

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS

**FACTORES DE PROGRESIÓN TUMORAL EN EL  
SARCOMA DE KAPOSÍ: ESTUDIO  
INMUNOHISTOQUÍMICO**

Memoria para optar al Grado de Doctor, presentada por  
Rosa María Penín Mosquera

Barcelona, 2003

Doña MARÍA TERESA FERNÁNDEZ FIGUERAS, Profesora Asociada del Departamento de Ciencias Morfológicas en la Unidad Docente del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, certifica que ha dirigido el trabajo de investigación realizado por doña ROSA MARÍA PENÍN MOSQUERA para optar al grado de doctora.

Finalizado el mismo, solicita su valoración para que pueda ser presentado y defendido ante el tribunal que corresponda.

Barcelona, 14 de mayo de 2002

Fdo.: María Teresa Fernández Figueras

**A ti, Emilio**

**A mis padres**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María Teresa Fernández Figueras quiero agradecerle que haya depositado desde un inicio su confianza en mí para llevar a cabo los artículos que han acabado formando parte de este proyecto de tesis. Asimismo, le estoy agradecida por haber despertado mi interés hacia el complejo aunque apasionante mundo del sarcoma de Kaposi y de la Dermatopatología en general. Gracias Maite.

Al Dr. Aurelio Ariza por ser el detonante en este proyecto de tesis doctoral. Tiene todo mi reconocimiento y agradecimiento no sólo por haber insistido desde mi entrada en el Servicio en la importancia que supone realizar una tesis doctoral, sino también por sus interesantes aportaciones y su gran rigor metodológico, los cuales han constituido un gran ejemplo. Gracias por haber aceptado tutelar esta tesis.

Al Dr. Lluís Puig, por su asesoramiento en los estudios estadísticos, su aportación en la discusión de los dos últimos artículos y la coordinación del estudio de expresión de c-Met en sarcoma de Kaposi. Su ayuda y enseñanzas en el campo de la Dermatología han sido fundamentales para la realización de esta tesis y me estimulan en el aprendizaje del difícil campo de la dermatopatología.

Al Servicio de Dermatología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona y en especial al Dr. Carlos Ferrándiz, Jefe del Servicio de Dermatología. Por su inestimable colaboración en la obtención de muestras de sarcoma de Kaposi, su gran profesionalidad y por ser unos inmejorables colegas.

A todas las personas del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol que han participado de manera directa o indirecta en la ejecución de los trabajos que componen este proyecto de tesis. Al equipo de biólogos y, en particular a Ana Carreras y María Elena Vela. A Ángeles Fernández Vasalo y María José Zujar, responsables de las técnicas de inmunohistoquímica, y al resto de personal del Laboratorio por obtener un resultado óptimo en el procesamiento y tinción del material utilizado en los tres artículos que conforman este proyecto de tesis. A la supervisora Ángeles Alonso por su continua colaboración.

Mi agradecimiento a la CICYT (SAF97/0220), el Dursi (2001SGR400) y a la Red Temática de Cáncer (CO3/10) por su contribución a la financiación del proyecto.

A todo el equipo de facultativos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, que con su paciencia y buen hacer diario me ofrecieron la sólida base de conocimientos sobre patología que ahora poseo. A todos mis compañeros de residencia. Por todos esos buenos y malos ratos compartidos de los que al fin tanto hemos disfrutado. A la Dra. Eva Castellà por ser el ejemplo a seguir. A la Dra. Isabel Ojanguren, al Dr. Juan Carlos Lorenzo y a la Dra. Mariona Llatjós, por apoyarme moralmente y ser siempre la voz de la experiencia.

Al Dr. José Luis Cases y al personal del Servicio de Anatomía Patológica de la Clínica Sagrada Familia de Barcelona por facilitarme en todo lo posible la realización de esta tesis.

A Emilio, mi marido, que ha vivido el día a día de este trabajo, motivándome en todo momento. Por su apoyo técnico, por su amistad y buen humor, por tener siempre una palabra de ánimo y por su interminable paciencia. Sin él no habría sido posible la realización de esta tesis.

A mis padres, que siempre me han alentado a mejorar y a superarme a mi misma.

A toda mi familia y amigos, que han estado a mi lado cuando más lo he necesitado.

Y, finalmente, a todas aquellas personas que han aportado algo a mi vida, tanto personal como profesional. Gracias a todos.

## **ABREVIATURAS**

**ADN** : ácido desoxirribonucleico

**ADR**: adriamicina

**ARN**: ácido ribonucleico

**ARNm**: ácido ribonucleico mensajero

**CAK**: cinasas activadoras de las CDK

**CDK**: cinasa dependiente de ciclina

**CKI**: proteína inhibidora de las cinasas dependientes de ciclina

**c-Met**: receptor tirosín-cinasa del HGF

**CMV**: citomegalovirus

**CXCL13 o BCA-1**: quimocina atrayente de células B-1

**E2F**: factores de transcripción nuclear

**GM-SGF**: factor de crecimiento estimulador de las colonias de macrófagos y granulocitos

**HGF/SF**: factor de crecimiento hepatocitario/factor ubiuo

**ICAM**: molécula de adhesión intercelular

**IFN- $\alpha$** : interferón- $\alpha$

**IFN- $\gamma$** : interferón- $\gamma$

**IL-1 $\beta$**  : interleucina-1 $\beta$

**IL-6**: interleucina-6

**IL-8**: interleucina-8

**kDa** : kilodalton

**LANA 1**: antígeno nuclear asociado a latencia

**MCP-1**: proteína quimioattractiva de los monocitos-1

**MIP-1 $\alpha$** : proteína inflamatoria de los macrófagos-1 $\alpha$

**MIP-2:** proteína inflamatoria de los macrófagos-2

**NO:** óxido nítrico

**PAF:** factor activador de plaquetas

**PCNA:** antígeno nuclear de reparación y replicación del ADN

**PDGF-β:** factor de crecimiento derivado de las plaquetas-β

**PEL:** linfoma asociado a derrames pleurales

**PGI:** prostaciclina

**PIGF:** factor de crecimiento placentario

**Proteína tat:** proteína transactivadora

**RCP:** reacción en cadena de la polimerasa

**SIDA:** síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**SK:** sarcoma de Kaposi

**SK-C:** sarcoma de Kaposi tipo clásico

**SK-SIDA:** sarcoma de Kaposi asociado a SIDA

**TNF-α:** factor de necrosis tumoral-α

**VEB:** virus de Epstein-Barr

**VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular

**VEGFR-3:** receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-3

**VHB :** virus de la hepatitis B

**VHH-8:** virus herpes humano tipo 8

**VHSK:** virus herpes asociado al sarcoma de Kaposi

**VIH-1/2:** virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1/tipo 2

**VPH:** virus del papiloma humano

**VPH-16:** virus del papiloma humano tipo 16

**$\beta$ -FGF o bFGF o FGF-B:** factor de crecimiento de los fibroblastos - $\beta$  o básico

**$\beta$ -HCG:** gonadotropina coriónica humana

# ÍNDICE

I. PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS DE LA TESIS.....	1
1. PRESENTACIÓN DEL TEMA .....	2
2. OBJETIVOS DE LA TESIS .....	8
II. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.....	10
2. FORMAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DEL SK .....	13
2.1. SK CLÁSICO .....	14
2.2. SK ENDÉMICO AFRICANO .....	22
2.3. SK YATROGÉNICO O ASOCIADO A TERAPIA INMUNOSUPRESORA....	25
2.4. SK EPIDÉMICO ASOCIADO A SIDA.....	28
2.5. AFECTACIÓN DE ÓRGANOS INTERNOS: SK EXTRACUTÁNEO .....	37
3. ETIOPATOGENIA.....	41
3.1. UN AGENTE INFECCIOSO EN EL SK.....	43
3.1.1. El virus herpes humano tipo 8 (VHH-8): un virus herpes asociado al SK (VHSK).....	45
3.1.2. El VHH-8 en otras entidades patológicas .....	49
3.1.3. Serología del VHH-8 .....	51
3.1.4. El VHH-8: agente etiológico del SK .....	52
3.2. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR NORMAL.....	55
3.2.1. Sucesos moleculares en el crecimiento celular.....	55
3.2.1.1. Receptores de la superficie celular .....	58
3.2.1.2. Sistemas de transducción de señales.....	58
3.2.1.3. Factores de transcripción .....	59
3.2.2. El ciclo celular y la regulación de la división celular .....	59
3.2.2.1. Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas.....	59
3.2.2.2. El ciclo celular: actividad de los complejos ciclina-CDK .....	61
3.2.2.3. Regulación de los complejos ciclina-CDK.....	65
3.2.2.4. Puntos de control del ciclo celular .....	67
3.2.2.5. Inicio del ciclo celular: colaboración entre los complejos ciclina D-CDK y ciclina E-CDK con las CKI en el punto de transición G1/S.....	70
Funciones de las ciclinas de tipo D.....	70
Los complejos ciclina D-CDK catalíticamente activos contienen subunidades CIP/KIP.....	76
El ensamblaje ciclina D-CDK requiere CKI.....	77
Las proteínas INK4 compiten con las proteínas CIP/KIP para inducir el arresto de la fase G1.....	78
Resumen.....	81
3.3. BASES MOLECULARES EN EL DESARROLLO DE TUMORES .....	83
3.3.1. Definición de oncogenes, protooncogenes y su relación con los virus.....	84
3.3.1.1. Productos proteínicos de los oncogenes .....	86
3.3.2. Genes supresores de tumores o antioncogenes .....	86

3.3.2.1. Productos proteínicos de los genes supresores de tumores.....	87
3.3.3. Alteraciones en los factores de crecimiento.....	87
3.3.3.1. Oncogenes que actúan como factores de crecimiento .....	87
3.3.3.2. Genes supresores de tumores que actúan como factores de crecimiento	88
3.3.4. Receptores de factores de crecimiento de la superficie celular .....	88
3.3.4.1. Oncogenes que actúan como receptores .....	88
3.3.4.2. Genes supresores de tumores que actúan como receptores .....	89
3.3.5. Sistemas de transducción de señales.....	90
3.3.5.1. Oncogenes que actúan como sistemas de transducción de señales.....	90
3.3.5.2. Genes supresores de tumores que actúan como sistemas de transducción de señales .....	91
3.3.6. Factores de transcripción nuclear.....	93
3.3.6.1. El gen <i>c-myc</i> .....	93
3.3.6.2. El gen del retinoblastoma ( <i>Rb</i> ) .....	95
3.3.6.3. El gen del <i>p53</i> .....	99
3.3.7. Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas.....	101
3.3.8. Alteraciones en los genes que regulan la reparación del ADN.....	102
3.3.9. Alteraciones en los genes que regulan la apoptosis.....	103
3.3.10. Los telómeros y el cáncer .....	105
3.3.11. El papel de los virus en el desarrollo de cáncer.....	107
3.4. LAS CITOCINAS, LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y OTRAS MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL SK.....	111
3.4.1. La interleucina-6 viral (v-IL-6).....	113
3.4.2. La v-proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$ (v-MIP-1 $\alpha$ ).....	114
3.4.3. El v-receptor vinculado a la proteína G (v-receptor G).....	114
3.4.4. La interleucina-8 (IL-8) .....	116
3.4.5. La interleucina-1 (IL-1) .....	117
3.4.6. El factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	118
3.4.7. El interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ).....	120
3.4.8. El factor de crecimiento hepatocitario (HGF) .....	122
3.4.9. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG).....	124
3.4.10. El factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF o FGF- $\beta$ ).....	126
3.4.11. El factor activador de las plaquetas (PAF) .....	129
3.4.12. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).....	130
3.4.13. Resumen: citocinas y factores de crecimiento.....	131
3.4.14. Otras moléculas implicadas en el desarrollo del SK.....	132
3.4.14.1. La v-ciclina .....	132
3.4.14.2. El v-bcl-2 .....	137
3.5. PRODUCTOS DEL VIH-1.....	140
3.5.1. Inducción de la producción de citocinas por las células del huésped y síntesis de la proteína tat.....	140
3.5.2. Inducción de la reactivación del ciclo lítico del VHH-8 por el VIH-1 .....	145
3.6. LAS PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LAS CDK (CKI): LA p27 <sup>KIP1</sup> .....	149
3.6.1. La p27 <sup>KIP1</sup> .....	152
3.6.2. La degradación de las moléculas del ciclo celular.....	156
3.6.2.1. El sistema de degradación de proteínas dependiente de la ubiquitina y el complejo proteasoma .....	158
El proteasoma.....	158

La ubiquitinación .....	159
Señalización de las proteínas diana o sustrato .....	163
Función de la vía ubiquitin-proteasoma .....	163
Importancia de la vía ubiquitin-proteasoma .....	164
3.6.2.2. El complejo SCF/p45 <sup>SKP2</sup> ubiquitin-ligasa .....	167
3.6.3. La degradación de la p27 <sup>KIP1</sup> .....	171
3.6.3.1. Regulación de la degradación de la p27 <sup>KIP1</sup> por las CDK .....	176
3.6.3.2. Regulación de la degradación de la p27 <sup>KIP1</sup> por la v-ciclina .....	178
3.6.3.3. Regulación de la degradación de la p27 <sup>KIP1</sup> por la vía ubiquitin- proteasoma: la ubiquitin-ligasa SCF/p45 <sup>SKP2</sup> .....	180
3.6.3.4. Regulación de la degradación de la p27 <sup>KIP1</sup> dependiente de las Cks ....	184
3.6.3.5. Otras vías de degradación de la p27 <sup>KIP1</sup> .....	188
3.6.3.6. Resumen de la degradación de la p27 <sup>KIP1</sup> .....	188
3.6.4. Importancia de la p27 <sup>KIP1</sup> y la p45 <sup>SKP2</sup> en la carcinogénesis.....	193
3.6.5. La p27 <sup>KIP1</sup> y la p45 <sup>SKP2</sup> en el SK.....	200
3.7. MODELO ETIOPATOGÉNICO DEL SK.....	203
4. HISTOPATOLOGÍA .....	209
4.1. ESTADIO MACULAR .....	210
4.2. ESTADIO DE PÁPULA-PLACA .....	214
4.3. ESTADIO NODULAR O TUMORAL .....	219
4.4. CARACTERÍSTICAS CELULARES .....	223
4.5. OTROS COMPONENTES HISTOPATOLÓGICOS .....	224
4.6. VARIANTES HISTOLÓGICAS DEL SK.....	227
5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL HISTOLÓGICO .....	230
5.1. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN LOS ESTADIOS INICIALES .....	231
5.2. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EN LOS ESTADIOS AVANZADOS.....	237
5.3. RESUMEN DE LOS DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES DEL SK .....	241
6. HISTOGÉNESIS: ORIGEN DE LAS CÉLULAS DEL SK .....	243
6.1. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	244
6.2. ULTRAESTRUCTURA .....	248
7. NATURALEZA DEL SK.....	251
8. EVOLUCIÓN Y CURSO CLÍNICO.....	254
9. TRATAMIENTO.....	256
III. RESULTADOS.....	262
1. PRIMER RESULTADO .....	263
DIFFERENTIAL EXPRESSION OF c-Met IN KAPOSII'S SARCOMA ACCORDING TO PROGRESSION STAGE AND HIV INFECTION STATUS .....	263
1.1. ABSTRACT.....	264
1.1. ABSTRACT.....	264
1.2. INTRODUCTION .....	265
1.3. MATERIAL AND METHODS .....	267
Human tissue samples.....	267
Antibodies and immunohistochemical studies.....	268

Statistical analysis.....	270
1.4. RESULTS .....	271
1.5. DISCUSSION .....	278
1.6. REFERENCES .....	281
2. SEGUNDO RESULTADO .....	285
DECREASED IMMUNOREACTIVITY FOR CELL-CYCLE REGULATOR p27 <sup>KIP1</sup>	
IN KAPOSI'S SARCOMA CORRELATES WITH HIGHER STAGE AND	
EXTRACUTANEOUS INVOLVEMENT .....	
2.1. ABSTRACT.....	286
2.2. INTRODUCTION .....	288
2.3. MATERIALS AND METHODS.....	291
Human tissue samples.....	291
Antibodies and immunohistochemical studies.....	293
Statistical study .....	295
2.4. RESULTS .....	296
2.5. DISCUSSION .....	306
2.6. REFERENCES .....	311
3. TERCER RESULTADO .....	317
OVER-EXPRESSION OF P45 <sup>SKP2</sup> IN KAPOSI'S SARCOMA CORRELATES WITH	
HIGHER TUMOR STAGE AND EXTRACUTANEOUS INVOLVEMENT BUT IS	
NOT DIRECTLY RELATED TO P27 <sup>KIP1</sup> DOWN-REGULATION.....	
3.1. ABSTRACT.....	318
3.2. INTRODUCTION .....	319
3.3. MATERIALS AND METHODS.....	323
Human tissue samples.....	323
Antibodies and immunohistochemical studies.....	325
Statistical study .....	327
3.4. RESULTS .....	328
3.5. DISCUSSION .....	338
3.6. REFERENCES .....	342
IV. DISCUSIÓN .....	348
1. EXPRESIÓN DEL C-MET EN EL SK .....	349
2. EXPRESIÓN DE LA P27 <sup>KIP1</sup> EN EL SK.....	362
3. EXPRESIÓN DE LA P45 <sup>SKP2</sup> EN EL SK .....	371
V. CONCLUSIONES .....	382
1. CONCLUSIONES SOBRE LA EXPRESIÓN DEL c-Met.....	383
2. CONCLUSIONES SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA p27 <sup>KIP1</sup> .....	384
3. CONCLUSIONES SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA p45 <sup>SKP2</sup> .....	386
VI. BIBLIOGRAFÍA .....	388

“Nosotros, los que adoptamos como guía lo probable y que no podemos ir más allá de donde aparece lo verosímil, estamos preparados para refutar sin obstinación y para ser refutados sin ira”.

(Disputaciones tusculanas, II.11)

MT Cicerón (106 aC- 43 aC)

# **I. PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS DE LA TESIS**

## **1. PRESENTACIÓN DEL TEMA**

El Sarcoma de Kaposi (SK) es una enfermedad angioproliferativa con una patogenia compleja en la que se encuentran involucrados múltiples factores, como las citocinas inflamatorias, los factores de crecimiento angiogénicos y los productos virales; y todo ello en el contexto de una inmunosupresión variable del huésped.

