido por STAT3 β fue masivo observándose un efecto *bystander* o de "espectador inocente" inesperado. Este efecto es mediado en parte por la liberación de factores solubles capaces de inducir apoptosis (*Niu, et al 2001*), por el requerimiento de STAT3 durante la angiogénesis y en él también podría estar involucrada la respuesta inmune contra el tumor.

Otra estrategia terapéutica en cáncer teniendo como diana los STAT, es el empleo de péptidos de pequeño tamaño que bloquean la formación de dímeros de STAT, paso fundamental para su activación, su translocación a núcleo y la unión a ADN para iniciar su actividad transcripcional. La dimerización puede ser inhibida con el uso de moléculas que muestran una alta afinidad por los monómeros de STAT con el fin de generar compuestos que sean más estables que los dímeros STAT-STAT. Siguiendo esta estrategia se han usado fosfotirosil péptidos que se unen al dominio SH2 de STAT3 bloqueando de este modo su fosforilación, dimerización, unión a ADN y por lo tanto impidiendo su actividad transcripcional. Todo esto produce finalmente la inhibición de la transformación celular inducida por v-Src y provoca la muerte de las células tumorales con un escaso efecto sobre las células normales (*Turkson, et al 2001*). Se han usado librerías químicas combinatorias para convertir estos péptidos de pequeño tamaño en peptidomiméticos. Los peptidomiméticos son pequeñas moléculas orgánicas que

INTRODUCCION

imitan pequeños fragmentos de cadenas de aminoácidos que son diseñados para unirse competitivamente a las proteínas nativas interfiriendo en su función.

Por ultimo, otro de los campos que se abre en la actuación terapéutica en el cáncer pasa por la modulación de los inhibidores fisiológicos de la vía JAK/STAT. Las proteínas SOCS son los reguladores negativos de las JAK kinasas. Como hemos visto anteriormente, su importancia en cáncer queda ilustrada con la observación de que SOCS1 es silenciado por metilación del DNA en diversos tumores (*Chen, et al 2003a, Galm, et al 2003, Yoshikawa, et al 2001*). La familia PIAS que regula negativamente los STAT tiene también importancia en la génesis de tumores tal y como se ha visto en el linfoma anaplásico de células grandes donde la proteína PIAS3 esta regulada negativamente siendo en parte responsable del mantenimiento de altos niveles de STAT3 activado (*Zhang, et al 2002a*). Por último las PTP que también son capaces de regular negativamente la señalización de la vía JAK/STAT pueden ser objeto de diversas aproximaciones terapéuticas identificando moléculas que imiten la acción de estos inhibidores fisiológicos y por tanto que bloqueen la activación de los STAT (*Yu and Jove 2004*).

6. LEUCEMIA LINFOCITICA CRONICA DE CELULAS B

La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) es un síndrome que se define como la acumulación de linfocitos B que expresan en su superficie CD19, CD5, CD23 y bajos niveles de inmunoglobulinas (*Chiorazzi and Ferrarini 2003*). La LLC-B forma parte de un grupo de desórdenes denominado síndromes linfoproliferativos de bajo grado.

6.1. Generalidades

La LLC-B es la leucemia más frecuente en el mundo occidental y debido a su relativamente prolongada supervivencia, su prevalencia es la más alta de todas las leucemias. La LLC-B es ligeramente más frecuente en varones que en mujeres y clásicamente se ha considerado una enfermedad de la vejez siendo la edad media en el momento del diagnóstico de 70 años aunque actualmente no es raro realizar el diagnóstico de LLC-B en pacientes más jóvenes, incluso entre los 30 y 40 años. Lo que sí se observa es que la incidencia se incrementa rápidamente a partir de los

INTRODUCCION

55 años, doblándose casi a partir de los 75 años. Por razones no bien conocidas, la incidencia de LLC-B en la raza oriental es extremadamente baja (*Yang and Zhang 1991*). En este fenómeno epidemiológico parece que interviene más causas genéticas que medioambientales pues poblaciones orientales que viven en Occidente mantienen la baja incidencia. Hay familias en las que se presenta con más frecuencia la LLC-B u otras neoplasias linfoides entre los familiares de primer grado del paciente afecto de LLC-B. Por otra parte, tampoco se ha constatado la influencia de factores medioambientales, como pueden ser la exposición a drogas, agentes químicos o tóxicos (*Hamblin and Oscier 1998*). Por lo tanto, actualmente no hay ningún factor etiológico conocido, ni genético ni medioambiental, claramente identificado en la LLC-B (*Rai and Keating 2000*).

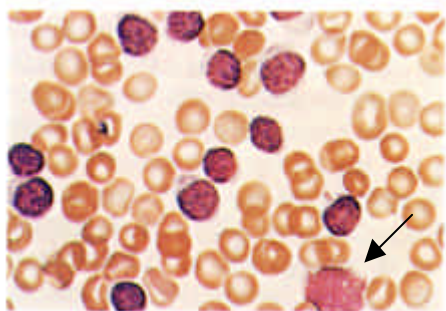


Figura I9. Frotis de sangre periférica de un LLC-B.

El recuento de leucocitos de sangre periférica en la LLC-B se encuentra elevado como consecuencia de un aumento en el número de linfocitos. Estos linfocitos son de pequeño tamaño y de aspecto maduro. Sin embargo, los linfocitos leucémicos son frágiles por lo que es frecuente encontrar células rotas y de aspecto sucio (**flecha**) en el frotis de sangre periférica.

Los linfocitos tumorales de la LLC-B son células clonales B detenidas en la fase G0/inicio de la fase G1 del ciclo celular. En el frotis de sangre periférica, morfológicamente se asemejan a linfocitos maduros, constituyendo una población de células de pequeño tamaño en las que el núcleo ocupa virtualmente toda la célula dejando únicamente un fino anillo de citoplasma visible. La cromatina está condensada y el nucleolo normalmente no es distinguible (Figura I9.).

Existen otras neoplasias hematológicas en la que los linfocitos tienen un aspecto maduro similar al que se ve en la LLC-B. El estudio inmunofenotípico en estos casos, resulta muy útil para realizar el diagnóstico diferencial entre la LLC-B y estas neoplasias (Tabla I6.).

INTRODUCCION

Tabla I6. Inmunofenotipo de la LLC-B y otras neoplasias hematológicas que se le asemejan.

Antigen	B-CLL	Mantle Cell Lymphoma	SLVL	Follicular Lymphoma
slg	Weak	++	++	++
CD5	++	++	-	-
CD19	++	++	++	++
CD20	+	++	++	++
CD22	Weak or -	++	++	++
CD23	++	-	-	-
CD79b	Weak or -	++	++	++
FMC7	-	++	++	++
CD10	-	-	-	++

Abbreviations: slg, surface immunoglobulin; SLVL, splenic lymphoma with villous lymphocytes.

Kay N.E., et al. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 2002 :193-213.

Las células tumorales de LLC-B presentan aberraciones cromosómicas en un 80% de los casos (*Rai, et al 2001*). Aunque no hay una única alteración citogenética característica y diagnóstica de LLC-B, existen ciertas aberraciones que se observan con más frecuencia y que se presentan sólo en algunos pacientes, sirviendo por lo tanto para la definición de subgrupos dentro de la LLC-B. Aunque estas alteraciones probablemente no juegan un papel principal en la iniciación del proceso leucémico, pueden tener una influencia importante en la progresión de la enfermedad y por ello, la información pronóstica que se puede desprender de estos marcadores genéticos, puede resultar muy útil. Han sido varias las metodologías empleadas para el estudio de las aberraciones cromosómicas, entre ellas los análisis convencionales de los cromosomas en metafase o las técnicas de hibridación in situ (*FISH: Fluorescent In Situ Hybridization*) empleadas para identificar las alteraciones citogenéticas. Las principales aberraciones cromosómicas que se han observado en la LLC-B son:

Delecciones 13q14. Aunque en estudios iniciales estas delecciones eran detectadas raramente, actualmente se observan en aproximadamente el 50% de los pacientes con LLC-B, observándose además en linfomas de células del manto y en mieloma lo cual indica la importancia de esta región cromosómica en cuadros linfoproliferativos (*Dohner, et al 1999*). Estas delecciones representan probablemente

INTRODUCCION

la pérdida de un gen de supresión tumoral. Aunque son varios los genes identificados en el cromosoma 13 (*Mabuchi, et al 2001*), ninguno de ellos cumple todos los requisitos para ser un gen supresor de la LLC-B. Los pacientes con LLC-B con alteraciones 13q14 tienen característicamente un buen pronóstico, con un curso benigno de la enfermedad (*Oscier, et al 1990*).

Delecciones 11q22-23. Estas delecciones se detectan aproximadamente en el 15% al 20% de los casos de LLC-B. Han sido varios los genes candidatos considerados como genes de supresión tumoral que podrían perderse con estas delecciones. El gen *atm* (*atelectasia teleangiectasia mutated*) es el gen que cumple los requisitos para considerarse como tal en la LLC-B (*Starostik, et al 1998*). La proteína ATM posee actividad kinasa y es crucial para la estabilización de los productos de genes implicados en la respuesta celular al estrés genotóxico como p53, c-Abl, BRCA1. Resulta interesante que algunos estudios han detectado la presencia de mutaciones en *atm* tanto en células normales como en leucémicas lo que lleva a pensar que las mutaciones ocurren en la línea germinal y que los portadores heterocigotos de la mutación en *atm*, puedan tener predisposición a desarrollar LLC-B. Los pacientes con LLC-B que presentan esta alteración cromosómica se caracterizan por una linfadenopatía generalizada y un pobre supervivencia (*Dohner, et al 1999*).