Existe una relación directa entre el desarrollo del SK y la infección por el VHH-8, que pone en marcha una respuesta humoral de carácter inflamatorio y proliferativo en las fases iniciales, y oncogénica en las fases posteriores, lo que en último término explica cómo en los estadios avanzados el SK puede llegar a comportarse como una verdadera neoplasia diseminada.

La inmunosupresión, en la que tiene un papel destacado la infección por el VIH-1, es también un factor desencadenante en el desarrollo del SK, como se ha demostrado por la frecuente aparición del SK en los pacientes con SIDA, en los que además la enfermedad muestra un comportamiento mucho más agresivo en comparación con la forma clásica.

El diferente comportamiento biológico de las formas clínico-epidemiológicas y la evolución en estadios del SK parecen estar estrechamente relacionados no sólo con el grado de respuesta inmune del huésped, sino también con la presencia de alteraciones específicas en los mecanismos que controlan el crecimiento celular y el desarrollo tumoral. La sobreestimulación por parte de las citocinas y los factores de crecimiento, la alteración de las redes de oncoproteínas y genes supresores de tumores reguladores del ciclo celular y

de la muerte celular programada parecen ofrecer los estímulos necesarios para el desarrollo, progresión y, en último término, un comportamiento más agresivo del SK.

El factor de crecimiento hepatocitario o HGF es un potente factor angiogénico que actúa a través de un receptor tirosin-cinasa transmembrana denominado c-Met. Sus principales acciones son estimular la motilidad, la proliferación y la invasividad de las células epiteliales y cancerígenas, tanto de forma directa como indirecta, induciendo la expresión de otros factores angiogénicos como el VEGF.

Diversos estudios han mostrado que el HGF está sobreexpresado en neoplasias humanas invasivas en comparación con las formas no invasivas y con los tumores benignos. En este contexto, es lógico pensar que el HGF puede funcionar como un factor de progresión tumoral, no sólo por la estimulación de la angiogénesis, sino también por la estimulación de la invasividad celular. Adicionalmente, alteraciones en el gen que codifica el c-Met podrían transformarlo en un oncogén, potenciando y modificando la actividad del HGF.

Recientemente se han identificado niveles elevados de expresión de HGF y de su receptor c-Met en células fusiformes del SK cultivadas a partir de lesiones humanas. Si estas células sintetizan y secretan HGF biológicamente activo, es posible que éste sea uno de los factores responsables de la proliferación y neovascularización tan características del SK, conjuntamente con la acción coadyuvante del resto de citocinas inflamatorias. De todos modos, aunque se han identificado niveles de expresión elevados de HGF y c-Met en las células del SK, hay muy poca información que haga referencia a su expresión respecto a los diferentes estadios del SK.

Estudios previos han mostrado que alteraciones en la expresión de las moléculas que toman parte en el control del ciclo celular y la apoptosis, pueden estar relacionados con la progresión tumoral del SK. La progresión a través del ciclo celular está gobernada por una serie de cinasas dependientes de ciclina (CDK) que, como su propio nombre indica, se activan mediante su unión con ciclinas. La actividad de los complejos ciclina-CDK se encuentra modulada en primer lugar por la concentración de ciclinas, en segundo lugar por fosforilación directa y, finalmente, a través de proteínas inhibidoras específicas de las CDK denominadas genéricamente CKI. Aunque se han descrito un gran número de estas proteínas, las más importantes son la p21<sup>CIP1</sup>, la p27<sup>KIP1</sup> y la p16<sup>INK4a</sup>.

Una de las principales acciones del CDK p27<sup>KIP1</sup> es inhibir la proliferación celular uniéndose a los complejos ciclina-CDK de la fase G1 y, por lo tanto, regulando negativamente la progresión del ciclo celular en las fases G1, S y en la transición entre ambas. A su vez, múltiples factores modulan la expresión de p27<sup>KIP1</sup>, entre ellos los propios complejos ciclina-CDK a los que inhibe.

Se ha sugerido que la pérdida de la expresión y actividad de la proteína p27<sup>KIP1</sup> puede provocar el desarrollo y/o la progresión tumoral. Este hecho se ha objetivado por la detección de una disminución de su expresión en una gran variedad de neoplasias humanas, siendo ésta mucho más pronunciada en las metástasis en comparación con los tumores primarios, lo que podría indicar que la disminución de la expresión del p27<sup>KIP1</sup> sería además un factor favorecedor de la diseminación metastásica.

Estudios etiopatogénicos sobre el SK han mostrado la presencia activa de dos virus en el desarrollo esta enfermedad: el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 (VIH-1) en las formas asociadas a SIDA y el virus herpes humano tipo 8 (VHH-8). Entre las contribuciones a la oncogénesis de estos dos microorganismos destacan dos elementos. En primer lugar, la proteína tat del VIH-1 cuyas acciones en el medio humoral parecen ser las responsables del alto grado de agresividad del SK-SIDA en comparación con las otras formas clínico-epidemiológicas tal y como veremos posteriormente.

Y en segundo lugar, el VHH-8 posee secuencias genómicas capaces de codificar moléculas homólogas a algunas de las proteínas reguladoras del ciclo celular, como la v-ciclina o ciclina K, un homólogo de la ciclina-D de fase G1. La v-ciclina es capaz de unirse a la cinasa dependiente de ciclina 6 humana (CDK6) formando un complejo resistente a la inhibición de las CKI y que ejerce su acción en el ciclo celular mediante la fosforilación de diversas proteínas del ciclo, entre ellas la p27<sup>KIP1</sup>. La fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> permite el inicio de una secuencia de eventos que finalizarán con la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> a través de la vía ubiquitin-proteasoma y, por lo tanto, con una disminución de su concentración y actividad en la célula.

Los dos principales pasos en la vía ubiquitin-proteasoma son la unión de múltiples moléculas de ubiquitina a un sustrato proteínico y la degradación a través del proteasoma. La transferencia de la ubiquitina al sustrato requiere al menos la colaboración de dos enzimas denominados genéricamente E1 y E2. No obstante, en muchas ocasiones se requiere la colaboración de un tercer componente denominado enzima E3, que forma un complejo con la E2 específico de sustrato y que recibe el nombre de ubiquitin-ligasa.

El complejo proteínico SKP1/CDC53/F-box (SCF) es una ubiquitin-ligasa recientemente descrita, y parece ser específica para la degradación de varias proteínas reguladoras clave del ciclo celular, como por ejemplo la p27<sup>KIP1</sup>. Uno de los componentes específicos responsable de la especificidad de sustrato del complejo SCF es la proteína F-Box p45<sup>SKP2</sup>. La p45<sup>SKP2</sup> se expresa en la fase G1 tardía y permite el traslado del complejo SCF/p45<sup>SKP2</sup> al interior del núcleo, donde promueve la ubiquitilación de la p27<sup>KIP1</sup> fosforilada, permitiendo así su posterior reconocimiento y degradación a través del proteasoma. Aparte de la proteólisis de moléculas relacionadas con el ciclo celular, la p45<sup>SKP2</sup> también induce la fase S en las células quiescentes y se ha identificado sobreexpresada en las células transformadas.

Teóricamente, los niveles bajos de la p27<sup>KIP1</sup> pueden ser debidos a una reducción transcripcional y translacional, o bien a un exceso de degradación post-transcripcional, ya que las mutaciones en el gen del p27<sup>KIP1</sup> parecen ser sucesos excepcionales. Diversos estudios han mostrado que el nivel post-transcripcional es el más relevante. Basándonos en esto, es lógico pensar que la disminución de la expresión de la p27<sup>KIP1</sup> puede ser debida a un incremento en la actividad del complejo encargado de su degradación, el SCF/p45<sup>SKP2</sup>.

En el caso específico que nos ocupa, el sarcoma de Kaposi, y teniendo en cuenta lo comentado respecto a la acción de la v-ciclina del VHH-8, la degradación incrementada de la p27<sup>KIP1</sup> podría ser secundaria a una fosforilación masiva por parte de la CDK6. De este modo, el complejo SCF/p45<sup>SKP2</sup> actuaría simplemente ejerciendo su acción fisiológica, es decir, permitiendo la ubiquitilación de proteínas marcadas para su degradación mediante fosforilación. Consecuentemente, sería de esperar que en el SK los niveles de expresión de

la p27<sup>KIP1</sup> se encontraran disminuidos y los niveles de expresión de la p45<sup>SKP2</sup> aumentados, puesto que ésta debe hacer frente a un grado mayor de degradación al habitual.

Aunque la pérdida de expresión de la p27<sup>KIP1</sup> no parece ser un proceso crucial en el desarrollo del SK, la pérdida del control inhibitorio de las proteínas reguladoras del ciclo celular parece constituir un factor de progresión carcinogénica importante, no sólo en el SK sino también en un gran número de tumores humanos mucho más comunes. De hecho, varios estudios han correlacionado la expresión de la p27<sup>KIP1</sup> y de la p45<sup>SKP2</sup> con el pronóstico de algunas neoplasias humanas, identificándolos como factores pronósticos independientes.

Teniendo en cuenta los antecedentes comentados, nos planteamos la posibilidad de evaluar la expresión inmunohistoquímica del receptor c-Met, de la proteína inhibidora de las CDK p27<sup>KIP1</sup> y del componente p45 del complejo SCF/p45<sup>SKP2</sup> en los diferentes estadios de la variante clásica y asociada a SIDA del SK. El estudio se ha realizado en las lesiones del SK obtenidas de forma retrospectiva a partir de biopsias cutáneas y extracutáneas fijadas en formol e incluidas en parafina, procedentes de pacientes con SK-C y SK-SIDA, correspondientes a los archivos de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y del Hospital Prínceps d'Espanya de Barcelona.

## **2. OBJETIVOS DE LA TESIS**

1. Determinar la expresión inmunohistoquímica del c-Met (receptor del HGF) en las formas clásica y asociada a SIDA del SK.
2. Determinar el nivel de expresión inmunohistoquímica de la p27<sup>KIP1</sup> en las lesiones de la forma clásica del SK en comparación con la forma asociada a infección por VIH, y las posibles alteraciones o modificaciones de su expresión en la afectación cutánea y extracutánea en relación con un comportamiento más agresivo del SK.
3. Estudiar la expresión de la p45<sup>SKP2</sup> en las diferentes formas y estadios del SK, con el objetivo de determinar cómo se encuentra alterada su expresión en las lesiones agresivas del SK y explorar la posible relación de la expresión de la p45<sup>SKP2</sup> con la disminución de la p27<sup>KIP1</sup> y otras variables, como son la expresión del Ki67, el género y la infección por el VIH.

## **II. INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA**

En el año 1872, Moritz Kaposi describió por primera vez cinco casos de un raro tumor cutáneo localizado principalmente en la piel de las extremidades inferiores, multifocal y simétrico, y con un curso clínico lentamente progresivo e indolente. La enfermedad afectaba principalmente a varones de edad avanzada pertenecientes a la etnia judía, o bien a individuos originarios del este de Europa o de la cuenca mediterránea. Este patrón clínico-epidemiológico inicial se reconoce como la forma clásica de la enfermedad que originalmente fue denominada por Kaposi como “sarcoma pigmentado múltiple idiopático de la piel”, y que actualmente se designa con el epónimo de sarcoma de Kaposi (SK).

Durante muchos años se ha considerado como un tumor poco común, a pesar de que posteriormente se ha descrito afectando a otros grupos poblacionales: de forma endémica en los individuos de raza negra del África ecuatorial, y también en pacientes con estados de inmunodeficiencia inducida farmacológicamente, como por ejemplo, los receptores de trasplantes. Pese a todo, el sarcoma de Kaposi había alcanzado poco interés en la comunidad médica mundial.

Esta situación cambia dramáticamente a partir de 1981, cuando comienzan a describirse un gran número de casos de SK en varones jóvenes homosexuales y, en menor grado, en los adictos a drogas por vía parenteral. El incremento de su incidencia fue de tal magnitud durante las pasadas décadas que alcanzó proporciones epidémicas y acabó reconociéndose como uno de los principales marcadores clínicos de una nueva enfermedad que padecía de

forma predominante este grupo epidemiológico: el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Desde su descripción y atendiendo a todos estos nuevos datos, el SK ha sido clasificado básicamente en cuatro subtipos: clásico (SK-C), africano o tipo endémico, asociado a terapia inmunosupresora, y asociado a SIDA (SK-SIDA) o tipo epidémico. Actualmente, el tipo de SK diagnosticado con más frecuencia es el asociado a la infección del VIH-1. Aunque con distintas presentaciones clínicas, contextos epidemiológicos y pronósticos, el examen microscópico ha mostrado que se trata de una tumoración de origen angioproliferativo, compuesta por vasos y células fusiformes, con una apariencia histopatológica bastante uniforme en los cuatro tipos descritos.

Evidentemente, todos estos datos han originado un considerable interés por el SK en diferentes campos de estudio, y por ello se encuentra actualmente en una situación de vanguardia investigadora.

El hecho de que hasta hacía poco tiempo el SK era una lesión poco común, había impedido dilucidar de forma completa la etiopatogenia e histogénesis de esta enfermedad, hasta ese momento casi totalmente desconocidas. La aparición de un gran número de casos en relación a la epidemia del SIDA permitió profundizar en el conocimiento de sus aspectos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos, originado un profundo impacto en el estudio del SK.

Aunque todavía no se ha podido establecer definitivamente la naturaleza precisa del SK (hiperplasia o neoplasia), recientes investigaciones genéticas, epidemiológicas, clinicopatológicas, bioquímicas y moleculares han contribuido de gran manera a la aceptación general de que el SK es una enfermedad causada por el VHH-8 y amplificada por el VIH-1 en los casos asociados a SIDA. Asimismo, parece ser que el crecimiento y mantenimiento del SK depende de una compleja serie de interacciones entre productos bioquímicos del huésped y del virus infectante y, por lo tanto, su curso evolutivo está fuertemente influenciado por el estado inmune del paciente.

De todas formas, quedan aún un gran número de facetas desconocidas del SK que todavía hoy no poseen una explicación científica adecuada y deben ser definidas, como los aspectos epidemiológicos, la transmisión y, finalmente, los mecanismos mediante los cuales los factores etiológicos, genéticos, inmunológicos y endocrinos influyen en su patogenia.

## **2. FORMAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS DEL SK**

El SK es una enfermedad de distribución mundial en la que se reconocen, desde un punto de vista epidemiológico y clínico, cuatro variantes relativamente distintas (Tappero 1993; Fitzpatrick 1999; Odom 2000; Ablashi 2002):

- la forma clásica
- la forma africana o endémica
- la forma yatrogénica o asociada a terapia inmunosupresora
- la forma asociada a SIDA o epidémica

## 2.1. SK CLÁSICO

El SK clásico lo describió por primera vez Moritz Kaposi en 1872, afectando primariamente a ancianos del Este de Europa, predominantemente Polonia y Rusia, y de la cuenca mediterránea, especialmente a judíos Ashkenazi. Actualmente esta distribución se mantiene, documentándose además unas largas series de pacientes en países del Norte de Europa (Suecia y Noruega). La incidencia aumentada en la población judía y en individuos de origen mediterráneo sugiere una predisposición racial, lo que se traduce en que tal vez los factores genéticos jueguen un papel crítico en la etiopatogénesis del SK. Algunos estudios han intentado vincularlo a ciertos haplotipos del antígeno leucocitario humano (HLA-DR5 y HLA-B18), no obstante estos hallazgos no se han confirmado y, de hecho, no se conoce actualmente un marcador HLA específico del SK. Pese a todo, la ocurrencia familiar es un suceso muy raro (Kaloterakis 1995).

Aunque no existen datos epidemiológicos precisos disponibles, la incidencia anual mundial del SK clásico ha sido estimada entre un 0,02% y un 0,06% de todos los tumores.

La llamada forma clásica del SK afecta predominantemente a hombres con una relación varón/hembra muy variable en las distintas series (15:1, 3:1 o incluso 1:1). El inicio del SK se presenta en un amplio rango de edad que oscila entre la tercera y la novena década. El pico de incidencia se encuentra entre la sexta y la séptima década, con una media de edad de 65 años. Debido a su inicio tardío y a su curso prolongado (duración media de 3 a 8 años), es frecuente que los pacientes con esta forma del SK desarrollen otras enfermedades intercurrentes asociadas con la edad avanzada.

En el SK clásico, la enfermedad comienza comúnmente como múltiples máculas y pápulas rojizas, violáceas o negruzcas, localizadas en las porciones distales de la extremidad inferior, predominantemente en la piel de las puntas y plantas de los pies (**Imagen 1**). En la mayoría de los casos, estas lesiones iniciales se incrementan lentamente en tamaño y número, expandiéndose y coalesciendo para formar placas (**Imagen 2**) o nódulos dérmicos azulados que progresan por la extremidad hacia localizaciones más proximales. Focalmente, las lesiones solitarias pueden adquirir una apariencia pedunculada o polipoide, formando tumores nodulares o fungiformes parecidos al granuloma piógeno (**Imagen 3A y 3B**). En algunos pacientes podemos encontrar simultáneamente diferentes estadios evolutivos de la enfermedad (Weiss 2001).

La consistencia de las lesiones cambia con la duración de la enfermedad. Mientras que las lesiones tempranas y angiomatosas son blandas y esponjosas al tacto, los tumores de larga evolución son firmes y gomosos. Asimismo, a medida que las lesiones envejecen, se vuelven de color marrónáceo, apreciándose una superficie verrucosa e hiperqueratósica (Requena 1998). Ocasionalmente las lesiones pueden ulcerarse y mostrar cambios eczematosos, especialmente si existe dermatitis de éstasis asociada concomitante.

Frecuentemente las lesiones de SK, sobre todo las iniciales, van acompañadas por un edema de la extremidad, que ocasionalmente puede preceder a la aparición de las lesiones, y que se ha interpretado como una afectación por el tumor de las partes profundas o ganglionares. Inicialmente este edema es parcheado, pero gradualmente se transforma en un agrandamiento e hinchazón difusa y fibrosa (linfedema) de las extremidades inferiores,

pudiendo afectar a todo el pie y a la pierna, y extenderse hasta la ingle causando una considerable incomodidad.

Finalmente, la distribución de las lesiones adquiere un patrón multifocal diseminado que se extiende de forma centrípeta afectando a la cabeza, tronco y extremidades superiores. Adicionalmente a las lesiones cutáneas, el SK-C puede desarrollarse en varias membranas mucosas, especialmente en la cavidad oral y en los genitales.

En los estadios finales en los que existe una amplia extensión de las lesiones cutáneas, es común la enfermedad visceral. No obstante, suele pasar desapercibida al ser asintomática. Es frecuente identificar lesiones de SK como hallazgos incidentales en la necropsia de estos pacientes en los ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal y pulmones. De hecho, las lesiones gastrointestinales aparecen en más del 90% de los pacientes con SK clásico. Raramente la afectación visceral precede al desarrollo de las lesiones cutáneas, ni aparece en su ausencia.

El SK-C manifiesta una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de un segundo tumor maligno y con un estado de inmunidad alterado (Safai 1980; Piette 1987). Varios estudios indican que casi un tercio de los pacientes con SK clásico poseen un riesgo significativamente incrementado de desarrollar neoplasias secundarias, sobre todo de origen linforreticular, si se comparan con la población sana de la misma edad. El riesgo de desarrollar una neoplasia linforreticular es 20 veces mayor en los pacientes con SK que en la población normal. El SK-C se asocia principalmente con los linfomas malignos (enfermedad de Hodgkin y linfoma no hodgkiniano, sobre todo linfoma de células T),

leucemias, mieloma múltiple y, con menor frecuencia, con aplasias de la serie roja y anemias hemolíticas autoinmunes.

El SK clásico sigue un curso clínico prolongado. Generalmente se desarrolla muy lentamente y por ello suele seguir un curso bastante benigno, incluso cuando existe afectación simultánea de localizaciones extracutáneas. Infrecuentemente, pueden aparecer cursos fulminantes de la enfermedad, con diseminación sistémica y afectación de las principales vísceras internas como pulmones, bazo, corazón y tracto gastrointestinal (Fitzpatrick 1999).

En algunos casos puede haber períodos de remisión de la enfermedad y regresión espontánea de las lesiones, principalmente en los estadios iniciales, donde las lesiones pueden involucionar dejando una cicatriz atrófica e hiperpigmentada (Odom 2000).

Los pacientes pueden sobrevivir entre 10 y 20 años, y la muerte es debida generalmente a otras causas.



**Imagen 1:** SK clásico / Mácula. En la planta del pie se aprecia una lesión plana irregular y rosada.



**Imagen 2:** SK clásico / Placa. Lesiones sobreelevadas, geográficas y congestivas en la piel correspondiente al dorso de los dedos y pie.



**Imagen 3A:** SK clásico / Tumor. Nódulo congestivo y de consistencia elástica en piel de tercio distal de la pierna.



**Imagen 3B:** SK clásico / Tumor. Aspecto macroscópico de la pieza quirúrgica correspondiente a la lesión mostrada en la imagen 3A. Lesión polipoide y angiomatosa afectando a dermis y tejido celular subcutáneo.

## 2.2. SK ENDÉMICO AFRICANO

La presentación endémica del SK en el África ecuatorial se describió por primera vez en los años 50, precediendo en varias décadas al brote pandémico del SIDA. El SK es un tumor común en los africanos de color; en el Sur de África se ha estimado que el SK es 10 veces más frecuente en la raza negra que en la blanca. El África subsahariana o ecuatorial es la zona más afectada, sobre todo el noroeste del Congo, este del Zaire, oeste de Uganda y en Burundi-Rwanda en donde se observa una mayor prevalencia, mientras que en el oeste y sur de África está menos extendido.

Su incidencia entre las malignidades histológicamente registradas en África es muy variable según la zona, describiéndose unas proporciones que oscilan entre el 1,3% y el 4%, y entre el 9% y el 10%. Por ejemplo, en el registro de tumores de Kampala (Uganda), el SK representa aproximadamente la mitad de todos los tumores consignados (Wabinga 1993).

Los estudios epidemiológicos indican una clara prevalencia de los pacientes varones, con una relación varón/hembra de 10 a 1 ó de 18 a 1 en adultos, según las diferentes series, siendo la media de edad en el momento de inicio de 36 años para las mujeres y de 48 años para los hombres. En los niños la relación varón/hembra es de 3 a 1 y la enfermedad es particularmente prevalente en la tribu Bantú de Sudáfrica (Cotran 1999), siguiendo la misma distribución geográfica que el linfoma de Burkitt, aunque aún no existen datos que permitan establecer vínculos etiopatológicos entre ambas entidades.

La evolución clínica del SK endémico está en relación con la edad de los individuos afectados. En contraposición a los hombres, en las mujeres la enfermedad sigue un curso clínico más rápido con una generalización más temprana. En los niños, el SK africano generalmente sigue un curso fulminante, con una diseminación rápida a las vísceras internas.

Basándonos en los hallazgos clinicopatológicos, el SK africano endémico se clasifica en tres subtipos: nodular, florido-infiltrativo y linfadenopático (Taylor 1971; Templeton 1981).

El subtipo más común corresponde a la variante nodular, que generalmente afecta a adultos jóvenes y sigue inicialmente un curso clínico semejante al del SK clásico.

La variante florida-infiltrativa se caracteriza por un comportamiento biológico más agresivo. Suele iniciarse de la misma forma que la variante nodular, pero en su evolución las lesiones cutáneas son fungoides, elevadas, y más extensas e infiltrativas, ya que se extienden profundamente infiltrando además de la dermis, el tejido celular subcutáneo, e incluso el plano muscular y óseo subyacentes.

En contraste con los subtipos anteriores, la variante linfadenopática afecta predominantemente a niños menores de 10 años y, como su propio nombre indica, se caracteriza por una afectación de los ganglios linfáticos. Estos pacientes presentan típicamente linfadenopatías localizadas o generalizadas, sobre todo de las cadenas ganglionares cervical e inguinal. Ocasionalmente, se puede observar afectación de la piel,

de las membranas mucosas, y también de los tejidos oculares y glándulas salivales. Las lesiones mucocutáneas son tardías, escasas y, en general, un hallazgo de poca relevancia clínica. Este subtipo de la enfermedad tiene mal pronóstico. Su curso es agresivo y fulminante debido a la tendencia a la afectación interna y a la juventud de los pacientes, acabando generalmente con una muerte temprana 2 ó 3 años después del inicio de la enfermedad.

### **2.3. SK YATROGÉNICO O ASOCIADO A TERAPIA INMUNOSUPRESORA**

La inmunosupresión inducida por fármacos incrementa el riesgo de desarrollar linfomas y otros tumores, incluyendo el SK. Con la introducción de las terapias inmunosupresoras, el SK se ha descrito con una frecuencia aumentada principalmente en receptores de órganos trasplantados, en individuos con determinadas enfermedades autoinmunes crónicas (Klein 1974; Leung 1981) y, esporádicamente, en pacientes con cáncer a los que se les ha administrado cierta quimioterapia citotóxica.

De todas formas, se trata de una complicación rara, ya que el SK yatrogénico o asociado a inmunosupresión farmacológica representa aproximadamente el 0,5% de las neoplasias que se desarrollan en los pacientes con trasplantes de órganos (Farge 1993). Aparece más comúnmente en pacientes con trasplante renal en comparación con los que reciben trasplante cardíaco o hepático. En dos estudios recientes la prevalencia del SK en los pacientes con trasplante renal oscilaba entre el 0,3% y el 1,6% (Montagnino 1994; Pedagogos 1994), y en los receptores de trasplante cardíaco la prevalencia era del 0,41% (Frances 1991).

El desarrollo del SK se ha observado tanto en pacientes que han recibido terapia inmunosupresora convencional (p.e., glucocorticoides y azatioprina) como en pacientes que han recibido ciclosporina. Sin embargo, la incidencia del SK es de dos a cuatro veces mayor y el inicio de la enfermedad es mucho más temprano tras el tratamiento con ciclosporina (media, 20 meses) que tras el tratamiento con terapia inmunosupresora convencional (media, 60 meses) (Penn 1991).

Hay datos contradictorios sobre qué tipo de alteración inmunitaria incrementa el riesgo de padecer SK. Parece ser que la extensión de las lesiones de SK se ha correlacionado en algunos casos con la pérdida de inmunidad celular. Por otro lado, la ciclosporina actúa suprimiendo potentemente la función de las células T de vigilancia y mantenimiento de la inmunidad normal. Este hallazgo sugiere que el nivel de inmunidad mediado por las células T se encuentra afectado en los casos de SK secundarios al tratamiento con ciclosporina.

Epidemiológicamente la incidencia del SK yatrogénico varía dependiendo de la población originaria del paciente, ya que es más frecuente en individuos inmunodeprimidos del área mediterránea, sobre todo árabes, judíos y descendientes africanos. De hecho, en los países occidentales la incidencia del SK postrasplante es menor del 1%, mientras que en los orientales se acerca al 4%. Esto sugiere que un trasfondo genético puede influenciar el riesgo postrasplante de desarrollar la enfermedad. Esta distribución poblacional se correlaciona con la incidencia y distribución de la seroprevalencia del VHH-8, apoyando la causalidad de este virus en el SK (Shmreli 1989; Qunibi 1993).

En el SK asociado a inmunosupresión se mantiene la preponderancia masculina observada en las otras variantes del SK, de 3:1 a 7:1, según series, siendo sin embargo menos marcada que en la forma clásica. No obstante, se ven afectados grupos de edad mucho más jóvenes que en esta última.

Las lesiones del SK pueden aparecer tras un período de tiempo variable que oscila entre las primeras semanas, varios meses o incluso años después del inicio de la terapia

inmunosupresora (media, 16 meses). La aparición del proceso no sólo está unida al tipo de terapia inmunosupresora administrada sino también a las dosis empleadas. En el caso de una inmunosupresión prolongada con altas dosis de fármacos, la enfermedad puede seguir un curso no muy distinto al de los pacientes con SIDA.

En general, el SK yatrogénico suele presentarse con un curso clínico más agresivo que la variante clásica. La morfología de las lesiones es similar a la observada en el SK-C, aunque la localización cutánea es más variable, y puede afectar ampliamente a órganos internos. La afectación sistémica ocurre en más del 40% de estos individuos siendo los ganglios linfáticos, el tracto gastrointestinal y los pulmones las localizaciones más comunes. En algunos de los casos de SK asociado a trasplante, el tumor aparece en el mismo lugar de la operación previa (Schamroth 1985).

Una peculiaridad de este tipo de SK es que frecuentemente las lesiones cutáneas pueden regresar e incluso resolverse enteramente tras la retirada o reducción de la terapia inmunosupresora (Zisbrod 1980; Wijnveen 1987). Generalmente, los pacientes que desarrollan una extensa afectación de los órganos internos sucumben a la enfermedad.

#### **2.4. SK EPIDÉMICO ASOCIADO A SIDA**

Causado por el VIH-1, el SIDA produce una profunda inmunodeficiencia y, por lo tanto, una alta susceptibilidad a infecciones oportunistas y al desarrollo de varios tumores, entre ellos el SK. Según diferentes datos parece ser que el SK es 201.000 veces más frecuente en los pacientes con SIDA que en la población general, constituyendo el tumor más frecuente en estos pacientes.

A finales de la década de los 70 y principios de los 80, en las áreas de Nueva York y California aparecieron numerosos casos de SK en un grupo epidemiológico atípico: varones jóvenes (edad media, 35 años), homosexuales y con signos de profunda inmunosupresión. Posteriormente, se reconoció al retrovirus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) como el agente causal de la inmunosupresión y del síndrome asociado que padecían estos pacientes, siendo el SK una de las claves que permitió establecer la existencia del SIDA. En muchos de los casos el SK fue la manifestación inicial de la infección por VIH-1, y su diagnóstico permitió el reconocimiento del síndrome, convirtiéndolo en uno de los criterios clínicos diagnósticos del SIDA.

Aproximadamente el 30% de los pacientes con SIDA desarrollan SK. Sin embargo, el SK no afecta de forma equivalente a los diferentes grupos de riesgo conocidos. Aproximadamente el 40% de los varones homosexuales con SIDA han desarrollado SK, en comparación con el 5% de pacientes VIH positivos pertenecientes a otros grupos de riesgo (Weiss 2001). De estas cifras se deduce que el SK asociado a SIDA es especialmente frecuente en la población masculina homosexual. De hecho, al principio de la epidemia en

Europa, Estados Unidos y Australia, el SK afectaba casi exclusivamente a hombres homosexuales y bisexuales infectados con el VIH y, en menor grado, a sus compañeras femeninas y a mujeres de ciertas regiones de África y del Caribe que se habían infectado a través de relaciones heterosexuales.

El SK asociado a SIDA afecta con menor frecuencia a hemofílicos, adictos a drogas por vía parenteral, receptores de transfusiones sanguíneas y a niños nacidos de madres seropositivas. El riesgo de desarrollar SK es muy variable en estos grupos: es poco común en hemofílicos y en receptores de transfusiones sanguíneas contaminadas (Padilla 1990); el riesgo es intermedio en los adictos a drogas por vía parenteral que comparten jeringuillas (Haverkos 1985); y en las mujeres que han contraído el SIDA por contacto heterosexual, sobre todo aquellas que han tenido un compañero bisexual, el riesgo se incrementa marcadamente (Beral 1991). De todas formas esta distribución varía ampliamente según el medio y la población estudiados. En España el SK asociado a SIDA afecta predominantemente a varones adictos a drogas por vía parenteral, seguidos del grupo compuesto por varones y mujeres infectados de forma heterosexual.

Múltiples estudios han intentado determinar a qué se debía este predominio del SK en el colectivo homosexual. Diversos estudios epidemiológicos mostraron diferencias en el comportamiento sexual de los hombres homosexuales VIH positivos con SK en comparación con aquellos que no desarrollan SK. Los hombres homosexuales con SK solían ser sexualmente más activos y frecuentemente tenían antecedentes previos de enfermedades de transmisión sexual. Asimismo, la frecuencia del SK asociado a SIDA era muy alta en hombres homosexuales/bisexuales que encontraban a sus parejas en casas de

baños y otros lugares en donde los contactos sexuales anónimos y las prácticas sexuales de riesgo (p.e., contactos anales y oroanales) eran comunes.

Estas peculiaridades epidemiológicas y las variaciones en las prevalencias del SK entre los diferentes grupos de riesgo, plantearon la cuestión de si el VIH era el único o principal agente transmisible causante del SK. En consecuencia, se propuso que el SK asociado a SIDA estaba propiciado por un cofactor viral que se cotransmitía con el VIH mediante ciertas prácticas sexuales, lo que justificaría la baja prevalencia del SK en otros grupos de riesgo. Algunos autores llegaron a sugerir, en relación a estas observaciones, que el SK podría considerarse en estos pacientes una enfermedad de transmisión sexual (Beral 1990).

Posteriores estudios han sugerido que este cofactor viral podría ser el VHH-8, ya que la incidencia del SK en la población con SIDA es paralela a la seropositividad de este virus (Weiss 2001). Además, parece ser que se transmite probablemente por vía sexual en este grupo epidemiológico, y por ello hay una fuerte correlación entre la seropositividad del VHH-8, el número de compañeros sexuales y la historia de enfermedades de transmisión sexual. A medida que se realizaron nuevos estudios, se fueron acumulando suficientes datos que permitieron definir al VHH-8 como el principal agente etiológico vírico del SK.

En Estados Unidos y Europa la incidencia del SK en los varones homosexuales con SIDA ha disminuido gradualmente en los últimos años, pasando de un 33% en 1981 a un 10% en 1992, siguiendo una evolución paralela a la disminución de la incidencia de la infección por el VIH-1, equiparándose así a la prevalencia del SK en otros grupos de riesgo. Estos hallazgos han sido atribuidos, al menos en parte, a un cambio en el comportamiento sexual

de la población homosexual masculina (p.e., uso de condones y evitación de ciertas actividades sexuales de alto riesgo) (Peters 1991). De esta forma se apoya el concepto de la existencia de un cofactor viral transmitido sexualmente.

En cuanto al SK asociado al SIDA pediátrico se ha observado una frecuencia aproximada del 4%. Los niños con SK suelen ser hijos de padres haitianos o adictos a drogas por vía parenteral, o bien han adquirido la infección por VIH a través de transfusión sanguínea. Aunque el SK linfadenopático es común en este grupo, el SK mucocutáneo también se ha descrito en los pacientes con SIDA pediátrico. Asimismo, los niños cuyos padres pertenecen a grupos de alto riesgo para el desarrollo del SK y aquellos que han adquirido el SK por transfusión sanguínea tienen mayor riesgo de desarrollar lesiones cutáneas (Rogers 1987).

En África el SK asociado a SIDA ha alcanzado también proporciones epidémicas, aunque más tardíamente que en los Estados Unidos. El SIDA, probablemente originado en África, es consecuencia en este medio de la infección por el VIH-1 y por el VIH-2, un segundo retrovirus de la inmunodeficiencia humana, con el que también se ha descrito el desarrollo del SK (Clavel 1987). Las principales vías de transmisión son las relaciones heterosexuales y el equipo médico contaminado (Pilot 1984). Asimismo, en las áreas de África donde la forma endémica -no relacionada causalmente con la infección por el VIH- era la más frecuente, el SK asociado a SIDA es actualmente mucho más prevalente que el asociado a la forma endémica (Biggar 1986).

El SK-SIDA desarrolla unas características clínicas distintivas, que pueden diferir considerablemente de las observadas en las otras formas del SK (Ziegler 1984; Krigel 1990). Las lesiones suelen ser múltiples y evolucionan rápidamente, mostrando una distribución atípica, localizándose en el tronco, extremidades superiores, cabeza y cuello. Asimismo, la afectación de las superficies mucosas y órganos internos es mucho más común. De hecho un gran número de pacientes presentan simultáneamente múltiples lesiones cutáneas, mucosas e internas.

Las lesiones cutáneas en la forma epidémica suelen ser más tempranas, pequeñas y sutiles. Las lesiones iniciales aparecen como máculas rojizas o rosadas que se asemejan a moratones o picaduras de insectos, o bien como pápulas marronáceas, pequeñas y tensas similares al dermatofibroma. Rápidamente estas lesiones progresan a pápulas, placas y nódulos, que suelen ser púrpura y pueden ulcerarse. Generalmente no se observa afectación subyacente del tejido celular subcutáneo, músculo esquelético o hueso.

En cuanto a la distribución de las lesiones iniciales en los pacientes con SIDA, hay una predilección por la cara -especialmente nariz, párpados y orejas- (**Imagen 4**), el cuello, el tronco -con predilección por los pliegues cutáneos- y, por último, las membranas mucosas. Una vez las lesiones iniciales se han desarrollado, a menudo coalescen para formar grandes placas que se diseminan, pudiendo encontrarse sin preferencia en cualquier parte del cuerpo. Aunque en el SK asociado a SIDA también pueden afectarse las extremidades inferiores como en el SK clásico, las lesiones no son tan severas y extensas como las apreciadas en cabeza y tronco.