Trisomía 12. Esta alteración ocurre en una proporción variable de enfermos con LLC-B, entre un 15% a un 30%. La trisomía del cromosoma 12 deriva más bien de la duplicación de uno de los cromosomas que de la pérdida de uno de ellos y la posterior triplicación del cromosoma restante (*Einhorn, et al 1989*). Aunque pueden ocurrir trisomías parciales, translocaciones, y amplificaciones de distintas regiones del cromosoma 12, el segmento implicado en la LLC-B todavía no está definido. La presencia de esta alteración cromosómica en pacientes con LLC-B se asocia con mal pronóstico con progresión de la enfermedad y morfología celular atípica (*Oscier, et al 1997*).

Delecciones 17p. En estudios iniciales, las delecciones 17p se detectaban aproximadamente en el 4% de las LLC-B. Tras la localización del gen de supresión tumoral p53 en la zona 17p13, se ha identificado mutaciones de p53 en el 15%-20% de las LLC-B (*Gaidano, et al 1991*). Como es de esperar dada la importancia de

INTRODUCCION

p53 en el control de la respuesta celular frente al daño del ADN, de la muerte celular y de la progresión en el ciclo celular, la presencia de mutaciones en p53 se ha asociado con una morfología atípica de los linfocitos tumorales, un mal pronóstico y una pobre respuesta al tratamiento en la LLC-B (*Lens, et al 1997*).

Otras alteraciones cromosómicas que se pueden observar con mucha menos frecuencia en pacientes con LLC-B son deleciones 6q, trisomías del cromosoma 8 y del cromosoma 3 (*Dohner, et al 2000*).

El empleo por parte de las células leucémicas de la LLC-B de distintas familias de genes IgV_H, que codifican las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, respecto a su contraparte normal, los linfocitos B CD5+ de sangre periférica, así como la presencia o no de mutaciones en los genes IgV han posibilitado la división de la LLC-B en dos subgrupos con diferente pronóstico de la enfermedad (*Oscier, et al 2002*). Los pacientes con células tumorales que expresan genes IgV sin significativos niveles de mutación (<2% de diferencia respecto al gen de la línea germinal) tienen un curso clínico más agresivo y una supervivencia más corta que los pacientes que tienen un nivel significativo de mutaciones en los genes IgV (≥2%) (*Chiorazzi and Ferrarini 2003*).

Clínicamente la LLC-B puede cursar de manera asintomática de modo que en un 20% de los pacientes, la LLC-B se descubre de manera accidental. La práctica común de pedir el recuento y la fórmula leucocitaria de rutina en adultos ha llevado a que se diagnostique más frecuentemente la LLC-B en pacientes asintomáticos. Por otra parte, otro 20% de las LLC-B se presenta al inicio con los síntomas B típicos: fiebre sin infección, sudoración nocturna, debilidad y pérdida de peso. Entre ambos extremos, el resto de los pacientes tienen una sintomatología variada de modo que los signos y síntomas de la LLC-B se relacionan generalmente con la infiltración tisular, las citopenias de sangre periférica o la inmunosupresión concomitante. La mayoría de los pacientes con LLC-B acuden a la consulta por la presencia de adenopatías, generalmente cervicales. Las adenopatías son el signo clínico más frecuente siendo firmes, redondas, discretas, no dolorosas y no adheridas a planos profundos. El bazo también puede estar aumentado de tamaño en un tercio de los casos y rara vez es doloroso. También el hígado puede estar aumentado de tamaño en un 20% a 30%

INTRODUCCION

de los casos. Generalmente la hepatomegalia es moderada observándose un hígado firme y liso a la palpación.

Existe poca correlación entre el recuento de leucocitos y los síntomas excepto en los casos con cargas tumorales muy elevadas. Los pacientes con una LLC-B avanzada pueden presentar anemia, granulocitopenia y trombocitopenia como resultado de la infiltración masiva de la médula ósea por las células leucémicas. Alrededor de un 20% de los pacientes desarrollan a lo largo de la enfermedad una anemia hemolítica autoinmune con prueba de Coombs positiva. Ocasionalmente tiene lugar una trombocitopenia autoinmune o una aplasia pura de eritrocitos. La hipogammaglobulinemia en el momento del diagnóstico está presente en un 10% de los pacientes pudiendo aumentar hasta en un 65% con la progresión de la enfermedad siendo normalmente a expensas de los tres isotipos principales (IgG, IgA e IgM). La LLC-B ocasionalmente, alrededor del 3% de los pacientes, puede terminar evolucionando a un linfoma linfocítico agresivo, concretamente un linfoma difuso de células grandes, hecho que se conoce como síndrome de *Richter*. En un porcentaje similar de pacientes se puede producir una transformación morfológica de los células tumorales en sangre pasando de la típica apariencia de linfocitos maduros a unas células más grandes con la cromatina menos condensada y un nucleolo distinguible. Este hecho se conoce como transformación prolinfocitoide. Aunque la causa más frecuente de muerte en los pacientes con LLC-B son las infecciones sistémicas (*Rai and Keating 2000*).

El diagnóstico de LLC-B se sospecha cuando se observa la presencia de linfocitosis en sangre periférica. Esta linfocitosis debe ser mantenida en el tiempo y se deben excluir otras causas infecciosas, neoplásicas o de otra índole que puedan originarla. El Taller Internacional de LLC-B (*The International Workshop on CLL: IWCLL*) recomienda la cifra de $10 \times 10^9/l$ linfocitos en el recuento de sangre periférica como el mínimo necesario para realizar el diagnóstico de LLC-B. Según el Grupo de Trabajo patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (*National Cancer Institute-sponsored Working Group: NCIWG*) la cifra mínima de linfocitos en sangre periférica para el diagnóstico de LLC-B es de $5 \times 10^9/l$ (*Cheson, et al 1996*). Además de la presencia de linfocitosis mantenida en sangre periférica, son necesarios otros hallazgos para el diagnóstico de LLC-B como es la presencia de una hiper o normocelularidad en médula ósea con un conteo de linfocitos de más del 30% del total de las células nucleadas. Si la cifra

INTRODUCCION

de linfocitos en sangre periférica está entre $5 \times 10^9/l$ y $10 \times 10^9/l$, el estudio del inmunofenotipo y la presencia de las características típicas de los linfocitos en la LLC-B resulta necesario (Tabla 16.).

Son varias las clasificaciones pronósticas que se han propuesto en las que se incluyen distintos parámetros clínicos y de laboratorio (Tabla 17.). De estas clasificaciones la de *Rai* y colaboradores (*Rai, et al 1975*) y la de *Binet* y colaboradores (*Binet, et al 1981*) son las dos más ampliamente difundidas en el manejo clínico de los pacientes con LLC-B.

Tabla 17. Clasificaciones pronósticas por estadios de la LLC-B más usadas.

a	
Estadios de Rai	
Estadio	Descripción
Estadio 0	Linfocitosis sin: linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, anemia o trombocitopenia.
Estadio I	Linfocitosis con linfadenopatía y sin: hepatoesplenomegalia, anemia o trombocitopenia.
Estadio II	Linfocitosis con hepatomegalia o esplenomegalia, con o sin linfadenopatía.
Estadio III	Linfocitosis con anemia (hemoglobina <110 g/l) con o sin linfadenopatía, hepatomegalia o esplenomegalia.
Estadio IV	Linfocitosis con trombocitopenia ($<100 \times 10^9/l$) con o sin linfadenopatía, hepatomegalia o esplenomegalia o anemia.

b	
Clasificación de Binet	
Estadio	Descripción
Estadio clínico A	No anemia ni trombocitopenia y menos de tres áreas ganglionares afectadas. (Estadios de Rai: 0, I, y II).
Estadio clínico B	No anemia ni trombocitopenia y tres o más áreas ganglionares afectadas. (Estadios de Rai: I y II).
Estadio clínico C	Anemia y/o trombocitopenia con independencia del número de áreas ganglionares afectadas. (Estadios de Rai: III y IV).

La clasificación de *Rai* (Tabla 17.a.) se basa en el concepto de que en la LLC-B hay un incremento gradual y progresivo del número de linfocitos tumorales resultando en una serie de manifestaciones secuenciales de la enfermedad. Aproximadamente una cuarta parte de los pacientes en el momento del diagnóstico están en el estadio 0, otra cuarta parte en los estadios III y IV y el resto en los estadios I y II. Posteriormente, el sistema de estadiaje de *Rai* se modificó pasando a tener tres grupos: bajo (estadio 0), intermedio (estadio I y II) y alto (estadios III y IV).

INTRODUCCION

La clasificación de *Binet* (Tabla 17.b.) cataloga a todos los pacientes con anemia (menos de 100 g/l de hemoglobina) y/o trombocitopenia (menos de $100 \times 10^9/l$ de plaquetas) como estadio C. El resto de los pacientes se dividen en dos estadios según tengan menos de tres (estadio A), o tres o más (estadio B) áreas ganglionares afectadas. La áreas que se tienen en consideración son: cervical, axilar, inguinal (independientemente de que la afectación sea unilateral o bilateral), bazo e hígado.