Ocasionalmente se observa la presencia de un linfedema severo asociado con las lesiones del SK-SIDA, especialmente en las localizadas en las extremidades, escroto, pene y cara, siendo frecuente la afectación de los párpados. Este fenómeno es probablemente debido a la obliteración de los canales linfáticos dérmicos por la lesión proliferante (Fitzpatrick 1999).

La mucosa oral es la localización inicial en un intervalo que oscila entre el 10% y el 15% de todos los SK asociados a SIDA. Las lesiones del SK intraoral suelen localizarse frecuentemente en el paladar, aunque tampoco es rara la afectación severa de la epifaringe y laringe. La afectación de otras membranas mucosas como la conjuntiva y vagina son más raras.

En contraste con otras variantes del SK, la afectación interna en el SK asociado a SIDA (SK extracutáneo) es común, siendo los ganglios linfáticos, el tracto gastrointestinal y los pulmones las localizaciones más habituales. En una de las series autopsicas más largas realizadas (Lemlich 1987), los pulmones estaban afectados en el 37% de los casos, y el tracto gastrointestinal y los ganglios linfáticos en el 50%. Aunque es evidente que la afectación visceral es muy común en la autopsia, generalmente suele ser inaparente clínicamente durante la vida del paciente. Por otro lado, parece ser que la extensión de la afectación cutánea no se correlaciona con la extensión de la afectación visceral, ya que ésta puede presentarse ocasionalmente sin ninguna lesión cutánea asociada. Un hallazgo relevante en este estudio es que el 29% de los casos autopsicos mostraban lesiones viscerales sin afectación cutánea.

En series más recientes (Ioachim 1995), el SK gastrointestinal afectaba a más del 80% de los pacientes vivos con SIDA. Las lesiones pueden encontrarse a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, pero son mucho más comunes en el estómago y el duodeno. Suelen evolucionar de forma asintomática o bien provocando una amplia variedad de síntomas, como náuseas, ulceración, sangrado e incluso perforación. Aunque estas lesiones son visibles por gastroscopia, suelen pasar desapercibidas histológicamente debido a que están localizadas en la submucosa y pueden escapar de la pinza de biopsia.

El SK pulmonar causa síntomas diversos muy similares a los descritos en las neumonías por *Pneumocystis carinii*. Aunque la radiografía de tórax revela unos infiltrados intersticiales difusos en ambas enfermedades, los nódulos pulmonares y los derrames pleurales son más comunes en el SK. La broncoscopia con lavado broncoalveolar (BAL) es el medio de elección para el diagnóstico del SK pulmonar.

El curso clínico del SK-SIDA oscila desde la cronificación hasta casos rápidamente progresivos con afectación nodal y sistémica. La mayoría de estos pacientes fallecen rápidamente como resultado de infecciones oportunistas u otras complicaciones del SIDA más que por efecto directo de las consecuencias del SK. De hecho, la existencia de infecciones u otras patologías asociadas a SIDA suele empeorar su pronóstico. Sin embargo, en una de las mayores series estudiadas, la supervivencia era mucho mejor en aquellos cuya única manifestación de enfermedad era el SK (Rothenberg 1987).

Aproximadamente un 6% de los pacientes VIH positivos con SK suelen desarrollar segundas malignidades, siendo los linfomas las más frecuentes (Nasti 1997), después del SK.



**Imagen 4:** SK asociado a SIDA. Pápulas y placas localizadas en la cara de un paciente VIH positivo.

## 2.5. AFECTACIÓN DE ÓRGANOS INTERNOS: SK EXTRACUTÁNEO

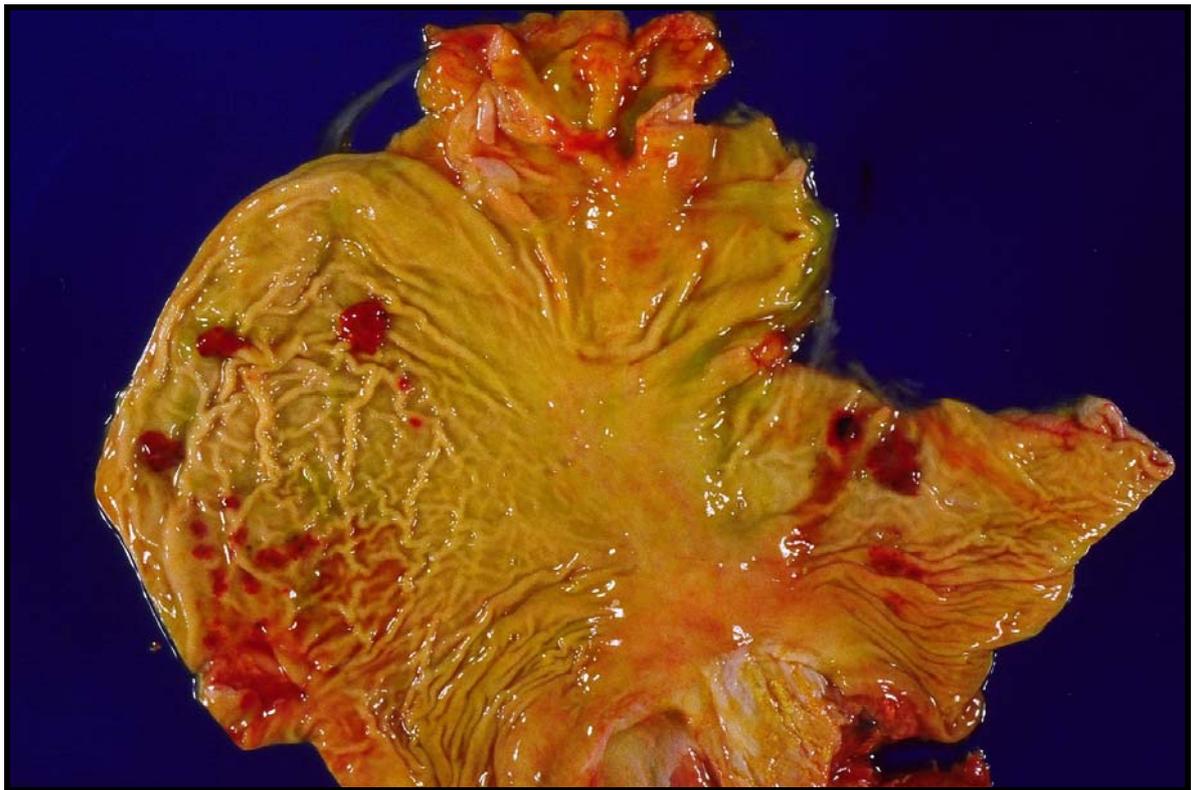
Normalmente, y como hemos comentado con anterioridad, la afectación sistémica suele ocurrir en las fases avanzadas de la afectación cutánea y representa la extensión de la enfermedad, por lo que, en general conlleva un peor pronóstico en algunas formas clínico-epidemiológicas del SK-SIDA. En cambio, en otras variantes representa únicamente un hallazgo incidental (SK-C), ya que se trata de lesiones frecuentemente asintomáticas sin mayor repercusión en la supervivencia del paciente. Asimismo, se han descrito casos en los que la afectación extracutánea puede presentarse de forma aislada y de forma previa a las lesiones cutáneas (Ioachim 1995).

El tracto gastrointestinal es la localización interna más frecuentemente afectada en el SK clásico, siendo probablemente el intestino delgado la víscera más afectada (**Imagen 5**). Los pulmones (**Imagen 6**), el corazón, el hígado, las glándulas adrenales, los ganglios linfáticos, sobre todo intrabdominales, y la conjuntiva son también órganos comúnmente afectados.

El SK cutáneo africano se acompaña frecuentemente por linfedema masivo de las extremidades inferiores, causado por infiltrados arborizantes a lo largo de los linfáticos cutáneos y por afectación ósea. Los cambios esqueléticos son raros pero característicos y diagnósticos: rarefacción, quistes y erosión cortical. La afectación ósea es siempre un indicador de enfermedad diseminada.

En el SK linfadenopático de los niños africanos se ha documentado una afectación masiva de los ganglios linfáticos, observándose también masas de tejido hemorrágico protuyendo en los párpados y conjuntiva. La afectación ocular en estos pacientes está generalmente asociada con hinchazón del lacrimal, de la parótida y glándulas submandibulares, presentando un cuadro similar al síndrome de Mikulicz. Este tipo de distribución también se ha descrito en pacientes con SIDA (Odom 2000).

En el SK asociado a SIDA, el 25% de los pacientes tienen afectación exclusivamente cutánea, mientras que el 29% muestran únicamente afectación visceral. El resto combinan la afectación simultánea de la piel y los órganos internos por lo que, en última instancia, el SK visceral afecta a más del 70% de los pacientes con SIDA. Las localizaciones más frecuentes de afectación visceral son el tracto gastrointestinal, los pulmones y los ganglios linfáticos.



**Imagen 5:** Tracto gastrointestinal. Lesiones angiomatosas de SK en mucosa gástrica de paciente con SK-SIDA.



**Imagen 6:** Pulmones. Áreas densamente congestivas de distribución perivascular en el parénquima pulmonar correspondiente a afectación por SK en un paciente con SK-SIDA.

### **3. ETIOPATOGENIA**

Aunque la etiopatogenia del SK es desconocida, actualmente se acepta un modelo que consiste en una serie de interacciones complejas entre diversos factores: la expresión y respuesta alterada de las citocinas y los factores de crecimiento del huésped; la modulación aberrante del crecimiento celular por los productos codificados por los genomas víricos; y alteraciones del sistema inmunitario del individuo.

La disfunción inmune es un componente clave en el desarrollo del SK, sobre todo en los casos asociados a SIDA y en pacientes con inmunosupresión yatrogénica. De hecho, el cese de la terapia en este último grupo de pacientes conlleva, en la mayoría de los casos, la regresión del SK. De todas formas, la inmunosupresión no es un elemento imprescindible, ya que por sí misma no puede explicar el desarrollo de las lesiones del SK, y algunas de las variantes del SK no cursan con inmunodepresión. Sin embargo, en los casos en los que la alteración inmunológica se encuentra presente, ésta actúa como un claro favorecedor del trasfondo necesario para el desarrollo de la enfermedad.

A partir de la descripción del SK en pacientes con SIDA, se barajó la posibilidad de una etiología vírica de la enfermedad. La marcada disparidad del SK en lo que respecta a las prevalencias entre los diferentes grupos de riesgo del VIH-1, la incapacidad para identificar el VIH-1 en algunas de las células del SK y la existencia de subtipos de SK no asociados a SIDA puso en duda que éste fuera el único agente causal. Demostrar la existencia de otro agente infeccioso transmitido probablemente por vía sexual, que actuaría como cofactor infeccioso en los pacientes VIH-1 y como agente causal en los VIH-1

negativos, y su relación con el contexto inmunológico del SK ha sido uno de los retos en los diferentes estudios de esta entidad patológica.

### 3.1. UN AGENTE INFECCIOSO EN EL SK

La agresividad y la prevalencia del SK en pacientes con SIDA en comparación con la forma clásica de la enfermedad, pone en relieve la importancia del VIH-1 en el desarrollo del SK. No obstante, la propia existencia de formas de SK no asociadas a SIDA y el desarrollo de algunos casos agresivos en el resto de variantes clínico-epidemiológicas, sugiere la presencia de otro factor infeccioso implicado en el desarrollo del SK en personas VIH-1 negativas y que actuaría como cofactor del VIH-1 en los pacientes con SIDA.

Por otro lado, la alta prevalencia del SK asociado a SIDA en hombres homosexuales promiscuos, la aparición de casos de SK en varones homosexuales VIH-1 negativos con conductas sexuales de riesgo, y la variable prevalencia del SK en los diferentes grupos de riesgo del VIH-1, como por ejemplo, el de los pacientes con infección adquirida parenteralmente, apoya la existencia de otro agente causativo que probablemente se transmite por vía sexual (Beral 1991).

El descenso de la incidencia del SK paralelo a la disminución del SIDA en los pacientes homosexuales -seguramente por la evitación de conductas sexuales de riesgo y la utilización de métodos de barrera-, y la observación de que el SK es mucho más común en mujeres que practican sexo con hombres bisexuales que en el resto de mujeres con SIDA, son hechos que también favorecen la transmisión sexual de este agente.

Por otro lado, el estudio estructural de las células tumorales del SK ha reveló la presencia de estructuras tuborreticulares y cisternas cilíndricas confrontadas, sugestivas de una

reacción celular a una infección viral, que parecía no corresponder al VIH-1 (Rappersberger 1990).

A partir de todas estas importantes evidencias epidemiológicas y moleculares que sugieren la existencia de otro agente infeccioso diferente al VIH-1, se consideraron un gran número de virus que podrían actuar como cofactor o incluso como el agente causal en la etiopatogenia del SK. Entre ellos cabe destacar el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (VEB), varios tipos de virus del papiloma humano (VPH), el virus herpes humano tipo 6, el virus de la hepatitis B y retrovirus no-VIH-1.

Giraldo et al. iniciaron en 1972 la búsqueda de un agente infeccioso al observar en células cultivadas de SK clásico y endémico “partículas semejantes a las de los herpesvirus”, encontrando también una asociación serológica específica entre el CMV y las diferentes formas clínico-epidemiológicas del SK. No obstante, la relevancia de esta asociación era incierta, ya que el genoma del CMV no estaba integrado en las células del SK y, por lo tanto, el hallazgo de ADN o ARN del CMV en los tejidos del SK o de anticuerpos contra el CMV en los pacientes con SK no implicó en sí mismo un papel etiológico del CMV en su etiopatogenia.

Huang et al. demostraron en 1992 mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP) la presencia de fragmentos de ADN del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) en tejidos de SK de pacientes con y sin SIDA. Inmunohistoquímicamente, las muestras procedentes del SK clásico y asociado a SIDA mostraron también positividad para antígenos de VPH. Aún así, la extensa distribución de este tipo de virus en la población y

la ausencia de una asociación evidente entre el desarrollo del SK y otras patologías claramente vinculadas al VPH, hizo poco probable que éste sea el agente infeccioso buscado.

Se favoreció la hipótesis de que un retrovirus no-VIH-1 pudiera estar etiológicamente vinculado al SK. La existencia de lesiones vasculares pseudokaposiformes causadas por retrovirus y la detección de partículas retrovirales en las lesiones de SK apoyarían esta hipótesis. Sin embargo, no se pudo establecer una clara relación causal, ni una estricta identificación microbiológica.

Posteriormente, se obtuvo una fuerte evidencia de que un virus herpes pudiera ser el agente vírico implicado en la etiopatogenia de todas las variantes del SK.

### **3.1.1. El virus herpes humano tipo 8 (VHH-8): un virus herpes asociado al SK (VHSK)**

Entre 1994 y 1995, Chang y Moore identificaron mediante técnicas de RCP secuencias de ADN homólogas a las de los virus *gammaherpesvirinae* de la familia de los *Herpesviridae* en más del 90% de las muestras de tejido obtenido de lesiones de SK asociado a SIDA. Las secuencias mostraron una estrecha homología (del 30% al 50%) con las de dos virus de esta familia: el herpesvirus saimiri y el virus del Epstein-Barr. Sin embargo, los genes de las proteínas de la cápside y del tegumento eran distintos a los del resto de los *gammaherpesvirinae*. La presencia de secuencias semejantes, aunque no idénticas, a las de los herpesvirus definió un nuevo tipo de virus herpes humano dentro de este grupo,

denominado virus herpes humano tipo 8 (VHH-8) o virus herpes asociado al SK (VHSK). El VHH-8 es el primer miembro humano del género *Rhadinovirus* (Moore 1996; Russo 1996; Neipel 1998), que se caracteriza porque sus miembros raramente producen enfermedad aparente en el huésped por sí solos, pero se vuelven más virulentos en presencia de otras infecciones concomitantes.

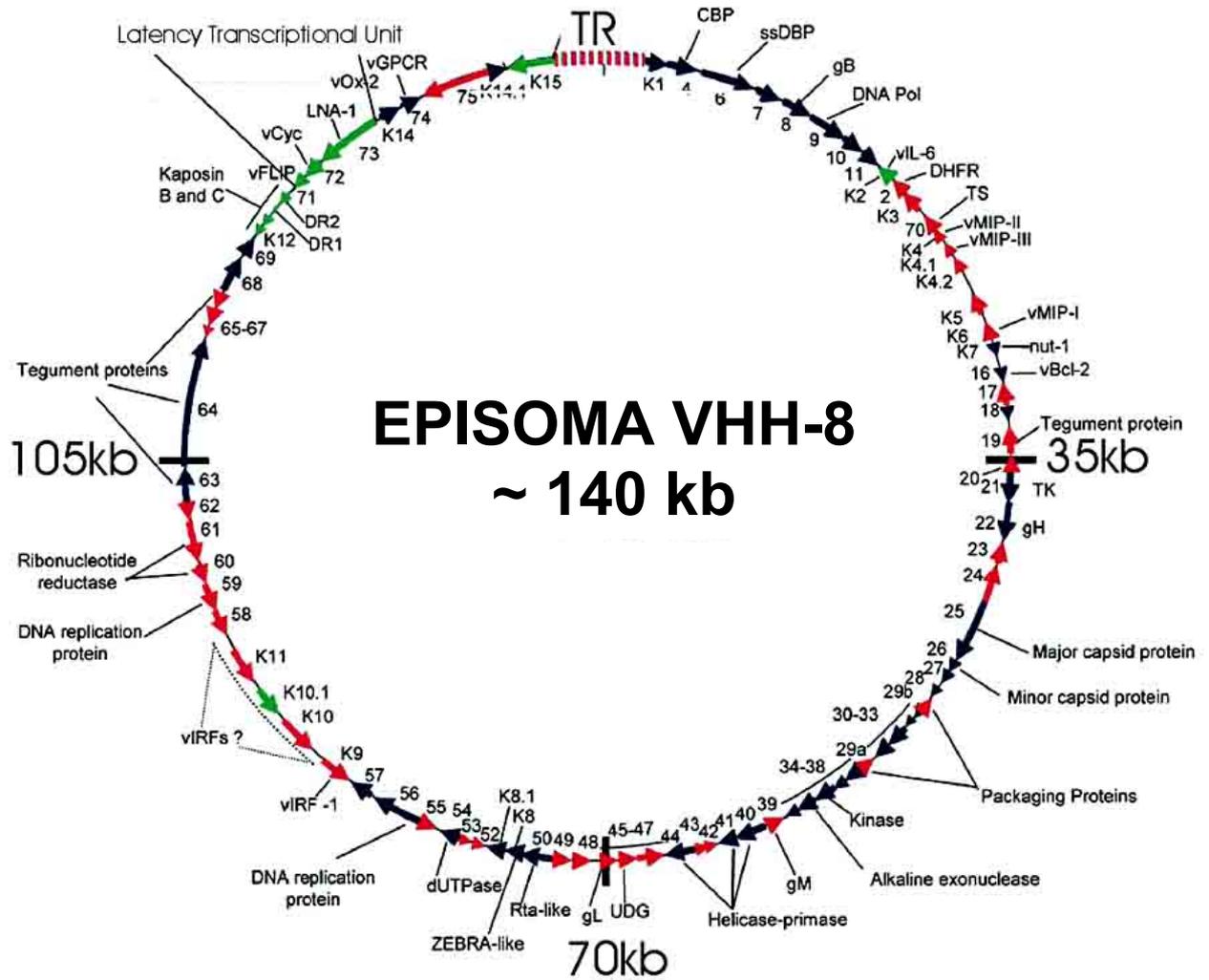
Todos los herpesvirus, incluyendo el VHH-8, establecen infecciones latentes en las células del huésped, haciendo que el genoma viral persista extracromosómicamente en forma episómica o circular, restringiendo así la replicación y la producción de progenie viral. En estos casos no se producen ni se liberan virus, pero la infección se mantiene por división de las células huésped. En ocasiones, por circunstancias diversas y aún desconocidas, se puede producir la reactivación del VHH-8 en las células infectadas, lo que permite el desarrollo de una infección lítica caracterizada por la expresión de genes víricos, la producción y liberación de viriones y la consiguiente destrucción de la célula huésped y diseminación del virus. Es evidente que la regulación de la activación de la infección lítica del VHH-8 puede ser un punto crítico en la progresión de las enfermedades relacionadas con este virus, como el SK.

La detección del VHSK en células mononucleares de la sangre periférica en más del 50% de los pacientes con SK asociado a SIDA -incluso precediendo meses al inicio de las lesiones del SK- (Whitby 1995; Moore 1996), y la presencia del ADN del VHH-8 en el núcleo de células fusiformes y tumorales del SK, pero no en las células endoteliales normales, indica que estos grupos celulares podrían actuar como reservorio y fuente de origen de la diseminación de este virus. De hecho, parece ser que la diseminación del SK se

correlaciona con la detectabilidad del ADN viral del VHH-8 en células mononucleares de la sangre periférica.

Asimismo, otros estudios revelaron que el VHSK es un virus con la capacidad de favorecer la proliferación celular, ya que se identificó en su genoma la presencia de secuencias genéticas virales homólogas a las de varios genes del ADN humano (Choi 2001; Moore 2001; Paulose-Murphy 2001) que codifican proteínas críticas en el control de la proliferación y del crecimiento celular (**Esquema 1**).

Todos estos hallazgos han sido corroborados posteriormente en otros estudios y por otros autores (Cotter 2002), y no sólo en el SK asociado a SIDA, sino también en los varones homosexuales VIH-1-negativos con SK y en el resto de variantes del SK, apoyando aún más la hipótesis de que este nuevo virus herpes humano estaba implicado en la patogénesis del SK (Brooks 1997; Ganem 1997; Kennedy 1998).



**Esquema 1.** Estructura circular episomal del genoma del VHH-8 (infección latente).

### **3.1.2. El VHH-8 en otras entidades patológicas**

La hipótesis de que el VHSK está etiológicamente implicado en el SK es paralela a su identificación consecutiva en dos enfermedades linfoproliferativas bien definidas, frecuente pero no exclusivamente asociadas a la infección del VIH-1 y al SIDA: el linfoma de células B de cavidades corporales (Cesarman 1995; Foreman 1997) y la enfermedad de Castleman multicéntrica (Soulier 1995; Dupin 1999; Sarid 2002). Los denominados  $\gamma$ -herpesvirus son virus oncogénicos linfotrópicos que infectan las células B (VEB) o las células T (herpesvirus saimiri) estableciendo infecciones latentes que finalmente podrían originar la proliferación maligna de las células B o T respectivamente.

Todos los linfomas de cavidades-VHSK positivos estudiados contenían también secuencias de VEB, por lo que hay razones para creer que ambos virus trabajan conjuntamente para inducir una transformación completa de las células B infectadas. Sin embargo, en los pacientes con SK-VHSK positivo, el VEB generalmente no está presente, independientemente del grupo estudiado.

Mediante el estudio de líneas celulares VHSK-positivas en el linfoma de cavidades corporales, Renne et al. intentaron establecer la célula diana o de origen de la infección por el VHSK. La presunción de que una célula linfoide sirva como lugar de origen de la replicación del VHH-8/VHSK ha sido apoyada por la observación de que los tejidos del SK guardan VHH-8/VHSK en una forma episómica circular indicativa de latencia, mientras que la forma lineal del ADN del VHH-8/VHSK, indicativo de replicación, ocurre únicamente en las células mononucleares de la sangre periférica (Decker 1996). Las

recientes observaciones de la replicación *in vivo* del virus en las células CD34+ localizadas en las luces de las hendiduras vasculares del SK, y de que aproximadamente el 50% de las células B en pacientes con SK son VHSK-positivas, indica que una célula linfoide precursora parece ser el lugar de replicación y origen de la infección del VHH-8/VHSK en el SK.

De forma similar, el 75% de los pacientes VIH-1-positivos con enfermedad de Castleman desarrollan SK, y frecuentemente ambas lesiones comparten la misma localización. De todas formas, como el VHSK únicamente se ha detectado en una minoría de los pacientes VIH-1-negativos con enfermedad de Castleman, su papel etiopatogénico en esta enfermedad es obviamente de menor importancia que en el SK.

Aparte de en estas dos entidades, el ADN del VHH-8 se ha identificado también en otras lesiones, sobre todo cutáneas, aunque su asociación etiopatológica no es tan evidente como en el SK, en el PEL y en la enfermedad de Castleman multicéntrica. Entre ellas cabe destacar las siguientes: lesiones no kaposiformes de pacientes trasplantados (Rady 1995); angiosarcomas clásicos del cuero cabelludo en pacientes no inmunodeprimidos (McDonagh 1996); pénfigo vulgar y foliáceo; penfigoide buloso; tumores cutáneos como la enfermedad de Bowen, el carcinoma escamoso y la queratosis actínica; sarcoidosis; pneumonitis intersticial y linfadenopatías crónicas en pacientes VIH positivos; la enfermedad de Kikuchi; el mieloma múltiple; y el síndrome hemofagocítico (Ablashi 2002; Jenner 2002).

### **3.1.3. Serología del VHH-8**

En general las infecciones con herpes virus humanos son ubicuas, y suelen darse durante la infancia y la adolescencia como resultado de la persistencia del genoma vírico a lo largo de la vida en forma de infección latente. Si se considera la posibilidad de que el VHH-8/VHVK está distribuido entre la población general, entonces las personas con y sin SK deberían tener el mismo riesgo de infección y, por lo tanto, de desarrollar la enfermedad, lo que descartaría a este virus como el agente causal del SK. Para clarificar esta cuestión, se desarrollaron varios cuestionarios para investigar la probabilidad de una respuesta humoral inmune específica, como por ejemplo la producción de anticuerpos contra el VHH-8/HVSK (Lennette 1996), en pacientes con las diferentes variantes clínicas del SK en varias subpoblaciones de pacientes VIH-1-positivos con y sin SK, en personas VIH-1-positivas y VIH-1-negativas con riesgo de desarrollar SK y, por último, en gente sana de la población general.

Los resultados mostraron una prevalencia de los anticuerpos anti-VHH-8/VHVK que oscila entre un 70% y un 100% en los pacientes con SK, en comparación con el 1-2% de la población sin SK. Estos resultados apoyan la evidencia de que el VHH-8/VHVK es el agente causal del SK desde un punto de vista epidemiológico.

Igualmente, hay claras evidencias epidemiológicas de que la prevalencia de seropositividad del VHH-8/VHVK es mayor en personas que han adquirido el VIH-1 por vía sexual en comparación con los que se han infectado parenteralmente mediante productos sanguíneos infectados con el VIH-1 (Kedes 1996). Asimismo se han identificado secuencias virales

del VHH-8 en el tejido prostático y en el semen humano (Monini 1996). Estas observaciones asocian al SK con la promiscuidad y ciertas prácticas sexuales, apoyando la vía de transmisión sexual en el VHH-8. De todas formas, la demostración esporádica del VHH-8/VHSK en niños seropositivos indica la existencia de otras posibles rutas de contagio no sexual, por ejemplo transmisión parenteral, vertical (Mantina 2001), picaduras de insectos (Coluzzi 2002), etc.

En resumen, la distribución de la seropositividad del VHH-8 se correlaciona estrechamente con el riesgo de padecer SK y configura el patrón esperado para un patógeno que se transmite por vía sexual.

Por otro lado, el hecho de que sólo entre el 1% y el 2% de la población general sea seropositiva para el VHH-8/VHSK, ha hecho que algunos autores barajen la posibilidad de que también existan otros factores aún no descritos (p.e., otros agentes infecciosos) que puedan ser necesarios para el desarrollo del SK en pacientes VIH-1 negativos (Ablashi 2002).

#### **3.1.4. El VHH-8: agente etiológico del SK**

Actualmente se considera al VHH-8 como el agente etiológico del SK, y esta afirmación está apoyada por las siguientes observaciones:

- Identificación del VHH-8 en las cuatro formas clínicas del SK y virtualmente en todas las células del SK, independientemente del estadio (Dictor 1996; Jin 1996; Li 1996; Cathomas 1998; Herman 1998).
- Presencia de anticuerpos específicos contra el VHH-8 en la mayoría de los pacientes con SK. La infección por VHH-8 se determina por anticuerpos contra proteínas antigénicas nucleares asociadas a latencia (LANA 1). La detección de estas proteínas es paralela casi de forma precisa con la prevalencia del SK en los grupos de riesgo del SIDA y en varias áreas geográficas del mundo. El virus está presente en muchos pacientes con SK independientemente del tipo clínico, mientras que en la población normal no está presente en un grado significativo.
- Hay un fuerte valor predictivo entre la detección del genoma del VHH-8 en la sangre de varones homosexuales VIH-1-positivos y el subsiguiente desarrollo del SK. Es decir, la seroconversión del VHH-8 en pacientes infectados con el VIH-1 que no tienen SK parece ser predictiva del desarrollo de SK, generalmente en un período comprendido entre los 2 y los 4 años siguientes (media, 33 meses).
- El genoma del VHH-8 posee varias secuencias génicas homólogas a las de genes celulares que codifican productos capaces de estimular el crecimiento celular y la angiogénesis (Moore 1998; Ablashi 2002).
- La introducción del VHH-8 en células endoteliales *in vitro* transforma parcialmente a las células infectadas, haciendo que muestren una prolongación en su supervivencia mediante la adquisición de telomerasas (Chen 2001) y proteínas proapoptóticas, y un crecimiento independiente de las fijaciones

celulares. Sin embargo, no ha sido posible demostrar la transmisión directa *in vivo* de células tumorales a células diana o de humano a humano (Flore 1998).

De todas formas, aunque actualmente la asociación del VHH-8 como agente etiológico del SK está firmemente establecida, la experiencia investigadora previa de la relación entre el SK y otros virus invita a ser cautelosos, ya que el mecanismo patogénico exacto implicado en el SK y en el resto de procesos proliferativos también relacionados con el VHH-8 orienta hacia eventos patogénicos aún no definidos.

### **3.2. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR NORMAL**

Las células eucariotas se reproducen mediante una secuencia ordenada de eventos denominada ciclo celular. La progresión del ciclo celular requiere la actuación coordinada de una compleja red de proteínas reguladoras que funcionan como interruptores bioquímicos que controlan sus principales fases e integran señales intracelulares y del medio extracelular, mitogénicas o antiproliferativas, para adecuar la división celular a las necesidades celulares o tisulares.

Un exceso en la estimulación o un defecto en la inhibición de la proliferación celular, independientemente de las causas que lo originen (infecciones víricas, agentes ambientales, etc.), puede tener como consecuencia un crecimiento incontrolado que desemboque en cáncer.

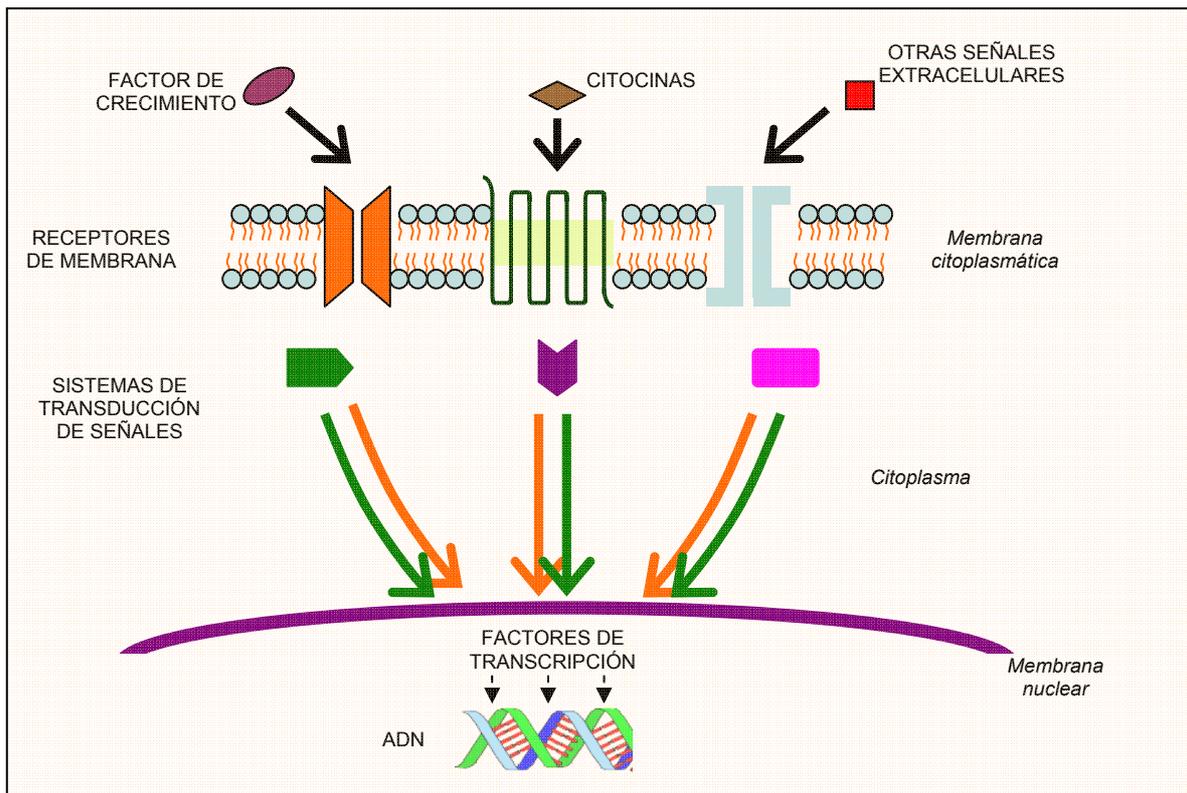
Deviene esencial conocer cuáles son los sucesos y los productos genéticos moleculares implicados en el crecimiento y en la reproducción celular fisiológicos para comprender, en la medida de lo posible, las bases del comportamiento aberrante característico de las células tumorales (Cotran 1999).

#### **3.2.1. Sucesos moleculares en el crecimiento celular**

Los sucesos moleculares en el crecimiento celular son complejos e incluyen una larga serie de moléculas y vías intercelulares, muchas de ellas con funciones aún desconocidas. En

condiciones fisiológicas los principales eventos de la proliferación celular son los siguientes:

- Unión de un factor de crecimiento a su receptor específico en la membrana celular.
- Activación limitada y transitoria del receptor con estimulación secundaria en la cara interna de la membrana celular de varias vías transductoras de señales.
- Transmisión de la señal transducida a través del citosol hasta el núcleo mediante mensajeros secundarios.
- Inducción y activación de factores reguladores nucleares que inician la transcripción del ADN.
- Entrada y progresión de la célula en las cuatro fases del ciclo celular -G1 (presintética), S (síntesis de ADN), G2 (premitótica) y M (mitótica)- finalizando con la división celular. Las células quiescentes se encuentran en un estadio del ciclo denominado G0 (**Esquema 2**).



**Esquema 2:** Sucesos moleculares secuenciales en el crecimiento y división celular.

### **3.2.1.1. Receptores de la superficie celular**

El crecimiento celular se inicia por la unión de un agente señal, comúnmente un factor de crecimiento o una citocina, a un receptor específico que consiste en una proteína transmembrana compleja con un dominio externo de unión y un dominio citoplasmático, que suele localizarse en la superficie interna de la célula, aunque también pueden encontrarse en el citoplasma o en el núcleo.

En condiciones normales, cuando el receptor se activa transitoriamente por la unión con su ligando específico, se inicia una respuesta celular induciendo modificaciones moleculares que inician la transducción de señales mitóticas.

Existen tres clases de receptores de superficie importantes para el crecimiento celular: receptores con actividad cinasa intrínseca (tirosin-cinasas, protein-cinasa C, *ras* y PI-3); receptores sin actividad catalítica intrínseca; y por último, el receptor acoplado a la proteína G (Neer 1995).

### **3.2.1.2. Sistemas de transducción de señales**

Los sistemas de transducción de señales engloban los procesos a través de los cuales las señales extracelulares son detectadas y convertidas en señales intracelulares. Los principales sistemas de transducción de señales suelen ser redes intrincadas de protein-cinasas asociadas específicamente a receptores (MAP-cinasa, PI-3-cinasa, Inositol-lípido - IP<sub>3</sub>-, AMPc, JAK/STAT, sistema de cinasas de estrés, etc.).

### **3.2.1.3. Factores de transcripción**

Los sistemas de transducción de señales transfieren información al núcleo mediante los factores de transcripción, que son los encargados de generar cambios específicos en la regulación de la expresión de genes necesarios para la transcripción del ADN. A su vez, los factores de transcripción son regulados por fosforilación mediante cinasas específicas, cambiando de esta forma su localización y/o su afinidad por el ADN y, por lo tanto, alterando la expresión de genes fundamentales para la división celular. Consecuentemente, los factores de transcripción poseen un papel esencial en el control del ciclo celular.