Ambos sistemas tienen valor pronóstico y son útiles para establecer la pauta a seguir en el manejo terapéutico de los pacientes con LLC-B. Los pacientes con estadios bajos (estadio 0 de *Rai*; estadio A de *Binet*) tienen una supervivencia media de más de 10 años, los de estadios intermedios (estadios I y II de *Rai*; estadios A y B de *Binet*) tienen una supervivencia media de unos 6 años mientras que los pacientes en estadios altos (estadios III y IV de *Rai*; estadio C de *Binet*) la supervivencia media es de menos de 2 años.

En cuanto al tratamiento de la LLC-B, la primera cuestión que se plantea es cuándo se debe tratar a un paciente diagnosticado de LLC-B. En ausencia de síntomas, la observación periódica del paciente es la actuación estándar que se realiza en la actualidad basándose en estudios en los que se demuestra que no existe una mayor supervivencia en los pacientes asintomáticos que han recibido tratamiento (*CLL Trialists' Collaborative Group 1999*) que en los que no. Los síntomas que indican la necesidad de tratamiento incluyen la presencia de citopenias no autoinmunes, linfadenopatía sintomática, presencia de síntomas B, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia no controlada con esteroides, linfocitosis progresiva con un incremento de más del 50% de la cifra de los linfocitos en un periodo de dos meses o una duplicación de la cifra de éstos en un periodo menor de seis meses (*Cheson, et al 1996*).

Son varios los tratamientos que se han empleado en la LLC-B. Entre las drogas más utilizadas se encuentran los agentes alquilantes y de ellos, el clorambucil. Esta droga cuyo metabolito farmacológicamente activo es el PAAM (*phenylacetic acid mustard*) ha sido utilizada a menudo como terapia inicial sola o asociada fundamentalmente a corticoides. Varios son las pautas y las dosis que se han empleado de los cuales un régimen empleando altas dosis de clorambucil de manera continuada, parece ser uno de los que consigue mejores resultados (*Jaksic, et al 1997*).

INTRODUCCION

Varios protocolos de tratamiento empleados en linfomas no Hodgkin que combinan distintos drogas como son el protocolo mini-CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, predmisona), CAP (ciclofosfamida, doxorubicina, predmisona) o COP (ciclofosfamida, vincristina, predmisona) también han sido empleados en LLC-B aunque ninguno ha demostrado ser superior a los tratamientos basados en clorambucil (*CLL Trialists' Collaborative Group 1999*).

Los análogos de purinas es otro de los tratamientos empleados en la LLC-B. Entre estas drogas se incluyen la pentostatina (2'-deoxicoformicina), un inhibidor del enzima adenosina deaminasa (ADA), la fludarabina (9-β-D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina; F-ara-A) y la cladribina (2'-cloro 2'-deoxiadenosina; 2CdA) estos dos últimos análogos de purinas resistentes a la acción de la ADA. El uso de la pentostatina y la cladribina en el tratamiento de la LLC-B, ha sido más limitado mientras que la fludarabina, sola o en combinación con otras drogas, es el análogo de purinas más empleado en el tratamiento de la LLC-B (*Nabhan, et al 2004*). En una sección posterior se desarrollará con más detalle el empleo de fludarabina en el tratamiento de la LLC-B.

Otro de los tratamientos utilizados en la LLC-B es el empleo, solos o en combinación con otras drogas, de anticuerpos monoclonales como Campath-1H (Alemtuzumab) y Rituximab (*Robak 2004*). El anticuerpo monoclonal Campath-1H es un anticuerpo humanizado dirigido contra la molécula de superficie CD52 que se expresa en más del 95% de los linfocitos B y T maduros mientras que Rituximab es un anticuerpo quimérico dirigido contra la molécula CD20 expresada en los linfocitos B maduros. El empleo de otros anticuerpos como el Hu1D10 (anti-cadena β de la molécula HLA-DR), IDEC-152 (anti-CD23) o Epratuzumab (anti-CD22) se está evaluando para el tratamiento de la LLC-B (*Kay, et al 2002*).

Para el tratamiento de la LLC-B también se ha empleado el trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos (*Rizouli and Gribben 2003*). Uno de los principales problemas de este tratamiento es la dificultad de obtener precursores hematopoyéticos libres de contaminación tumoral.

La LLC-B es pues una entidad compleja en la que la patogenia no está aclarada, cuya presentación clínica es muy variada y en la que no existe un tratamiento universalmente aceptado (*Guipaud, et al 2003*). Aunque los sistemas de estadiaje clínicos han sido muy útiles en la valoración pronóstica global de los pacientes con LLC-B, no pueden predecir el riesgo individual de la progresión de la

INTRODUCCION

enfermedad, sobre todo en estadios precoces. El conocimiento sobre la alteración en la LLC-B de importantes procesos biológicos tales como el bajo nivel de actividad en el ciclo celular, la resistencia a la apoptosis, la presencia de mutaciones somáticas y germinales, la alteración de la expresión génica, la producción de citocinas por parte de las células tumorales, la presencia de moléculas de adhesión, el impacto del microambiente y la presencia en éste de células con un papel "nurse" sobre las células tumorales pueden resultar de importancia para el mejor conocimiento de la patogénesis de la LLC-B, para la predicción individual de la progresión de la enfermedad y para el diseño de las futuras estrategias terapéuticas a seguir. En las siguientes secciones, se discute de manera más detallada algunos de estos aspectos biológicos de la LLC-B.

6.2. LLC-B y apoptosis

Una de las características biológicas de la LLC-B es la alteración en los procesos normales de apoptosis que tienen como consecuencia un incremento en la supervivencia de las células tumorales (*Reed 1998*). La aparición del proceso leucémico en estos pacientes no se debe a una proliferación acelerada de un clon celular maligno, sino más bien, a una acumulación de las células leucémicas debido a un defecto no bien definido de la apoptosis que resulta en un incremento de la supervivencia de las mismas.

Son varias las evidencias que soportan esta idea de un defecto en la apoptosis en la LLC-B. Probablemente una de las alteraciones en el proceso normal de apoptosis observada más estudiada en las células de la LLC-B es la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl2. La translocación t(14;18) en la que el gen *bcl2* situado en el cromosoma 18 pasa al cromosoma 14 bajo la regulación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas se observa con frecuencia en linfomas foliculares. Sin embargo, en la LLC-B las translocaciones del gen *bcl2* son relativamente infrecuentes (aproximadamente un 10%) (*Raghoebier, et al 1991*). A pesar de ello, la expresión tanto del ARN mensajero como de la proteína es bastante común en la LLC-B. Esta sobreexpresión de Bcl2 se debe más bien a una hipometilación del gen que codifica para esta proteína que a un reordenamiento genético (*Hanada, et al 1993*). La proteína Bcl2 regula la liberación al citoplasma del enzima mitocondrial citocromo c que inicia la cascada de activación de la vía intrínseca de la apoptosis. La proteína Bcl2 también parece ser importante en el transporte de calcio dentro

INTRODUCCION

de la célula por lo que otra manera en la que puede regular la apoptosis es afectando a las endonucleasas calcio-dependientes. La familia Bcl2 comprende tanto proteínas antiapoptóticas como Bcl2 y Mcl-1 como proteínas proapoptóticas como Bax y Bak que participan en el mantenimiento de una población linfocítica constante (*Khaled and Durum 2002*) de modo que esta homeostasis linfocítica se encuentra alterada en la LLC-B. Por eso, la interacción entre Bcl2 y Bax, más que los niveles absolutos de Bcl2, son importantes en la apoptosis de las células tumorales de la LLC-B. La proporción Bcl2/Bax se correlaciona con la resistencia a la quimioterapia estándar en pacientes con LLC-B. En este sentido, un aumento de la razón Bcl2/Bax se ha observado en células de LLC-B resistentes a la apoptosis inducida *in vitro* (*Pepper, et al 1997*) así como en pacientes con LLC-B tratados que han presentado una falta de respuesta clínica a la quimioterapia (*Pepper, et al 1996*). La importancia de la proteína Bcl2 en la regulación de la apoptosis en la LLC-B ha llevado al empleo de oligonucleótidos antisentido como estrategia terapéutica con el fin de inhibir la expresión de dicho gen en las células de LLC-B (*Schimmer, et al 2003*).

Cuando se analiza la correlación entre distintas proteínas de la familia Bcl2 tanto con la sensibilidad a la quimioterapia *in vitro* como con la respuesta *in vivo* al tratamiento, se observa que la proteína antiapoptótica Mcl-1 está fuertemente asociada con la resistencia tanto a clorambucil como a fludarabina y que en los pacientes con una proporción menor de respuesta completa tras el tratamiento, la proteína Mcl-1 está sobreexpresada (*Kitada, et al 1998*).

En el aumento de la supervivencia de las células de LLC-B también juegan un papel importante la vía de la PI3 quinasa. Cuando se inhibe de manera específica la activación constitutiva de PI3 quinasa se produce una regulación negativa en la expresión de diversas proteínas antiapoptóticas entre las cuales se encuentran ciertos miembros de la familia IAP (*Inhibitor of Apoptosis protein*) con un aumento de la apoptosis de las células de LLC-B (*Ringshausen, et al 2002*).