### **3.2.2. El ciclo celular y la regulación de la división celular**

Existen una serie de mecanismos que controlan el paso ordenado de la célula a través de las diferentes fases del ciclo celular, orquestando los sucesos que permiten la división celular. Los dos controles moleculares principales son: la cascada de proteínas de fosforilación que dependen de las ciclinas (cinasas dependientes de ciclinas o CDK); y una serie de puntos de control que monitorizan si los sucesos celulares se han completado correctamente y, si es necesario, retrasan la progresión a la siguiente fase del ciclo celular (puntos de control o comprobación).

#### **3.2.2.1. Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas**

Los componentes centrales del sistema de control del ciclo celular son los complejos ciclina-CDK constituidos por las ciclinas (subunidades reguladoras) y por las protein-

cinasa dependientes de ciclinas o CDK (subunidades catalíticas), que no tienen actividad cinasa hasta que no se unen a una ciclina. La entrada y la progresión de las células a través de las fases del ciclo celular está controlada por cambios en las concentraciones de las ciclinas y consiguientemente en la actividad de las CDK.

Hay cuatro clases de ciclinas, según el estadio del ciclo en el que actúan y a la CDK a la que se unen. De ese modo, cada uno de los distintos complejos ciclina-CDK sirve como un interruptor molecular que dispara un suceso específico en el ciclo celular.

1. **Ciclinas-G1/S**: actúan al final de G1 comprometiendo a la célula a la entrada a la fase S y a la replicación del ADN.
2. **Ciclinas-S**: se requieren para la iniciación de la replicación del ADN.
3. **Ciclinas-M**: promueven los sucesos de la mitosis.
4. **Ciclinas-G1**: promueven el paso a través del punto de restricción de G1.

COMPLEJO CICLINA-CDK	CICLINA	CDK
CDK-G1	Ciclina D (1,2 y 3)	CDK4,CDK6
CDK-G1/S	Ciclina E	CDK2
CDK-S	Ciclina A	CDK2
CDK-M	Ciclina B	CDK1

Las CDK activas conducen el ciclo celular mediante la fosforilación de proteínas específicas que se requieren para la progresión de las células a la siguiente fase (Morgan 1997). Las ciclinas no simplemente activan a su CDK compañera, sino que también son

capaces de dirigir las hacia estas proteínas diana. En contrapartida, se ha observado que un mismo complejo ciclina-CDK puede inducir efectos diferentes en distintos momentos del ciclo.

Las CDK se encuentran en forma inactiva durante todo el ciclo celular, y únicamente se activan por fosforilación después de unirse a las ciclinas. Las ciclinas, al contrario que las CDK, se sintetizan únicamente durante algunas fases específicas del ciclo. Por ello, una vez su función ha finalizado, el complejo se disocia y los niveles de ciclina disminuyen rápidamente cuando la célula entra en la siguiente fase, siendo sustituida por otro tipo de ciclina específico. Las ciclinas disociadas se degradan a través de distintas vías proteolíticas.

### **3.2.2.2. El ciclo celular: actividad de los complejos ciclina-CDK**

La progresión de la célula a través de las diversas fases del ciclo celular requiere la activación coordinada de los complejos ciclina-CDK (**Esquema 3**). En la fase G1 inicial, tras recibir una señal promotora del crecimiento (estímulo mitogénico), se induce la síntesis de ciclina D que se une específicamente a la CDK4 y CDK6 formando los complejos ciclina-CDK de fase G1.

Los complejos ciclina D-CDK4/6 son los encargados de fosforilar a la proteína del gen del retinoblastoma (pRb), lo que genera la liberación de los factores de transcripción de la familia E2F (ver apartado 3.3.6.2.). Éstos, a su vez, activan la transcripción de varios genes cuyos productos son necesarios para la progresión de la fase G1 a la fase S, entre ellos la

ciclina E, y para el inicio de la replicación del ADN. En la fase G1 tardía, la estimulación de la síntesis de ciclina E permite su ensamblaje con la CDK2 para formar los complejos ciclina E-CDK2 o complejos de la transición G1/S, que finalizan la inactivación de la pRb iniciada por los complejos ciclina D-CDK4/6 e inhiben a las CKI que frenan el avance del ciclo celular.

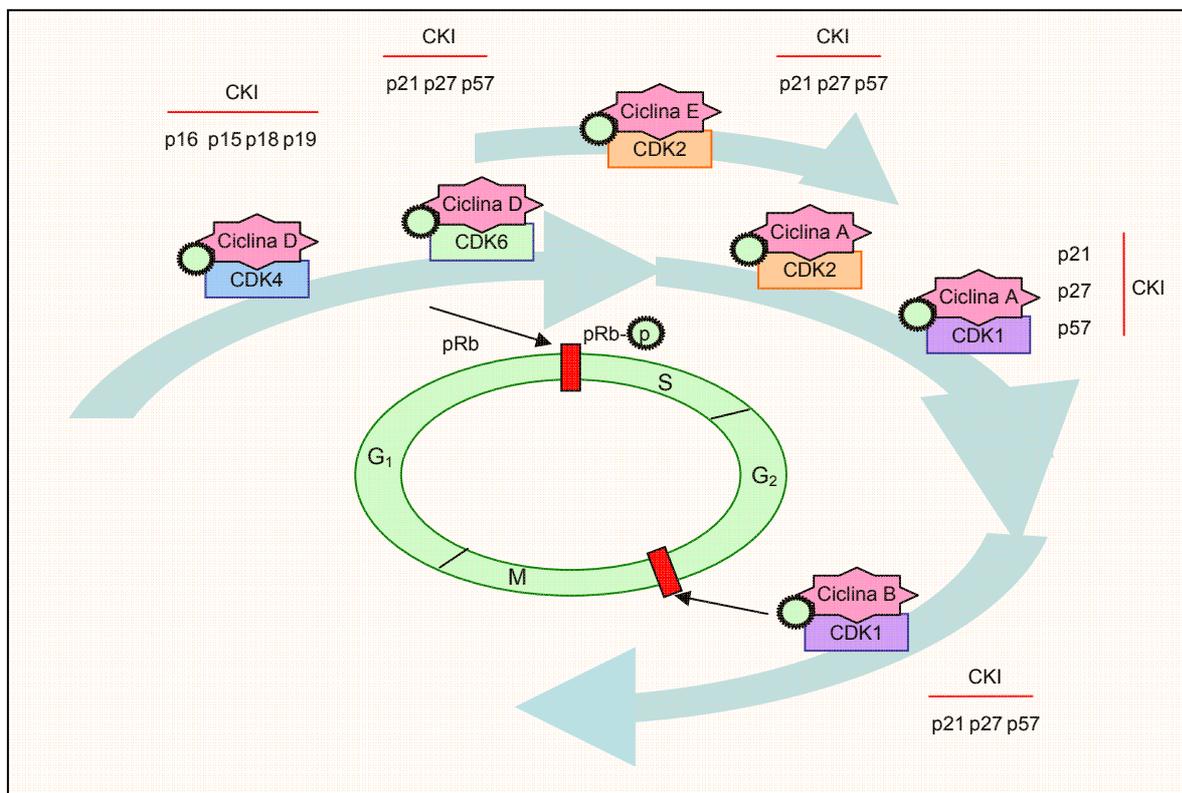
Una vez que la fase S se ha completado, es decir, cuando las células poseen dos copias exactas del genoma entero, se produce la progresión de la fase S a la fase G2, regulada por los complejos formados por la ciclina A y la CDK2. Los complejos de fase M, constituidos por la ciclina B y la CDK1, sintetizados en la fase G2 tardía son inactivos por la presencia de dos grupos fosfatos que bloquean su lugar de activación. La activación de la fosfatasa Cdc25 al final de la fase G2, separa a los fosfatos inhibidores activando a los complejos ciclina B-CDK1 y permitiendo así la progresión de la célula de la fase G2 a la fase M.

Ya en la fase de mitosis, los complejos ciclina B-CDK1 son capaces de inducir el ensamblaje del huso mitótico y asegurar que los cromosomas replicados se unen a él mediante la fosforilación de proteínas estructurales y reguladoras específicas que toman parte en dichos eventos. De la misma forma, estos complejos de fase M junto con el complejo promotor de la anafase (APC), una ubiquitin-ligasa cuya actividad está regulada por la proteína Cdc20, son las encargadas de realizar la separación de las cromátidas hermanas en la transición entre la metafase y la anafase mitóticas.

Después de que los cromosomas se hayan segregado a los polos del huso, la célula finaliza la mitosis. La inactivación de los complejos de fase M mediante inhibición directa por las

proteínas inhibidoras de las CDK (CKI) y la disminución de la concentración de las ciclinas-M por reducción transcripcional y proteólisis a través de la vía ubiquitin-proteasoma, son algunos de los mecanismos que actúan simultáneamente para asegurar que toda la actividad de las CDK está suprimida en la fase G1 temprana, que constituye un estado de inactividad estable de las CDK.

Gracias a señales extracelulares que estimulan la proliferación celular a través de un aumento en la síntesis de las ciclinas-G1, la célula escapa de la fase G1 estable o de la fase G0 de quiescencia para iniciar un nuevo ciclo celular (Cotran 1999; Alberts 2002).



**Esquema 3:** Ilustración de la regulación del ciclo celular. Función y localización en las diferentes fases del ciclo celular de las ciclinas, de las CDK y de las CKI.

### 3.2.2.3. Regulación de los complejos ciclina-CDK

La actividad de los complejos ciclina-CDK está controlada por varios mecanismos, entre ellos la fosforilación de la subunidad CDK, la interacción con proteínas inhibidoras específicas (CKI), la concentración de las subunidades reguladoras (ciclinas) y, por último, cambios en la transcripción genética y/o en la degradación de las ciclinas, las CDK o en cualquiera de estas moléculas reguladoras (Morgan 1995; Pavletich 1999).

La actividad del complejo ciclina-CDK puede modificarse por la fosforilación o desfosforilación de un par de aminoácidos localizados en la porción superior del lugar de activación. La fosforilación está realizada por una proteína-cinasa conocida como Wee1, que de esta forma inhibe la actividad de la CDK. Mientras que la desfosforilación, mediante la fosfatasa Cdc25, incrementa la actividad del complejo ciclina-CDK.

La actividad de los complejos ciclina-CDK está también regulada por proteínas inhibidoras de las CDK o CKI, cuya unión al complejo redistribuye la estructura del lugar de activación de la CDK manteniéndola inactiva. Existen dos familias de CKI con actividades específicas: la familia CIP/KIP (p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> y p57<sup>KIP2</sup>), y la familia INK4 (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> y p19<sup>SKP1</sup>); no obstante, las principales CKI en las células de los mamíferos son la p27<sup>KIP1</sup>, la p21<sup>CIP1</sup> y la p16<sup>INK4a</sup> (ver apartado 3.2.2.5).

El aumento y la disminución de los niveles de ciclinas es el determinante primario de la activación o desactivación de las CDK y, consecuentemente, de la progresión del ciclo celular. Por ello, la destrucción de las ciclinas por proteólisis se convierte en un mecanismo

de control de la actividad de los complejos ciclina-CDK. La proteólisis regulada de algunas de las principales ciclinas se realiza a través de la vía ubiquitin-proteasoma (ver apartado 3.6.2.1).

En las fases G1 y S, un complejo enzimático denominado SCF es el responsable de la ubiquitinación y destrucción de las ciclinas-G1/S y también de ciertas proteínas CKI. La actividad del SCF es constante a lo largo del ciclo celular. La ubiquitinación mediante el SCF suele estar controlada por cambios específicos en el estado de fosforilación de las proteínas diana (Feldman 1997; Skowyra 1997).

En la fase M, el complejo promotor de la anafase (APC) es el responsable de la ubiquitinación y proteólisis de las ciclinas-M y otros reguladores de la mitosis (King 1995; Cohen-Fix 1996; Funabiki 1996). En contraste con el SCF, la actividad del APC cambia a lo largo de los diferentes estadios del ciclo celular y depende principalmente de la adición de subunidades activadas al complejo.

Ambos complejos enzimáticos (SCF y APC) son también componentes cruciales en el sistema de control del ciclo celular, ya que son capaces de inducir la proteólisis vía ubiquitinación de reguladores específicos del ciclo celular, lo que puede conllevar la alteración de sucesos moleculares críticos en el ciclo.

Otro nivel de regulación en las células de los mamíferos es el control transcripcional. En estos casos, la concentración de ciclinas y de otros productos necesarios para la división celular se controla por cambios en la transcripción genética y en la síntesis de proteínas.

#### **3.2.2.4. Puntos de control del ciclo celular**

La progresión del ciclo y división celular depende de la finalización completa, fiel y secuencial de las diferentes fases del ciclo. Éstas deben regularse de forma precisa para evitar la introducción de mutaciones en el material genético de la célula.

Existen varias transiciones específicas, denominadas puntos de control o comprobación, que constituyen un segundo nivel de regulación del ciclo celular en los que éste puede detenerse si las fases previas no se han completado exitosamente. Adicionalmente, en estos puntos el sistema de control puede ser regulado por señales intracelulares y extracelulares, de forma que la progresión del ciclo celular puede retrasarse no sólo cuando las células son incapaces de completarlo correctamente -ofreciendo el tiempo necesario para reparar cualquier daño evitando así un incremento en la producción de fallos oncógenos en las células-, sino también cuando las condiciones ambientales son desfavorables para la decisión.

Bioquímicamente, estos puntos de comprobación están constituidos por unas vías de señalización intracelular que permiten a las células monitorizar en todo momento los eventos específicos del ciclo celular. Cuando los puntos de control detectan errores envían señales que promueven vías inhibitorias y/o inhiben vías activadoras, arrojando el ciclo celular (Hartwell 1989; Elledge 1996).

Los principales puntos de comprobación se encuentran controlando la replicación y reparación del ADN, y la segregación de los cromosomas:

- **Punto de control G1/S** (control del inicio del ciclo celular, detección de daño del ADN y arresto de las células en G1).
- **Punto de control G2/M** (detección de ADN dañado o no replicado y arresto de las células en G2 antes de que la mitosis comience).
- **Punto de control de la unión al huso mitótico** (asegurar que los cromosomas están correctamente alineados en la metafase antes de iniciar la anafase).

Si existe daño en el ADN, el sistema de control del ciclo celular lo detecta rápidamente arrojando el ciclo celular en dos puntos de control: uno en fase G1 tardía, previniendo la entrada en la fase S (punto de control G1/S); y el segundo en la fase G2 tardía, previniendo la entrada en mitosis (punto de control G2/M) (Zhou 2000).

Uno de los períodos críticos en el control del ciclo celular ocurre en la fase G1, cuando las células evalúan si deben dividirse irrevocablemente o incorporarse a un estado de reposo o quiescencia. Esta transición está determinada por el equilibrio entre los factores reguladores positivos y negativos. Las ciclinas del tipo D (D1, D2 y D3) formando complejos con las CDK4/6 y el complejo ciclina E-CDK2 estimulan esta transición y la progresión del ciclo celular. Mientras que los inhibidores de las CDK tales como la p16<sup>INK4a</sup> y la p27<sup>KIP1</sup> inhiben la división celular a este mismo nivel. De hecho, las interacciones bioquímicas que ocurren en la célula entre las cinasas dependientes de las ciclinas D y E y las CKI, son las encargadas de gobernar la transición G1/S. El principal papel de estas moléculas en la regulación de la proliferación se enfatiza por las frecuentes anomalías en su expresión y actividad en el cáncer humano.

Si se detecta ADN dañado en el punto de control G1/S, se bloquea la progresión a la fase S mediante la activación del gen *p53*. La proteína producto del *p53* induce el arresto celular en la fase G1 tardía mediante la acción de la CKI p21<sup>CIP1</sup>, que inhibe los complejos ciclina-CDK de esta fase, evitando la fosforilación de la pRb y ofreciendo así el tiempo necesario para que el ADN celular se repare (ver apartado 3.3.6.3.).

Aunque todas las fases del ciclo celular son esenciales, el punto de control G1/S encargado de la transición de la fase G1 a la fase S, es extremadamente importante, ya que una vez que la célula cruza esta barrera debe progresar obligatoriamente a la fase S y replicar su ADN, independientemente de su estado estructural. Si la célula no traspasa este punto y no replica su genoma, significa que no se dividirá y, por lo tanto, se dirige hacia la quiescencia o bien hacia la diferenciación (Dunphy 1994).

En el punto de control de G2/M o de bloqueo de la mitosis, la replicación incompleta del ADN impide la activación de complejos ciclina-CDK de fase M, y de este modo se bloquea la entrada en la fase de mitosis.

En el punto de control de la unión al huso mitótico cualquier cinetocore cromosómico que no esté correctamente unido al huso origina una serie de sucesos moleculares que impiden la separación de las cromátidas hermanas, evitando una distribución anómala de los cromosomas a las células hijas.

Si estos puntos de control no funcionan la célula se divide y el ADN dañado se transmite a la progenie celular. Los daños genéticos no reparados conllevan un incremento en la

frecuencia de mutaciones promotoras de cáncer. Asimismo, el hecho de que los tumores tengan una proliferación incrementada y desordenada, así como un gran número de cambios mutacionales, indica que las alteraciones en los puntos de control y las moléculas que los regulan son esenciales para la progresión tumoral.

### **3.2.2.5. Inicio del ciclo celular: colaboración entre los complejos ciclina D-CDK y ciclina E-CDK con las CKI en el punto de transición G1/S**

#### **Funciones de las ciclinas de tipo D**

En respuesta a señales mitogénicas, las células estables (fase G1) o quiescentes (fase G0) se incorporan al ciclo induciendo la codificación de los genes de las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3) y permitiendo el ensamblaje con sus subunidades catalíticas CDK4 y CDK6 a medida que las células progresan en la fase G1. Los complejos ciclina D-CDK se introducen entonces en el núcleo de la célula donde las cinasas activadoras de las CDK (CAK) los fosforilan para que puedan ejercer su función sobre los sustratos diana.