Otra familia de moléculas que están implicadas en el incremento de la supervivencia de las células de LLC-B es la superfamilia del TNF. Entre otros hallazgos que implican a esta vía en la supervivencia de la LLC-B, se ha identificado la expresión aberrante en las células de un subgrupo de pacientes con LLC-B de las proteínas BLyS (*B-lymphocyte Stimulator*) y APRIL (*a proliferation*

INTRODUCCION

inducing-ligand), dos miembros de la superfamilia del TNF que podrían tener efectos en las células de LLC-B promoviendo su supervivencia al inducir la activación de NF- κ B (Novak, et al 2002). Este factor de transcripción regula la expresión de genes antiapoptóticos como son los miembros de la familia IAP, anteriormente mencionada, y de la familia TRAF (*TNF receptor-associated factor*). TRAF1 y en menor medida TRAF2 están sobreexpresados en linfocitos tumorales de LLC-B comparado con linfocitos B normales (Munzert, et al 2002). Por otra parte, parece que APRIL podría rescatar de la apoptosis a las células LLC-B a través de un mecanismo autocrino que involucraría al receptor de esta proteína (Kern, et al 2004).

Otra proteína antiapoptótica, la survivina, es inducida tras el estímulo de CD40, otro miembro de la familia de TNF, de modo que esta inducción transcripcional de la survivina dependiente de CD40 puede aumentar la supervivencia de las células de LLC-B (Granziero, et al 2001).

Otro de los mecanismos biológicos que lleva a un aumento de la supervivencia de las células de LLC-B es la expresión de la isoforma inducible del enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) (Zhao, et al 1998). La inducción de la expresión y de la actividad de iNOS tras el estímulo vía CD23 produce un efecto antiapoptótico en las células de LLC-B. Son varios los mecanismos que se han postulado en el papel antiapoptótico del óxido nítrico. La inhibición de la actividad de las caspasas, la afectación de la vía Fas o la disrupción del potencial de membrana mitocondrial pueden ser algunos de estos mecanismos (Kolb, et al 2001). Además, la actividad de iNOS protege a las células tumorales del daño del ADN por parte de diversos agentes antitumorales promoviendo la actividad de enzimas reparadoras de ADN. De este modo también puede contribuir a la resistencia de las células tumorales frente a la apoptosis (Xu, et al 2000). Los sistemas de reparación del ADN parecen tener un papel esencial en la susceptibilidad de las células de LLC-B a la apoptosis de modo que las células resistentes a la muerte celular pueden evitar la iniciación de las señales apoptóticas como resultado de una reparación del daño del ADN más rápida que aquellas células de LLC-B sensibles a la apoptosis (Guipaud, et al 2003).

La activación de Fas (CD95/Apo-1) por parte de Fas ligando (CD154) es un importante regulador de la homeostasis tanto de los linfocitos normales como de

INTRODUCCION

los tumorales. El ligamiento de la molécula Fas expresada en la superficie de los linfocitos B con Fas ligando presente en la superficie de los linfocitos T lleva a la activación en los primeros de la caspasa 8 que activa a su vez la caspasa 3 llevando a la apoptosis de los linfocitos B. Las células de LLC-B expresan bajas cantidades de Fas en su superficie (*Panayiotidis, et al 1995*) y son resistentes a la apoptosis inducida por el ligamiento de anticuerpos anti-Fas con la molécula Fas. Este defecto en la señalización por esta vía no se debe a mutaciones en el gen *fas* (*Rozenfeld-Granot, et al 2001*). Se ha observado que el estímulo vía CD40 de las células de LLC-B lleva a un aumento de la expresión de Fas. No está claro si este aumento de la expresión de Fas dependiente de CD40 lleva a un aumento de la apoptosis de las células de LLC-B. Mientras que hay estudios en los que el aumento de la expresión de Fas no conlleva un aumento de la muerte de las células de LLC-B previamente sensibilizadas por CD40 (*de Toter, et al 2004*), otros autores indican que tras la sensibilización de las células de LLC-B por CD40, éstas en un primer momento son protegidas frente a la apoptosis mediada por Fas y en una segunda fase su susceptibilidad frente a la apoptosis debida a Fas aumenta (*Chu, et al 2002*).

Son varias las citocinas que se han relacionado con los procesos de apoptosis en la LLC-B. Se ha descrito que IL-4 es capaz de proteger a las células de LLC-B de la muerte *in vitro* por apoptosis. Entre los efectos que produce IL-4 está la regulación positiva de Bcl2 (*Dancescu, et al 1992*), la inhibición de la muerte celular mediada por Fas (*Williams, et al 1999*) o la regulación positiva post-traslacional de iNOS (*Levesque, et al 2003*). Además IL-4, al igual que IL-2 e IFN- γ , es capaz de prevenir la apoptosis de las células de LLC-B inducida por IL-10 (*Fluckiger, et al 1994*).

Otra citocina con capacidad antiapoptótica en la LLC-B es IFN- γ . Esta citocina es capaz de suprimir la apoptosis de las células de LLC-B de modo que este aumento en la supervivencia se asocia con un retraso en la regulación negativa de Bcl2 (*Buschle, et al 1993*). Por otra parte, aunque IFN- γ aumenta la expresión de Fas en las células de LLC-B, éstas no se mueren en presencia de anticuerpos anti-Fas (*Panayiotidis, et al 1995*). Otro de los efectos producidos por IFN- γ sobre las células de LLC-B es la regulación positiva de iNOS de modo que disminuye la apoptosis provocada por una inhibición de iNOS (*Levesque, et al 2003*). Además se ha visto que los sueros de pacientes con LLC-B presentan niveles aumentados de IFN- γ

INTRODUCCION

comparados con los sueros de sujetos normales y que las células B de la LLC-B expresan niveles detectables de ARN mensajero de IFN- γ (*Mainou-Fowler and Prentice 1996*). Estos datos hacen pensar en la posibilidad de que, al igual que lo visto *in vitro*, esta citocina pueda tener un efecto en la viabilidad de las células de LLC-B *in vivo*.

Otras citocinas se han implicado en el incremento de la viabilidad de las células de LLC-B, entre ellas IL-8 que es capaz de prolongar la supervivencia de estas células de un modo autocrino a unas concentraciones fisiológicas apoyando la idea de que en la LLC-B, la IL-8 liberada por el clon leucémico puede tener un papel en el proceso de acumulación de las células tumorales característico de la LLC-B (*Francia di Celle, et al 1996*).

Todos los hallazgos anteriormente descritos indican que las células de LLC-B presentan una alteración general en los procesos normales de apoptosis produciendo un incremento en la supervivencia de las células tumorales que contribuye a su acumulación y a la aparición del proceso leucémico.

6.3. LLC-B y Nurse Like Cells (NLC)

La relación de las células tumorales de la LLC-B con el microambiente que les rodea resulta muy importante y son varias las observaciones que indican que esta interrelación puede influir en varios aspectos de la historia natural de la LLC-B como son la progresión de la enfermedad, el estadio de la enfermedad, la resistencia a la terapia *in vivo* o el tropismo de las células tumorales por ciertos tejidos. Con respecto a este último aspecto, el patrón de expresión de distintas moléculas de adhesión como las integrinas, ha sido motivo de diversos estudios (*Behr, et al 1998, Vincent, et al 1996, Woessner, et al 1994*). La expresión de distintas integrinas o su ausencia se ha relacionado con la evolución y el estadio de la enfermedad (*De Rossi, et al 1993*).

En la médula ósea y ganglios linfáticos de pacientes con LLC-B existe un predominio llamativo de linfocitos T CD4+ cuyo patrón de secreción de citocinas está modulado por la presencia de células "accesorias" de las cuales las principales son las propias células tumorales (*Decker, et al 1995*). Esta interacción entre los linfocitos T CD4+ y las células tumorales pueden resultar en beneficio de éstas últimas. Como se ha visto anteriormente diversas citocinas secretadas por los

INTRODUCCION

linfocitos T, como IL-4 o interferones, pueden aumentar la resistencia de las células tumorales a la apoptosis. También se ha visto que la interacción CD40-CD40 ligando puede inducir la expresión de la proteína antiapoptótica survivina en las células de LLC-B (*Granziero, et al 2001*).

Como se desprende de estos datos, en la alteración de los procesos normales de apoptosis que se observa en la LLC-B además de defectos genéticos, existen factores extrínsecos a las células leucémicas que también están implicados en el anormal comportamiento de estas células frente a las señales normales de muerte (*Ghia and Caligaris-Cappio 2000*). De hecho, resulta llamativo que a pesar de la longevidad que las células de LLC-B presentan *in vivo*, estas células entran en apoptosis con facilidad cuando son cultivadas *in vitro* (*Collins, et al 1989*) reforzando la hipótesis de que la muerte celular programada de las células de LLC-B en cultivo resulta de la ausencia de señales extrínsecas de supervivencia esenciales de modo que la resistencia que presentan estas células a la apoptosis no se debe únicamente a un defecto intrínseco de las células tumorales de la LLC-B (*Jurlander 1998*). Estas señales externas pueden ser de diversa índole y provenir de distintos tipos celulares o componentes extracelulares de modo que diferentes señales en diferentes lugares pueden jugar un papel importante en la supervivencia prolongada de las células de LLC-B.

Uno de los tipos celulares que se han descrito como capaces de inhibir la apoptosis de las células de LLC-B *in vitro* son las células estromales de médula ósea (*Panayiotidis, et al 1996*). Estas células son capaces de inhibir de manera específica la apoptosis de las células tumorales de LLC-B. Para ello no es suficiente únicamente el cocultivo de ambos tipos celulares sino que resulta necesario el contacto célula-célula. La interacción entre ambos tipos celulares parece mediada por las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ (*Lagneaux, et al 1998*).

Otras células que se ha implicado en la supervivencia *in vitro* de las células tumorales de la LLC-B son las células endoteliales (*Moreno, et al 2001*). Estas mediante la secreción de dímeros de IL-6 impide la apoptosis de las células de LLC-B que sí entran en muerte celular cuando en el medio hay anticuerpos anti-IL-6.

Las células dendríticas foliculares también son capaces de proteger a las células LLC-B de la apoptosis *in vitro* tanto espontánea como inducida por distintas drogas (*Pedersen, et al 2002*). La línea HK de células foliculares dendríticas interacciona con las células de LLC-B a través de la molécula de adhesión CD44 provocando el

INTRODUCCION

aumento de expresión del gen antiapoptótico *Mcl-1* y promoviendo la supervivencia de las células de LLC-B.

No sólo la interacción con otras células protege a las células tumorales de LLC-B de la apoptosis. La interacción de éstas, a través de la integrina $\alpha 4\beta 1$, con proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina inhibe la apoptosis de las células tumorales *in vitro* tanto espontánea (*de la Fuente, et al 1999*) como inducida por drogas usadas en la terapia antitumoral como es el caso de fludarabina (*de la Fuente, et al 2002*).

Entre los distintos tipos celulares que se han visto implicados en la supervivencia *in vitro* de las células de LLC-B, se ha descrito una subpoblación de células derivadas de la sangre periférica de los pacientes con LLC-B (*Burger, et al 2000*). Estas células se diferencian espontáneamente *in vitro* en células adherentes de morfología variable a partir de cultivos prolongados de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLC-B. El efecto protector que ejercen sobre las células tumorales de la LLC-B es en parte debido a la interacción célula-célula a través de la quimiocina SDF-1 (*stromal-derived factor 1*) (*Burger and Kipps 2002*). Estas células que se han denominado como *nurselike cells* (NLC) presentan marcadores de superficie propios del linaje monocito-macrofágico y probablemente pueden representar un tipo celular distinto que deriva de células CD14+ que existen *in vivo* y que protegen a las células de LLC-B de la apoptosis (*Tsukada, et al 2002*).

Tal y como se ha visto, son varios los tipos celulares que protegen de la muerte celular a las células de LLC-B *in vitro* y que podrían jugar un papel fundamental promoviendo la supervivencia de estas células *in vivo*. Por lo tanto la actuación terapéutica sobre estas células podrían ser de utilidad en el tratamiento de los pacientes con LLC-B.

6.4. LLC-B y STAT

A diferencia de los numerosos estudios que implican a la vía JAK/STAT en numerosas neoplasias de estirpe hematológica, en el caso de la LLC-B la implicación de la vía JAK/STAT no está del todo definida.

Puesto que los STAT son los mediadores de la proliferación inducida por diversas citocinas, es frecuente observar la activación constitutiva de diversos STAT en leucemias de crecimiento rápido. En cambio en la LLC-B caracterizada por

INTRODUCCION

una acumulación gradual de los linfocitos provenientes de un clon tumoral, no se ha observado una activación constitutiva de los STAT (*Lin, et al 2000*). Las alteraciones en la señalización por esta vía en la LLC-B deben ser más sutiles que las observadas en otras leucemias. Aunque no se ha observado la fosforilación en residuos tirosina, sí que se ha observado la fosforilación de manera específica de los residuos serina de STAT1 y STAT3 en las células de LLC-B (*Frank, et al 1997*). Aunque la fosforilación en serinas no lleva *per se* a la activación de los STAT, podría amplificar la actividad transcripcional de éstos en respuesta a estímulos fisiológicos producidos por diversas citocinas, como el caso de IL-2 e IL-6, importantes en la función linfocitaria. Por lo tanto la fosforilación constitutiva de residuos serina en los STAT podría contribuir a la acumulación gradual de los linfocitos tumorales tal y como se observa clínicamente en estos pacientes (*Frank 1999*). Son varias las cuestiones que con respecto a esta fosforilación en serinas de los STAT en la LLC-B quedan por ser resueltas. En primer lugar cuál es la serina kinasa que fosforila dichos residuos y si dicha fosforilación es importante en la patogénesis de la LLC-B por su posible modulación sobre la capacidad transcripcional de los STAT o si por el contrario, únicamente se trata de un epifenómeno.

Uno de los campos en lo que se han realizado diversos estudios de la implicación de los STAT en la LLC-B ha sido en relación con varios de los tratamientos que se emplean en esta leucemia. La inmunosupresión producida por la fludarabina se ha asociado con la inhibición específica de STAT1 por parte de esta droga (*Frank, et al 1999*). La inhibición de STAT1 por fludarabina ha sido vista *in vitro* tanto en linfocitos normales sin activar como activados además de en un paciente con LLC-B tratado *in vivo* con fludarabina durante 24 horas en el cual se produce una pérdida prolongada de la activación de STAT1 tras el tratamiento. Recientemente en un trabajo de este mismo grupo, con un número mayor de muestras de LLC-B, la inhibición *in vitro* de STAT1 no es tan clara y en los estudios *in vivo* tras el tratamiento con un ciclo de fludarabina, las células tumorales de la mayoría de los pacientes con LLC-B presenta unos niveles elevados de STAT1 (*Friedberg, et al 2004*).

Otros trabajos en los que se implica a STAT1 con los efectos producidos por diversos tratamientos de la LLC-B han mostrado que STAT1 es necesario en la diferenciación de las células tumorales a células plasmáticas producido por la

INTRODUCCION

briostatina 1 de modo que ésta induce la activación de STAT1 de manera autocrina a través de IFN- γ (Battle and Frank 2003).

La terapia génica con CD154 induce la activación funcional de STAT1 *in vivo* en pacientes con LLC-B sometidos a dicho tratamiento (Battle, et al 2003). Esta activación de STAT1 se asocia con la respuesta clínica e inmunológica favorable observada en estos pacientes debido a la terapia génica con CD154.

Por otra parte se ha observado la existencia de un subgrupo de pacientes con LLC-B caracterizado por un curso clínico agresivo cuyas células son resistentes a la apoptosis *in vitro* inducida por radiación. El análisis de varios genes de las células de este subgrupo de LLC-B empleando técnicas de *microarray*, muestra que uno de los genes que se regula negativamente en las células tumorales es STAT1 (Vallat, et al 2003).

Los STAT también parecen implicados en la regulación de la expresión de CD23, uno de los marcadores típicos de las células LLC-B, que actúa como receptor de la IgE y entre cuyas funciones parece que se encuentran el control del crecimiento y la proliferación de los linfocitos. Parece que STAT6 colabora con los factores NF-AT (*nuclear factors of activated T cells*) en las células de LLC-B para promover la elevada expresión de CD23 propia de estas células (Kneitz, et al 2002).

7. FLUDARABINA

7.1. Generalidades

Los agentes alquilantes han sido durante mucho tiempo la piedra angular de tratamiento de la LLC-B, aunque desde finales de los años 80, cuando se observa la eficacia clínica de los análogos de purinas en la LLC-B (Keating, et al 1989), este tipo de compuestos se han ido usando cada vez más en los pacientes con este tipo de leucemia. Son tres los principales compuestos de esta familia que se usan en el tratamiento de los desordenes linfoproliferativos: 2'-deoxicoformicina (pentostatina, dCF), 2'-cloro-2'-deoxiadenosina (cladribina, 2CdA) y 9- β -D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina (fludarabina, F-ara-A). La pentostatina es un producto de fermentación de *Streptomyces antibioticus* que inhibe de forma específica el enzima ADA mientras que tanto 2CdA como fludarabina, son análogos

INTRODUCCION

sintéticos halogenados de la deoxiadenosina resistentes a la deaminación producida por ADA (*Pettitt 2003*).

Aunque los tres análogos de purinas han mostrado eficacia frente a la LLC-B, el más empleado y con el que se tiene una mayor experiencia en el tratamiento de esta leucemia es con fludarabina (Figura I10.) (*Tallman and Hakimian 1995*). Son varias las pautas y protocolos de tratamiento con fludarabina que se han empleado en la LLC-B. La forma más habitual es el empleo de fludarabina de administración intravenosa a una dosis de 25 mg/m² durante 5 días cada 28 días aunque recientemente ha aparecido la forma de administración oral a una dosis diaria de 40 mg/m² con la misma pauta de administración y cuyos resultados en cuanto a respuesta global y tolerabilidad son equiparables a la forma de administración intravenosa (*Plosker and Figgitt 2003*).