La señal mitogénica transducida por el *Ras* a través de una cascada de cinasas es la encargada de estimular la transcripción del gen de la ciclina D1 y también del ensamblaje con su CDK. Esto último lo demuestra el hecho de que las subunidades de ciclinas expresadas ectópicamente no se asocian eficientemente a las CDK en ausencia de señales mitogénicas, indicando que las cinasas de la vía del *Ras* actúan post-translacionalmente regulando el ensamblaje ciclina D-CDK. El recambio de las ciclinas D se realiza a través de una vía de señalización separada, pero también dependiente del *Ras* que regula

negativamente la fosforilación de la ciclina D1. La inhibición de esta vía conduce a la fosforilación de la ciclina D1, estimulando su salida del núcleo y acelerando su degradación citoplasmática mediante la vía ubiquitin-proteasoma.

Consecuentemente, las ciclinas de tipo D actúan como sensores de los factores mitogénicos, que son los encargados de estimular su transcripción, ensamblaje, transporte nuclear y recambio (**Esquema 4**). Es decir, una de las funciones principales de la ciclina D es proporcionar la conexión entre las señales mitogénicas y la maquinaria potencialmente autónoma del ciclo celular que, en las células vertebradas, está constituida por la CDK2, la CDK1 y sus reguladores. Así, las ciclinas del tipo D están generalmente ausentes de los ciclos celulares independientes de señales mitogénicas extrínsecas (p.e., *Xenopus* y *Drosophila*). Asimismo, cuando se produce una activación constante o una sobreexpresión de la ciclina D, ésta puede reducir o superar los requisitos de los factores mitógenos para la proliferación de la célula, contribuyendo a la transformación oncogénica (Sherr 1999).

Las ciclinas D y E, denominadas ciclinas G1 y G1/S, junto con sus subunidades catalíticas específicas respectivas, la CDK4/6 y la CDK2, regulan la fosforilación de la pRb, controlando así el punto de transición G1/S del ciclo celular (**Esquema 4**). De hecho, la función más reconocida de las cinasas dependientes de la ciclina D es la fosforilación de la pRb en la fase G1 media, después de lo cual la ciclina E-CDK2 se activa, terminando el proceso de fosforilación de la pRb (ver apartado 3.3.6.2.).

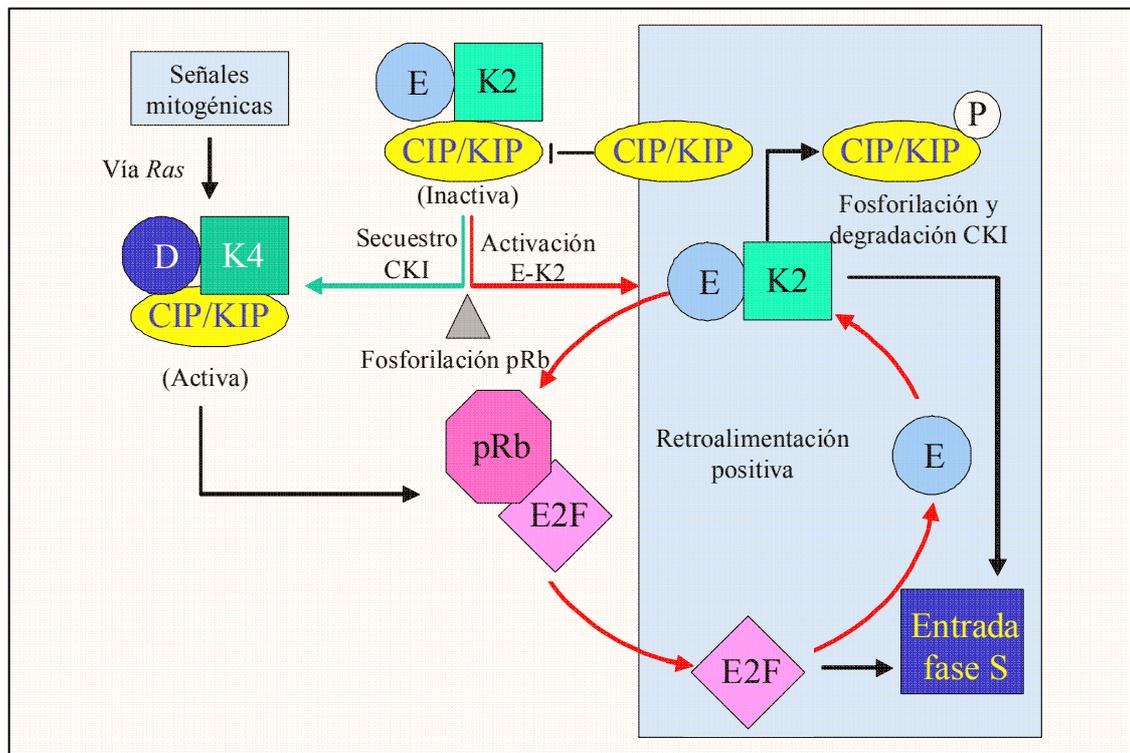
Una segunda función no catalítica de los complejos ciclina D-CDK4 es el secuestro de las CKI p27<sup>KIP1</sup> y p21<sup>CIP1</sup> (**Esquema 4**). En las células quiescentes, los niveles de p27<sup>KIP1</sup> son

relativamente altos, disminuyendo progresivamente durante la fase G1 a medida que se incrementan los complejos ciclina D-CDK en respuesta a las señales mitogénicas. Esto es debido a que la mayoría de la p27<sup>KIP1</sup> en las células proliferativas se une a los complejos formados por la ciclina D y las CDK (Polyak 1994; Toyoshima 1994).

Si las proteínas CIP/KIP son las encargadas de inhibir a la ciclina E-CDK2 en el ciclo celular y los complejos ciclina D-CDK4 son capaces de secuestrarlas, esto indicaría la existencia de una competición entre ambos complejos por las CKI. La finalidad última de esta competición es liberar a los complejos ciclina E-CDK2 de la acción inhibitoria de la p27<sup>KIP1</sup>, permitiendo que se activen y realicen su función en la progresión del ciclo celular.

Los niveles libres de las proteínas CIP/KIP pueden fijar también un umbral inhibitorio para la activación de las ciclinas E/A-CDK2 sintetizadas posteriormente en la fase G1. Una vez que el proceso de secuestro de las CIP/KIP por los complejos ciclina D-CDK disminuye el nivel de eficacia de las CKI a un punto crítico, la ciclina E-CDK2 es capaz de facilitar su propia activación accionando la degradación de las CKI mediante su fosforilación (Sheaff 1997; Vlach 1997).

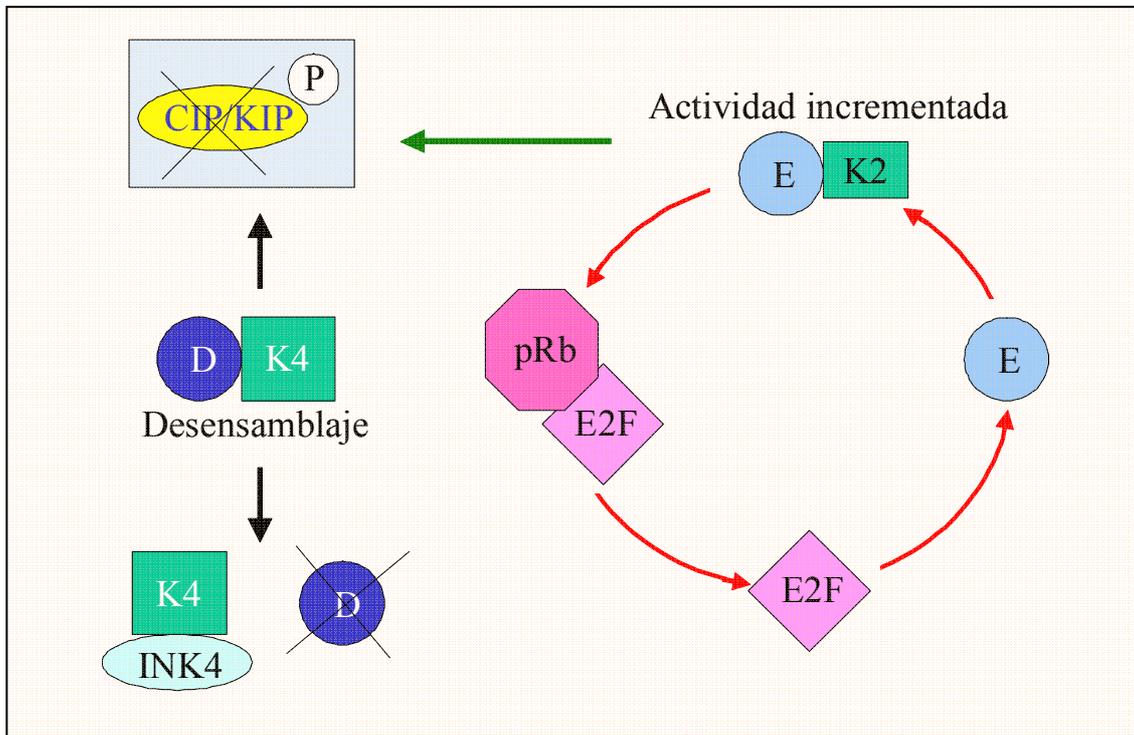
Se cree que algunas de las moléculas de p27<sup>KIP1</sup> y p21<sup>CIP1</sup> residuales siguen unidas a los complejos ciclina D-CDK en subsiguientes ciclos celulares. Este almacén latente de proteínas CIP/KIP se libera cuando los mitógenos y la síntesis de ciclina D disminuyen, de tal modo que inhiben a la ciclina E-CDK2 induciendo la detención de la célula en la fase G1. Esto explicaría las elevadas concentraciones de p27<sup>KIP1</sup> que se encuentran en las células quiescentes y en reposo replicativo (Xiong 1993; Kato 1994; Nourse 1994; Polyak 1994; Toyoshima 1994; Zhang 1994).



**Esquema 4. Regulación de la transición G1/S.** Las señales mitogénicas estimulan el ensamblaje activo del complejo formado por la ciclina D, las cinasas CDK4 (D-K4) o CDK6 y una proteína CIP/KIP. El secuestro de las proteínas CIP/KIP baja el umbral inhibitorio y facilita la activación del complejo ciclina E-CDK2 (E-K2). Las cinasas dependientes de la ciclina D y E contribuyen secuencialmente a la fosforilación de la pRb, liberando a los miembros de la familia E2F, permitiendo de esta forma la activación de los genes requeridos para la entrada en la fase S. Estos últimos incluyen a las ciclinas E y A, así como a una batería de productos que regulan el metabolismo de los nucleótidos y la síntesis del ADN. El complejo ciclina E-CDK2 fosforila a la  $p27^{KIP1}$  estimulando así su proteólisis a través de la vía ubiquitin-proteasoma. La degradación de las proteínas CIP/KIP y la inducción de las ciclinas por los E2F contribuyen a la independencia de las señales mitogénicas y a la irrevocabilidad de la transición G1/S.

La importancia relativa de las funciones catalíticas y no catalíticas de las cinasas dependientes de la ciclina D en la progresión de la fase G1 radica en que los complejos ciclinas E/A-CDK2 ensamblados a la  $p27^{KIP1}$  originan la detención de G1, mientras que los complejos ciclina D-CDK4 que se ensamblan con la  $p27^{KIP1}$  no frenan el ciclo celular. Es decir, la CDK4 es eficaz en el secuestro de miembros CIP/KIP, permitiendo mientras tanto la activación de la ciclina E-CDK2, que a su vez es capaz de catalizar la fosforilación de la pRb por sí misma (Jiang 1998). La conclusión que se extrae es que bajo circunstancias en donde los complejos ciclina D-CDK4 se sobreexpresan predomina su capacidad de secuestrar a las proteínas CIP/KIP.

Cuando las acciones inhibitorias de los miembros de la familia CIP/KIP sobre los complejos ciclina E/A-CDK2 se neutralizan totalmente, las cinasas dependientes de la ciclina D ya no son requeridas más para la progresión del ciclo celular (**Esquema 5**). En experimentos sobre células de ratones doble nulos para los genes  $p27^{KIP1}$  y  $p21^{CIP1}$ , la función de los complejos ciclina D-CDK4 se hace superflua y la CDK2 dependiente de las ciclinas E/A, sin oposición inhibitoria, parece ser suficiente para fosforilar a la pRb, lo que indica que estas células toleran una profunda reducción de la actividad cinasa dependiente de la ciclina D (Cheng 1999).



**Esquema 5. Efectos de la pérdida de la de función de las CIP/KIP.** La inhibición de la pRb permite la liberación de los E2F que estimulan la síntesis de ciclina E, incrementando así la actividad del complejo ciclina E-CDK2 (E-K2). Esto conduce a la degradación de las proteínas CIP/KIP. La pérdida de las proteínas CIP/KIP genera al desensamblaje de los complejos ciclina D-CDK4 (D-K4), incrementando el recambio de la ciclina D y el secuestro de las CDK4 por las proteínas INK4 (K4-INK4). No obstante, el aumento de la actividad del complejo ciclina E-CDK2 parece ser suficiente para compensar la pérdida de la fosforilación de la pRb por la ciclina D-CDK4.

**Los complejos ciclina D-CDK catalíticamente activos contienen subunidades CIP/KIP**

La fosforilación de la pRb y el secuestro de las proteínas CIP/KIP, dos de las funciones más importantes de los complejos ciclina D-CDK, no están en desacuerdo entre sí, ya que las proteínas CIP/KIP no inhiben la actividad cinasa de los complejos ciclina D-CDK frente a la pRb. De hecho, los complejos que actúan sobre la pRb en las células proliferativas son complejos ternarios ciclina D1/2-CDK4/6-p27<sup>KIP1</sup>/p21<sup>CIP1</sup> enzimáticamente activos. Esto apoya la hipótesis de que las CKI actúan también como moléculas reguladoras positivas de los complejos ciclina D-CDK.

*In vitro*, la p27<sup>KIP1</sup> inhibe a los complejos recombinantes de ciclina D-CDK, aunque es más eficaz antagonizando la actividad de la ciclina E-CDK2 (Polyak 1994; Toyoshima 1994). Tras medir la actividad específica de los complejos ciclina D-CDK4-p27<sup>KIP1</sup>/ p21<sup>CIP1</sup> *in vitro* no se observó inhibición significativa (Zhang 1994; Blain 1997; LaBaer 1997). De todas formas, esto no anula la posibilidad de que bajo ciertas circunstancias fisiológicas en donde las cantidades de p21<sup>CIP1</sup> o de p27<sup>KIP1</sup> sean más altas que las de los complejos ciclina D-CDK se produzca una inhibición directa de éstos (Koff 1993; Kato 1994). Esto contrasta con las características de los complejos que contienen CDK2, que son inhibidos *in vitro* por concentraciones equimolares de CIP/KIP (Russo 1996). Cuando la p27<sup>KIP1</sup> forma complejo con la ciclina A-CDK2 inhibe su acción invadiendo la subunidad catalítica para desestructurar el lugar de unión del ATP. No se ha identificado todavía la estructura de los complejos ciclina D-CDK que los hace relativamente resistentes a la interrupción funcional por las CIP/KIP.

En suma, los complejos ciclina D-CDK pueden secuestrar a las proteínas CIP/KIP sin ser inhibidos, mientras que las actividades catalíticas de los complejos que contienen CDK2 son inhibidas eficientemente por estas mismas CKI.

### **El ensamblaje ciclina D-CDK requiere CKI**

Los complejos de las ciclinas D-CDK no sólo resisten la inhibición de las proteínas CIP/KIP, sino que su ensamblaje y activación parecen estar facilitados por las interacciones con estas CKI. En sus estudios *in vitro* e *in vivo* LaBaer et al. (1997) observaron que las proteínas CIP/KIP se unen tanto a la subunidad reguladora (ciclina) como a la subunidad catalítica (CDK). Asimismo las proteínas CIP/KIP son capaces de dirigir a las ciclinas D al núcleo de la célula, aumentando así su estabilidad y estimulando la formación y activación del complejo. De esta forma, demostraron que la  $p21^{CIP1}$  y la  $p27^{KIP1}$  pueden promover activamente la interacción entre las ciclinas D y su subunidad CDK actuando como factores estabilizadores del complejo.

En un estudio complementario, Cheng et al. (1999) apreciaron que el ensamblaje de los complejos ciclina D1/D2-CDK4 estaba deteriorado en fibroblastos de embriones de ratones doble-nulos para los genes  $p21^{CIP1}$  y  $p27^{KIP1}$ . En estas células no se detectó fosforilación de la pRb, ni tampoco importación nuclear de ciclina D1 y, por lo tanto, la localización predominantemente citoplasmática precipitaba la degradación vía ubiquitin-proteasoma de las ciclinas D1. La reintroducción de  $p21^{CIP1}$  o  $p27^{KIP1}$  en dichas células restablecía la formación, el transporte y las funciones de los complejos ciclina D-CDK4.

La interpretación mecánica más simple es que una sola molécula de CIP/KIP puede entrar en contacto con las subunidades ciclina D y subunidades CDK4/CDK6 para estabilizarlas en un complejo ternario activo. Lo más probable es que los componentes de este complejo entren en contacto en un orden determinado. La p27<sup>KIP1</sup> se uniría primero a la ciclina D1 y en seguida entraría en contacto con la CDK4, a través de una interacción más débil que no conduce a la inhibición del complejo, pero es suficiente para estabilizarlo.

Ningunos de estos estudios excluyen la posibilidad que los complejos ciclina D-CDK-CIP/KIP puedan contener otras moléculas adicionales de baja masa molecular aún no descritas, que contribuyan a proteger a la enzima binaria de la inhibición por las CKI. Otra opción alternativa es que mediante modificaciones post-translacionales alguna de las subunidades se altere volviéndose insensible a la inhibición.

### **Las proteínas INK4 compiten con las proteínas CIP/KIP para inducir el arresto de la fase G1**

La idea que las proteínas CIP/KIP pueden actuar como reguladores positivos de los complejos ciclina D-CDK tiene implicaciones importantes en cómo interpretamos los efectos de otras moléculas que gobiernan la progresión de la transición G1/S, como por ejemplo las CKI de la familia INK4.