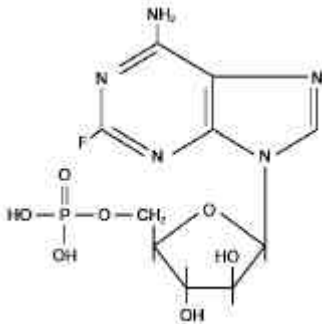


Figura I10. Estructura química de 9-β-D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina (fludarabina, F-ara-A). Fludarabina es un análogo de deoxiadenosina que contiene un átomo de flúor en su molécula.

Son muchos los trabajos en los que se incluyen series más o menos amplias de pacientes previamente tratados o sin tratar con otras drogas que han sido tratados con fludarabina y en los que se analiza la respuesta a este análogo de purinas en comparación con otros agentes terapéuticos empleados en el tratamiento de la LLC-B y son varias las revisiones en las que se analizan los resultados de estos ensayos (*Ferrajoli and O'Brien 2004, Montserrat 2002*). Probablemente uno de los trabajos que incluye una mayor serie de pacientes ha sido el realizado por *Rai* y colaboradores en el que se incluyen 509 pacientes previamente no tratados a los que se les trata únicamente con fludarabina, con clorambucil o con la combinación de ambos (*Rai, et al 2000*). En este trabajo, fludarabina muestra una mayor tasa de remisión global que clorambucil (63% versus 37%) con una mayor tasa de remisión completa (20% versus 4%) y una mayor duración de la remisión (25 meses versus 13 meses). El tratamiento combinado fue suspendido tras comprobar su excesiva toxicidad y que la tasa de respuesta no era mejor que la

INTRODUCCION

del grupo tratado sólo con fludarabina. Aunque la toxicidad observada durante el tratamiento, fundamentalmente mielodepresión e infecciones, fue mayor con fludarabina que con clorambucil y el hecho de que este trabajo puede ser criticado por el uso de una dosis relativamente baja de clorambucil, parece que los análogos de purinas son superiores, al menos conceptualmente, a los agentes alquilantes. Por otra parte, nuevos hallazgos relativos al uso de fludarabina y las complicaciones derivadas de su empleo hacen que el tratamiento en combinación con nuevos agentes terapéuticos como los anticuerpos monoclonales puede abrir nuevas perspectivas en el tratamiento de la LLC-B (*Mavromatis and Cheson 2003, Tallman 2002*).

7.2. Mecanismos de acción

Para comprender la acción citotóxica de los análogos de purinas, es necesario tener en cuenta ciertos aspectos del metabolismo de los nucleósidos. Todas las células mantienen una reserva de deoxinucleótidos para la síntesis de ADN de modo que existe un constante equilibrio entre éstos y sus correspondientes formas no fosforiladas, los deoxinucleosidos. Los deoxinucleosidos están continuamente siendo fosforilados por el enzima deoxicitidina kinasa (DCK) mientras que la conversión de las formas fosforiladas a las formas no fosforiladas está catalizada por el enzima 5'-nucleotidasa (5'-NT). En el caso de la deoxiadenosina, en las células linfoides el equilibrio entre estas dos vías está claramente desplazado a favor de la producción de la forma fosforilada, deoxiadenosina-5'-trifosfato (dATP). Además, la deoxiadenosina puede ser convertida a deoxiinosina por el enzima ADA como paso inicial en el proceso que lleva a la degradación de las purinas. EL enzima ADA es fundamental para limitar la acumulación intracelular de dATP, citotóxico a altas concentraciones, jugando un papel crítico en la supervivencia de las células linfoides.

La muerte celular inducida por fludarabina en las células de LLC-B es debida a un mecanismo de apoptosis (*Robertson, et al 1993*). Los principales mecanismos de acción de la fludarabina para producir la apoptosis de las células tumorales se resumen en la Figura I11.. Entre éstos, el principal mecanismo de acción de fludarabina es la inhibición de la síntesis de ADN (*Plunkett, et al 1990*). De manera similar a otros análogos de nucleósidos, fludarabina debe ser fosforilada para ser

INTRODUCCION

activa (*Tallman and Hakimian 1995*). Fludarabina es fosforilada inicialmente dentro de la célula por el enzima DCK a 2-fluoroadenosina-arabinosido monofosfato (2-fluoro-ara-AMP). 2-fluoro-ara-AMP es secuencialmente fosforilado primero a la forma difosfato (2-fluoro-ara-ADP) por la adenílico kinasa y posteriormente a la forma trifosfato (2-fluoro-ara-ATP) por la nucleósido difosfato kinasa. El compuesto trifosfato es capaz de inhibir la síntesis de ADN al interferir con enzimas que intervienen en este proceso como es el caso de la ADN polimerasa. 2-fluoro-ara-ATP compite directamente con el dATP por la utilización de las ADN polimerasas (*Parker, et al 1988*). Por lo tanto, los niveles celulares de dATP son un factor importante en la acción de 2-fluoro-ara-ATP. Por otra parte, 2-fluoro-ara-ATP se incorpora en el lugar de la adenina y además actúa como un terminador de la cadena de ADN parando la elongación de la hebra hija de ADN en los sitios donde se ha incorporado (*Huang, et al 1990*). Otros enzimas implicados en la síntesis de ADN que son diana de 2-fluoro-ara-ATP son: la ADN primasa que polimeriza ribonucleótidos para formar el cebador de ARN requerido para la iniciación de la replicación de ADN, la ADN ligasa que une el extremo 3'-terminal con el fragmento adyacente de ADN, la ribonucleótido reductasa (RNR) encargada de la reducción de los nucleótidos a deoxinucleótidos y las ADN polimerasas δ y ϵ (*Gandhi and Plunkett 2002*).

La actuación de fludarabina sobre la síntesis de ADN sirve para explicar su mecanismo de acción en las neoplasias cuyas células se encuentran en división. Sin embargo, los análogos de adenosina y concretamente fludarabina han mostrado una importante actividad antitumoral en neoplasias hematológicas indolentes, como en el caso de la LLC-B, cuyas células tienen una tasa baja de proliferación con una replicación de ADN poco activa y por lo tanto con poca capacidad para incorporar 2-fluoro-ara-ATP en la cadena de ADN. La acción inhibitoria de fludarabina sobre enzimas relacionados con el metabolismo del ADN como la dinucleotido reductasa, ADN primasa y ADN ligasa tampoco parecen estar entre las principales acciones sobre las células de LLC-B. Por lo tanto además de su efecto sobre el ADN, fludarabina debe tener otros mecanismos de acción que puedan explicar en todo o en parte su eficacia sobre las células en estado quiescente (*Pettitt 2003*). A continuación se describe los principales mecanismos de acción de fludarabina distintos a su efecto sobre la síntesis de ADN.

INTRODUCCION

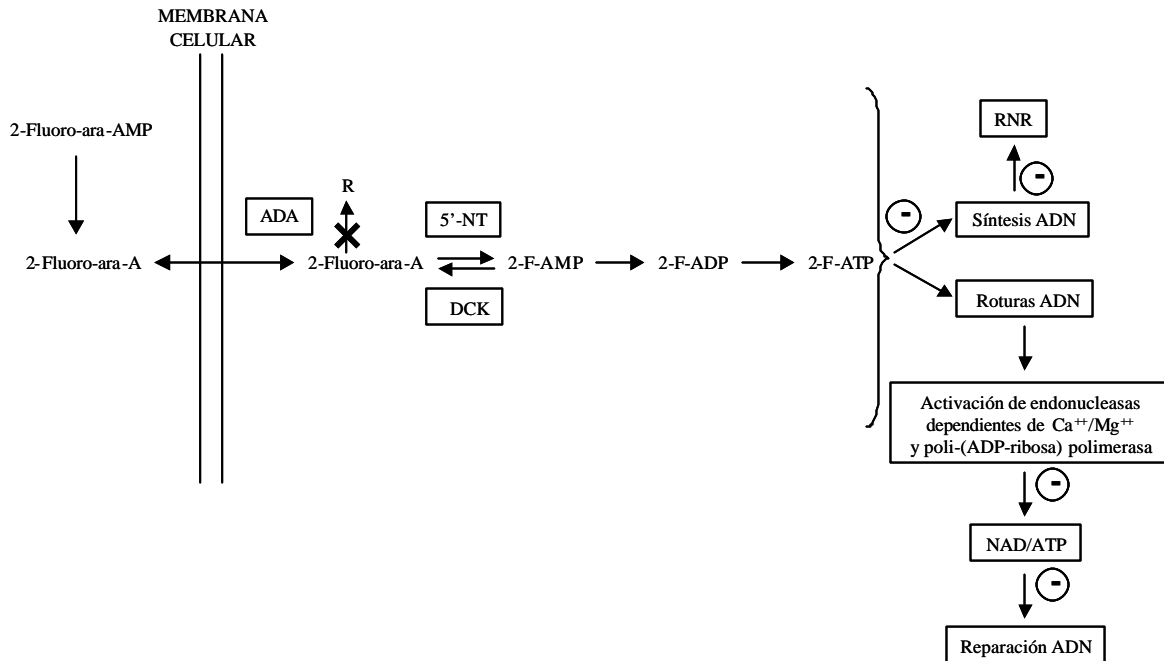


Figura I11. Principales mecanismos de acción de fludarabina. Fludarabina debe ser fosforilada para ejercer su acción en la célula. El equilibrio entre la forma defosforilada (2-Fluoro-ara-A) y la forma monofosfato (2-F-AMP) se debe a los enzimas deoxicitidina kinasa (DCK) y 5'-nucleotidasa (5'-NT). La forma trifosfato (2-F-ATP) es el metabolito activo de fludarabina y es capaz de inhibir la síntesis de ADN actuando sobre enzimas como ADN polimerasas y ribonucleótido reductasa (RNR). Fludarabina también induce roturas en el ADN que activan enzimas como endonucleasas y poli-(ADP-ribosa)-polimerasa que llevan a un consumo de Nicotiamida-Adenosina-Dinucleótido (NAD) y ATP inhibiendo la reparación de ADN.

Entre estos otros mecanismos, F-ara-A es capaz de inhibir el enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y el enzima C-5 ADN metiltransferasa ambos implicados en los procesos de metilación del ADN (Wyczechowska, *et al* 2000).

La inducción de roturas del ADN por parte de los análogos de purinas se ha observado en los linfocitos tumorales de la LLC-B (Begleiter, *et al* 1987) aunque se ha sugerido que en los linfocitos en estado quiescente se están produciendo de manera continuada roturas y reparaciones de su ADN. Se ha postulado la hipótesis de que los análogos de purinas inhiben la reparación de estas roturas espontáneas de ADN teniendo como resultado final la acumulación de éstas. Fludarabina es capaz de inhibir la reparación de la escisión de nucleótidos inducida por distintos agentes físicos y químicos (Li, *et al* 1997a, Sandoval, *et al* 1996). Las roturas del ADN

INTRODUCCION

producidas por la acumulación de dATP inducidas tras la administración de análogos de purinas, llevan a la activación de las endonucleasas dependientes de calcio y de magnesio que a su vez producen posteriores roturas de la doble hebra de ADN (Carson, et al 1984). Las roturas de ADN también activan la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa (PARP) que consume Nicotiamida–Adenosina-Dinucleótido (NAD) y ATP. Cuando se cultivan tanto linfocitos normales como linfocitos tumorales de LLC-B con F-ara-A se produce un descenso tanto de NAD como de ATP que se asocia con un descenso de la viabilidad celular (Brager and Grever 1986). La activación de PARP por parte de los análogos de purinas parece ser el nexo de unión entre la inducción de las roturas de ADN inducida por fludarabina y la subsiguiente depleción de NAD (Seto, et al 1985). En cambio, otros autores han postulado que la activación de PARP es una secuela metabólica de la exposición a fludarabina más que uno de los hechos que contribuyen a la muerte inducida por esta droga (Pettitt, et al 2000). En este caso, la activación de PARP contribuiría a un proceso de necrosis secundario en unas células que ya habrían entrado en un proceso previo de apoptosis inducido por fludarabina más que a la iniciación de la muerte celular.

Por otra parte, cualquier célula, ya sea en estado proliferante o quiescente, requiere de una transcripción activa del ARN necesaria para la síntesis de diversos enzimas y otras proteínas esenciales para la supervivencia celular por lo que una inhibición de la síntesis y la transcripción del ARN puede producir un efecto letal en las células que se encuentran en un estado quiescente como es el caso de la LLC-B. Fludarabina es capaz de incorporarse al ARN (Huang and Plunkett 1986) actuando como terminador de la transcripción e interfiriendo en la función del ARN como modelo para la translación en diversas líneas celulares (Gandhi and Plunkett 2002). Fludarabina es capaz de inhibir la síntesis de ARN, inhibiendo fundamentalmente el enzima ARN polimerasa II (Huang and Plunkett 1991), de modo que en las células de LLC-B esta inhibición conlleva de manera específica la pérdida de su supervivencia (Huang, et al 2000b).

Como ya se ha comentado con anterioridad, otro mecanismo de acción de la fludarabina descrito que podría contribuir a su citotoxicidad en la LLC-B es la inhibición específica de STAT1 por parte de esta droga (Frank, et al 1999). Aunque esta inhibición fue vista en un paciente con LLC-B tratado *in vivo* con fludarabina

INTRODUCCION

durante 24 horas, en un trabajo posterior de este mismo grupo analizando un número mayor de muestras (*Friedberg, et al 2004*), la inhibición *in vitro* de STAT1 observada en el global de los pacientes con LLC-B no resulta tan elevada observándose además una importante variabilidad entre las distintas muestras. En este estudio tras el tratamiento con un ciclo de fludarabina *in vivo*, las células tumorales de la mayoría de los pacientes con LLC-B presentan unos niveles elevados de STAT1 que podrían ser explicados por una ventaja en la supervivencia frente a fludarabina de aquellas células que expresan niveles altos de STAT1.

A pesar de que para los análogos de purinas en general y para fludarabina en particular, son varios los mecanismos de actuación, distintos a su efecto sobre la síntesis de ADN, que se han descrito en su acción sobre células en estado quiescente, la manera de actuación de fludarabina sobre este tipo de células, como es el caso de las de la LLC-B, no está del todo aclarada.

Por último, tal y como ya se ha visto la interacción de las células tumorales de LLC-B con el microambiente que les rodea resulta muy importante para la supervivencia de éstas. Un forma adicional en la que esta interacción con el medio puede mejorar la supervivencia de las células de LLC-B es interfiriendo sobre los mecanismos de acción de las drogas empleadas en el tratamiento. En el caso de los análogos de purinas y concretamente de fludarabina, la interacción CD40-CD40 ligando es capaz de inhibir la muerte celular *in vitro* inducida por la droga (*Romano, et al 2000*). El efecto protector parece mediado por la activación del factor NF- κ B. Esos resultados sugieren que la interacción entre el CD40 de las células de LLC-B y CD40 ligando de los linfocitos T podría contrarrestar el efecto antiapoptótico de fludarabina *in vivo*.

Por otra parte también se ha observado que la interacción de las células de LLC-B con la proteína de matriz extracelular fibronectina a través de interacción con la integrina $\alpha 4\beta 1$, confiere resistencia a la muerte inducida por fludarabina de las células tumorales aumentando los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl- χ_L (*de la Fuente, et al 2002*).

INTRODUCCION

8. TIRFOSTINAS. INHIBIDORES DE TIROSINA KINASAS

8.1. Generalidades

Como ya se ha visto, la activación constitutiva de los STAT en los procesos que llevan a la producción de tumores resulta muy importante. Las tirosina kinasas se encuentran entre las proteínas oncogénicas más frecuentemente activadas en las células tumorales (*Levitzi 1999*). Por lo tanto, no resulta sorprendente que los STAT puedan llegar a estar persistentemente activados en numerosos cánceres debido a la disregulación de las tirosina kinasas encargadas de su activación, entre ellas por supuesto, las JAK kinasas. Este hecho lleva a que la actuación terapéutica sobre las tirosina kinasas sea un campo relevante en el tratamiento del cáncer y por supuesto de las leucemias. La estrategia en la intervención sobre las tirosina kinasas pasa por el diseño de inhibidores específicos de estas proteínas. Entre estos inhibidores se encuentran una familia de moléculas que actúan como inhibidores de la fosforilación en tirosinas y que genéricamente se han denominado tirfostinas. Las tirfostinas son moléculas no peptídicas de bajo peso molecular, biológicamente muy estables, ligeramente hidrofóbicas y con permeabilidad celular.

Las tirfostinas han demostrado su actividad tanto en cultivos celulares como *in vivo*. Su acción antiproliferativa en un cáncer *in vivo* se demuestra por primera vez cuando se observa que la tirfostina RG13022, que inhibe EGFR, es capaz de ralentizar el crecimiento de un carcinoma de células escamosas que sobreexpresa EGFR en un ratón desnudo (*Yoneda, et al 1991*). Desde la demostración de que las tirfostinas pueden actuar como agentes antiproliferativos, el estudio y la aplicación de estas moléculas como agentes terapéuticos en el cáncer se ha ido incrementando (Tabla 18.). Como ejemplo ilustrativo, el uso de uno de estos inhibidores de tirosina kinasas, STI571 (imatinib, Gleevec®) ha sido aprobado en el tratamiento de la LMC y se encuentra en la fase II de ensayos clínicos en pacientes con tumores estromales gastrointestinales inoperables.

INTRODUCCION

Tabla 18. Principales tirfostinas empleadas en clínica.

Tirfostins generated	PTK	Disease(s) implicated
AG 213, RG 13022, AG 1478	EGFR	Cancers
AG 957, AG 1112/AG 1318	Bcr-Abl	chronic myeloid leukemia (CML)
AG 490, AGL 2355	Jak-2	Pre-B acute lymphoblastic leukemia (Pre B-ALL), multiple myeloma
AG 1295/6, AGL 2043	PDGFR	Glioblastomas
AG 538, I-OMe-AG 538	IGF-R	Cancers

Levitzi, A. *Eur J Cancer*, 2002,38 Suppl 5:S11-S18.

Este efecto antiproliferativo también se ha observado en distintos modelos con las tirfostinas AG555 (tirfostina B46) y AG494 (tirfostina B48), dos inhibidores de la ciclina kinasa CDK2. Se ha observado que estas tirfostinas inducen la detención del crecimiento en la fase G1/S en células que sobreexpresan la kinasa EGFR (*Kleinberger-Doron, et al 1998*). AG555 y AG494 además de detener el ciclo celular también son capaces de promover la apoptosis tal y como se ha observado en un modelo en el que se emplean queratinocitos humanos inmortalizados con el virus del papiloma humano 16 (*Ben-Bassat, et al 1997*).

Es interesante la observación de que las tirfostinas además de ejercer *per se* efectos antiproliferativos y por *ende* efectos antitumorales, también son capaces de sinergizar con agentes citotóxicos para inhibir el crecimiento y promover la apoptosis de las células cancerosas.

En el caso de la LLC-B, puesto que se ha descrito el efecto antitumoral derivado de la inhibición de STAT1, el estudio de la acción de los inhibidores de tirosina kinasas sobre las JAK implicadas en la activación de STAT1, puede resultar de interés para conocer mejor el papel que los STAT juegan en la esta leucemia.

8.2. Mecanismos de acción

Son fundamentalmente dos los mecanismos de acción que las tirfostinas tienen para inhibir la acción de las tirosina kinasas (*Levitzi 2002*). Algunas de estas moléculas compiten con el sustrato de la kinasa denominándose por ello *tyrosine mimics* (imitadores de tirosina) (*Yaish, et al 1988*). Otras tirfostinas tienen una acción competitiva con el ATP (*Fry, et al 1994*) mientras que otras, tienen una acción mixta, combinación de las dos anteriores (*Posner, et al 1994*). Resulta interesante para el diseño de estas drogas que muchas de estas tirfostinas que compiten con

INTRODUCCION

el sustrato poseen un anillo aromático en su estructura y pueden ser convertidas a tirfostinas con capacidad para competir con el ATP una vez que el átomo de nitrógeno característico del anillo benceno es incorporado en un segundo anillo.

8.3. AG490

AG490 (tirfostina B42; α -ciano-(3,4-dihidroxi)-N-bencilcinamida; N-bencil-3,4-dihidroxi- α -cianocinamida) (Figura 112.) es una molécula de la familia de las tirfostinas que es capaz de inhibir a JAK2 kinasa (Gazit, et al 1991). Aunque inicialmente se describe como un inhibidor específico para esta JAK kinasa, posteriormente se ha observado que también es capaz de inhibir a JAK3 kinasa (Amin, et al 2003, Wang, et al 1999).

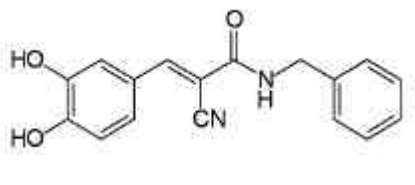


Figura 112. Estructura química de AG490. α -ciano-(3,4-dihidroxi)-N-bencilcinamida: $C_{17}H_{14}N_2O_3$.

La demostración de que AG490 era capaz de erradicar una forma recurrente de LLA cuyas células expresan constitutivamente JAK2 en un modelo de ratón SCID en el que se injertaba este tumor (Meydan, et al 1996), es probablemente la primera prueba de la capacidad terapéutica de esta tirfostina en el tratamiento del cáncer. Desde entonces, tal y como se ha visto en secciones anteriores, AG490 ha sido una molécula que se utilizado en múltiples tipos de tumores y líneas celulares tumorales en los que existe una activación constitutiva de los STAT, sobre todo de STAT3, para inhibir dicha activación e inducir con ello una detención de la proliferación celular y una inducción de la apoptosis de las células tumorales. AG490 también se ha mostrado eficaz en líneas celulares de cáncer de mama y de ovario así como en células de cáncer de próstata en las que el tratamiento con esta tirfostina detiene la proliferación e induce la apoptosis (Ni, et al 2000).

Además, esta tirfostina es efectiva en tumores de estirpe hematológica. Es el caso del mieloma múltiple dependiente de la activación de JAK2 inducida por IL-6 donde AG490 es efectiva tanto en cultivo *in vitro* como *in vivo* (Catlett-Falcone, et al 1999). Algunas líneas celulares leucémicas tanto de estirpe B como T, incluyendo

INTRODUCCION

las que contienen la translocación 11q23 y el cromosoma Filadelfia, también son sensibles al tratamiento con AG490 (Miyamoto, *et al* 2001). En la leucemia de linfocitos grandes granulares el tratamiento con esta tirfostina reduce significativamente la expresión del gen antiapoptótico *Mcl-1* (Epling-Burnette, *et al* 2001).

Resulta interesante destacar que AG490 puede presentar efectos sinérgicos con otras moléculas. En un modelo murino de mieloma múltiple dependiente de IL-6, AG490 tiene sinergismo con IL-12 en sus efectos antitumorales (Burdelya, *et al* 2002). Por otra parte, en la línea celular humana U266 derivada de mieloma múltiple, mientras que AG490 es capaz de aumentar la apoptosis mediada por Fas reduce en cambio la actividad citotóxica de los inhibidores de la topoisomerasa II (Oshiro, *et al* 2001). En esta misma línea celular de mieloma múltiple, AG490 también resulta capaz de sensibilizar a las células resistentes a la quimioterapia frente a otros agentes terapéuticos como cisplatino, adriamicina, vinblastina o fludarabina (Alas and Bonavida 2003).

Por lo tanto, la inhibición de JAK2 parece tener un papel importante en el tratamiento del cáncer considerándola tanto como única vía de actuación como por el sinergismo que puede presentar con otras estrategias terapéuticas.

8.4. WHI-P131

WHI-P131 (*JAK3 Inhibitor I*; 4-(4'-hidroxifenil) amino-6,7-dimetoxiquinazolina) (Figura 113.), se ha descrito como un inhibidor selectivo de la kinasa JAK3 (Sudbeck, *et al* 1999).

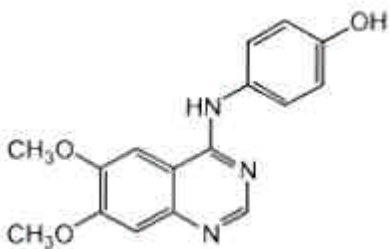


Figura 113. Estructura química de WHI-P131. 4-(4'-hidroxifenil) amino-6,7-dimetoxiquinazolina: $C_{16}H_{15}N_3O_3$.

A diferencia de AG490, el empleo del compuesto WHI-P131 como posible estrategia terapéutica en diferentes patologías de distinta índole ha sido mucho más limitado. Entre las enfermedades en las que se ha estudiado su potencial

INTRODUCCION

terapéutico se encuentra los cuadros de asma (*Wong and Leong 2004*). Entre las células implicadas en la patogénesis de estos cuadros se encuentran los mastocitos. En estas células la inhibición de JAK3 kinasa por WHI-P131 bloquea la activación de la fosfolipasa C, la movilización de calcio y la activación del sistema microtubular producida por la unión del receptor de la IgE con FcεRI. El tratamiento *in vitro* con WHI-P131 de mastocitos tanto humanos como murinos, así como el tratamiento *in vivo* en ratones previene la degranulación y la liberación de mediadores inflamatorios previniendo las reacciones anafilácticas (*Malaviya, et al 1999*).

WHI-P131 también se ha usado en modelos experimentales de otras patologías como la enfermedad tromboembólica donde se ha visto que es capaz de actuar sobre las plaquetas inhibiendo su degranulación inducida por trombina y su agregación (*Tibbles, et al 2001*). Este compuesto también se ha usado en distintos modelos experimentales de enfermedades autoinmunes como diabetes donde disminuye la incidencia de insulinitis (*Cetkovic-Cvrlje, et al 2003*) o en la esclerosis lateral amiotrófica donde retrasa la progresión de la enfermedad (*Trieu, et al 2000*). Además WHI-P131 se ha empleado en modelos de trasplante en los que se ha visto que disminuye la severidad de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) (*Uckun, et al 2002*). Resulta de interés que en este modelo, WHI-P131 presenta un efecto sinérgico con el antimetabolito metotrexate, empleado normalmente en el tratamiento de la EICH.

Respecto al empleo de WHI-P131 como estrategia terapéutica en el tratamiento del cáncer al igual que en otras patologías, los estudios con WHI-P131 no son muy numerosos. Se ha visto que esta droga es capaz de inhibir *in vitro* la migración de las células tumorales así como la adhesión de células de glioblastoma multiforme a distintas proteínas de la matriz extracelular (*Narla, et al 1998*). En cuanto a la acción sobre neoplasias de estirpe hematológica, se ha estudiado sobre todo la acción de WHI-P131 como inductor de apoptosis en células de LLA humanas (*Uckun, et al 1999*). El plasma obtenido de monos tratados con WHI-P131 presenta una importante actividad antileucémica *in vitro* contra células de LLA humanas. Por otra parte, WHI-P131 es capaz de inducir apoptosis en diversas líneas celulares humanas derivadas de leucemias de tipo LLA pre-B que expresan la kinasa JAK3 como es el caso de las líneas NALM-6 y LC1;19 o de inhibir el crecimiento de líneas celulares que expresan JAK3 como las líneas derivadas de leucemias de tipo LLA de células B *Daudi* y Ramos, o en líneas derivadas de

INTRODUCCION

leucemias de tipo LLA de células T como la línea MOLT-3 o derivadas de leucemia de estirpe mieloide como la línea HL-60 (*Sudbeck, et al 1999*). Por último, en líneas celulares derivadas del linfoma anáplásico de células grandes, el tratamiento con WHI-P131 se asocia con apoptosis, con un descenso de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y Bcl-x_L y con la activación de la caspasa 3 (*Amin, et al 2003*).