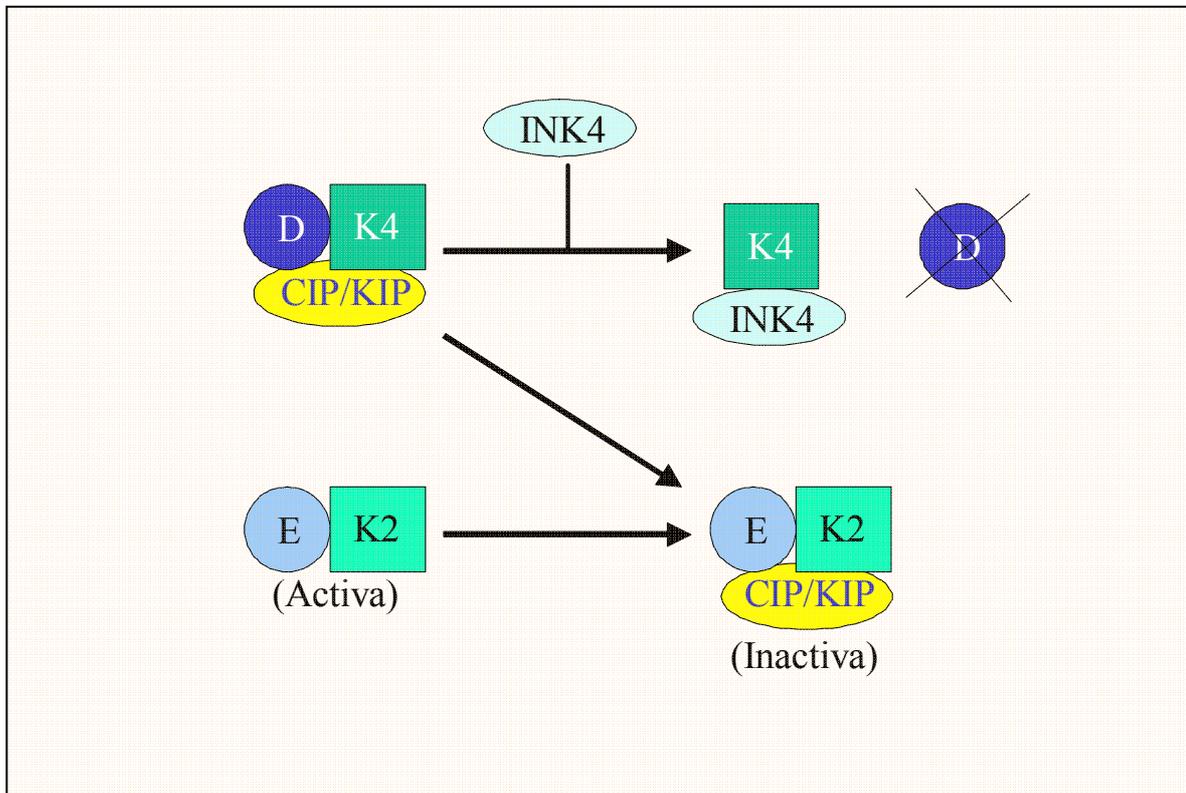
Teóricamente, la sobreexpresión de las proteínas INK4 arresta el ciclo celular en la fase G1 dependientemente de la integridad de la pRb (Guan 1994; Koh 1995; Lukas 1995; Medema 1995). La interpretación más sencilla es que las INK4 inhiben a las cinasas dependientes

de ciclina D, manteniendo así a la pRb en un estado hipofosforilado que impide la progresión de la transición G1/S.

Aparte de formar complejos con la subunidad reguladora y las CKI, las CDK4 pueden formar complejos binarios con una proteína INK4 (**Esquema 6**). Estos heterodímeros catalíticamente inactivos son estables y no hay evidencia que las CDK4 que los constituyen puedan ser reclutadas para formar complejos activos con las ciclinas de tipo D (Hall 1995; Parry 1995). Por lo tanto, las proteínas INK4 pueden competir con las proteínas CIP/KIP y las con ciclinas D por las CDK4 (Parry 1999).

Unas cantidades excesivas de proteínas INK4 podrían alterar la distribución de las CDK4 a favor de los complejos INK4-CDK4, evitando su unión con las ciclinas D y el secuestro de las proteínas CIP/KIP durante la fase G1. Esto generaría, en ausencia de activación de la pRb, el bloqueo de la transición G1/S. En segundo término, la liberación de las proteínas CIP/KIP de su reservorio latente produciría la redistribución de la p27<sup>KIP1</sup> de los complejos ciclina D-CDK4 a los complejos ciclina E-CDK2, lo que produciría la inhibición de estos últimos, favoreciendo la detención en la fase G1. De estas dos formas las proteínas INK4 alcanzarían su finalidad: impedir la progresión del ciclo celular (**Esquema 6**).

Es decir, la detención del crecimiento mediada por las INK4 depende no sólo de la inhibición de la fosforilación de la pRb, sino también de la movilización de las proteínas CIP/KIP de los complejos ciclina D-CDK4 a los complejos ciclina E-CDK2 y, en este aspecto la función de las INK4 es parcialmente independiente de la función de la pRb.



**Esquema 6. Papel de las proteínas INK4.** Las proteínas INK4 pueden antagonizar el ensamblaje de los complejos ciclina-CDK uniéndose a la CDK4 (K4) o a la CDK6. El aumento de la síntesis de INK4 y la formación de los complejos INK4-CDK4 (K4-INK4), produce la desestabilización de la ciclina D y la liberación de las proteínas CIP/KIP de su almacén latente. Las CIP/KIP inhiben a las CDK2 (K2) dependientes de las ciclinas E/A bloqueando el avance del ciclo celular.

## Resumen

En resumen, hay una simetría en la organización de la fase G1, que se centra alrededor de los reguladores negativos pRb y CIP/KIP. Inicialmente, los efectos inhibidores de la pRb y de las CIP/KIP en la proliferación de la célula se superan a su vez con un programa dependiente de mitógenos mediado por las ciclinas D. En respuesta al estímulo continuo mitogénico, los complejos ciclinas D-CDK se acumulan y realizan dos funciones: fosforilar a la pRb inactivándola y secuestrar a las proteínas CIP/KIP (p27<sup>KIP1</sup> y p21<sup>CIP1</sup>). La aparición de la actividad CDK2 durante G1 requiere la inactivación, al menos parcial, de las proteínas CIP/KIP y de la pRb y es por lo tanto dependiente de la activación previa de la ciclina D. Una vez que la CDK2 es activa, refuerza a la CDK4 para terminar la fosforilación de la pRb y también inicia la destrucción de la p27<sup>KIP1</sup>. Esto permite reducir la dependencia de la célula a las señales mitogénicas para completar el ciclo celular y, en este sentido, da lugar a una entrada irreversible de las células en la fase S. La proteólisis de la ciclina E en la fase S (Clurman 1996; Won 1996) y la degradación de la ciclina A en G2 (King 1996; Peters 1998), permite el avance a la fase de mitosis. Una vez se finaliza el ciclo celular, la célula vuelve al estado de reposo (fase G1 inicial). Esto restablece el período de dependencia de mitógenos y el requisito de la ciclina D en la fase G1 para iniciar el próximo ciclo celular.

La existencia de una función reguladora positiva de la p27<sup>KIP1</sup> sobre las cinasas dependientes de la ciclina D, desafía asunciones anteriores sobre cómo se gobierna la transición G1/S del ciclo en la célula mamífera y ayuda a explicar algunas características enigmáticas del control del ciclo celular que implican las funciones de la pRb y de las

proteínas INK4. Asimismo, ofrece nuevas opciones respecto a cómo la pérdida de p16<sup>INK4a</sup> o la sobreexpresión de las CDK4 o CDK6 dependientes de la ciclina D contribuyen al desarrollo de tumores.

### **3.3. BASES MOLECULARES EN EL DESARROLLO DE TUMORES**

Las alteraciones genéticas que promueven la proliferación celular neoplásica pueden ocurrir en cualquiera de los diferentes niveles del ciclo celular antes mencionados: factores de crecimiento, receptores, vías de transducción de señales y puntos de restricción del propio ciclo celular, etc. Estas moléculas que toman parte en el ciclo celular ejercen efectos estimuladores o inhibidores y, por ello, los genes que las codifican pueden ser estimuladores (protooncogenes) o inhibidores (genes supresores de tumores o antioncogenes) del ciclo celular. El equilibrio entre las acciones estimuladoras e inhibitoras realizadas por los productos de los protooncogenes y de los genes supresores de tumores, respectivamente, permite una proliferación celular controlada y balanceada según las necesidades de la célula y del tejido del que forma parte.

Alteraciones por diferentes mecanismos en la expresión de estos genes que toman parte en las vías de estimulación e inhibición del crecimiento y de la división celular normal, pueden llegar a estimular una proliferación celular incontrolada característica del cáncer, ya sea por la transformación de los genes estimuladores en oncogenes, o por la pérdida de la inhibición del crecimiento celular que ofrecen los antioncogenes. Consecuentemente, es lógico pensar que las proliferaciones celulares normales y anormales siguen vías similares (Cotran 1999; Alberts 2002).

### **3.3.1. Definición de oncogenes, protooncogenes y su relación con los virus**

Los oncogenes o genes causantes de cáncer se describieron por primera vez en los retrovirus transformantes agudos como secuencias del genoma vírico capaces de producir una rápida inducción de tumores en animales, recibiendo el nombre de oncogenes virales (v-oncogenes). Los oncogenes virales pueden estar presentes en los virus ADN y ARN. Un ejemplo sería el VHH-8, un virus ADN de la familia de los herpesvirus en el que se han identificado varios v-oncogenes (ver apartado 3.1.4.).

Posteriormente, la hibridación molecular ha mostrado que las secuencias de los v-oncogenes son casi idénticas a secuencias presentes en el ADN celular normal, por lo que se supone que probablemente durante la evolución las secuencias de los v-oncogenes fueron transferidas, por recombinación o transducción, de los virus al ADN normal de la célula huésped infectada o bien a la inversa.

En algunos virus ARN causantes de cáncer no se identifican v-oncogenes. Probablemente, el mecanismo mediante el cual estos virus originan neoplasias implica la transformación de los genes celulares que promueven el crecimiento y diferenciación normales o protooncogenes en oncogenes, mediante procesos de mutagénesis insercional. Ésta se basa en que dentro de las células infectadas los virus producen una disección molecular del ADN, de forma que el ADN-proviral se integra cerca de protooncogenes de la célula huésped, provocando un cambio estructural (mutaciones puntuales, reordenamientos cromosómicos por translocaciones o inversiones, y amplificaciones génicas), convirtiéndolos en oncogenes celulares (c-oncogenes). En otros casos, el ADN-proviral

puede actuar como un potente promotor que, insertado en la vecindad de los protooncogenes celulares, promueva una expresión disrregulada del gen (Cotran 1999).

Evidentemente, de todas estas investigaciones se dedujo la posibilidad de que en los cánceres no relacionadas con infecciones víricas también podían existir c-oncogenes, teóricamente originados a partir de protooncogenes transformados por otras causas (p.e., agentes mutágenos físicos o químicos, etc.), aunque mediante mecanismos semejantes: cambios estructurales y/o en la expresión genética.

La transformación de los protooncogenes en oncogenes por cambios en la estructura de los genes implica la síntesis de una proteína anormal (oncoproteína), que posee una función aberrante. Por otra parte, los cambios en la regulación de la expresión del gen originan una producción inapropiada o incrementada de una proteína promotora del crecimiento estructuralmente normal.

En resumen, los protooncogenes son genes celulares que promueven el crecimiento y la diferenciación normales, y los oncogenes son genes causantes de cáncer que suelen originarse por alteraciones de los protooncogenes debidas a causas diversas (c-oncogenes) o bien por infecciones víricas (v-oncogenes).

### **3.3.1.1. Productos proteínicos de los oncogenes**

Las oncoproteínas codificadas por los oncogenes se asemejan a los productos normales de los protooncogenes, pero no poseen elementos reguladores y su producción no suele depender de factores de crecimiento ni de otras señales externas.

Desde este punto de vista, podemos identificar a los oncogenes y oncoproteínas como versiones alteradas de sus equivalentes normales y agruparlos según la función que ejerzan en la proliferación celular (factores de crecimiento, receptores, etc).

### **3.3.2. Genes supresores de tumores o antioncogenes**

Los genes supresores de tumores son los responsables de codificar la mayoría de los componentes de las vías inhibitoras del crecimiento. En el sentido estricto de la palabra, el término “genes supresores de tumores” es erróneo ya que la función fisiológica de estos genes es regular negativamente el crecimiento celular, no prevenir el desarrollo de cáncer. Por ello, la pérdida de la actividad inhibitora de estos genes permite también una proliferación celular anormal e incontrolada y el consiguiente desarrollo de neoplasias, siendo su inactividad un elemento clave en muchos cánceres humanos.

Una de las características de los genes supresores de tumores es que son recesivos; es decir, para que pierdan su acción ambos alelos del gen deben estar inactivados o perdidos, ya sea de forma hereditaria, adquirida o combinada (Alberts 2002).

### **3.3.2.1. Productos proteínicos de los genes supresores de tumores**

Las vías de inhibición del crecimiento se conocen mucho menos que las vías de estimulación reguladas por los protooncogenes. No obstante, es razonable pensar que sigan un modelo paralelo; es decir, las señales inhibitoras del crecimiento se originan fuera de la célula y usan receptores, señales transductoras y factores de transcripción nuclear y productos del ciclo celular para completar sus efectos.

Existen, además de los que examinaremos a continuación, un importante número de genes supresores de tumores asociados a síndromes clínicos bien establecidos, pero que no poseen una función totalmente definida. Entre ellos cabe destacar el gen *NF-2* (gen de la neurofibromatosis tipo 2), el gen *VHL* (gen del Von Hippel-Lindau), el gen *PTEN* (gen homólogo de la fosfatasa y tensina), el gen *WT-1* (gen del tumor de Wilms), y por último, los genes *BRCA-1* y *BRCA-2* (Cotran 1999).

### **3.3.3. Alteraciones en los factores de crecimiento**

#### **3.3.3.1. Oncogenes que actúan como factores de crecimiento**

Los genes que codifican los factores de crecimiento pueden volverse oncogénicos debido a mutaciones, como por ejemplo el protooncogen *c-sis*, que codifica la cadena  $\beta$  del PDGF; o bien algunos oncogenes pueden codificar homólogos de los factores de crecimiento, como ocurre en el caso del FGF-  $\beta$ .

No obstante, en la gran mayoría de los casos el gen del factor de crecimiento no se encuentra alterado o mutado, sino que productos de otros oncogenes causan su sobreexpresión génica forzando a la célula a secretar una gran cantidad de estos factores estructuralmente normales (p.e., TGF- $\alpha$ ) (Pusztai 1993).

### **3.3.3.2. Genes supresores de tumores que actúan como factores de crecimiento**

Alteraciones en los factores inhibidores, como el TGF- $\beta$ , un factor encargado de inhibir la transcripción de genes promotores del crecimiento a través de la estimulación de la síntesis de las CKI p27<sup>KIP1</sup> y p15<sup>INK4b</sup>, también tendrían consecuencias en la proliferación celular.

### **3.3.4. Receptores de factores de crecimiento de la superficie celular**

#### **3.3.4.1. Oncogenes que actúan como receptores**

Las versiones oncogénicas de los receptores están asociadas a una activación persistente sin unión evidente a un ligando específico, liberando continuamente señales mitogénicas a la célula. Generalmente, los mecanismos que transforman a estos receptores en oncogénicos son las mutaciones, los reordenamientos y las sobreexpresiones genéticas.

El protooncogén *ret*, un receptor expresado normalmente en las células neuroendocrinas, es susceptible de sufrir mutaciones y reordenamientos. Las mutaciones puntuales del protooncogén *ret* en las células germinales se asocian a los síndromes hereditarios MEN 2A, MEN 2B y a los carcinomas medulares de tiroides hereditarios. Mientras que los

reordenamientos somáticos del gen *ret* suelen ocurrir en los casos esporádicos del carcinoma medular de tiroides. Las mutaciones y los reordenamientos producen básicamente alteraciones estructurales en algunos de los dominios extracelular o citoplasmático del receptor, lo que en general provoca su activación continua (Komminoth 1997).

La familia de los receptores EGF se altera frecuentemente por sobreexpresión secundaria a una amplificación genética. La sobreexpresión hace que estos receptores se tornen exquisitamente sensibles a una cantidad muy pequeña de factores de crecimiento, incrementando de forma exagerada sus efectos. Por ello, altos niveles del receptor c-neu (c-erb B2) perteneciente a esta familia en los carcinomas de mama, indican un mal pronóstico (Salomon 1995).

#### **3.3.4.2. Genes supresores de tumores que actúan como receptores**

Varios receptores de superficie celular que se unen a factores de crecimiento y proteínas inhibitoras reguladoras de las adhesiones celulares pueden alterar el crecimiento celular.

Las mutaciones en el receptor y las vías de señalización del TGF- $\beta$ , un factor de crecimiento inhibitor, se han identificado en varios cánceres.

Las cadherinas son glicoproteínas que toman parte en la adhesión intercelular y su pérdida permite la disgregación celular, facilitando la invasión local y las metástasis. De hecho, la

disminución de la expresión de la E-cadherina se ha identificado en numerosos cánceres (Shiozaki 1996).

La molécula DCC o Delecionada en los Carcinomas de Colon, denominada así porque se localiza en una región cromosómica frecuentemente deleccionada en los carcinomas colorrectales, se ha considerado una candidata a gen supresor de tumores, porque parece estar involucrada en las interacciones célula-célula y célula-matriz, y posiblemente en la disgregación intercelular (Fazeli 1997).

### **3.3.5. Sistemas de transducción de señales**

#### **3.3.5.1. Oncogenes que actúan como sistemas de transducción de señales**

Algunas oncoproteínas pueden realizar las mismas funciones que las proteínas transductoras de señales y por ello suelen estar estratégicamente localizadas en la cara interna de la membrana celular.

Uno de los oncogenes dominantes más frecuentes en los tumores humanos es la del gen *ras*. Las proteínas *ras* normales están ancladas en la cara interna de la membrana y pasan cíclicamente de una forma activa *ras*-GDP (transmisora de señales) a una forma inactiva *ras*-GTP (estado quiescente). La forma *ras*-GDP activa se une a la MAP-cinasa, que a su vez estimula a factores de transcripción nucleares que promueven la mitogénesis.

La actividad cíclica de las proteínas ras está estrechamente controlada por reacciones enzimáticas. La inactivación del ras está regulada por las GTPasas, cuya activación a su vez está potenciada por proteínas activadoras de GTPasas o GAPs, que originan una hidrólisis aún más rápida del GTP, finalizando así la transducción de señales. Por lo tanto, la función de las GAPs es frenar y prevenir la actividad incontrolada del ras (Macara 1996).

Cuando existe una mutación del gen ras o bien de las GAPs se produce una activación continua patológica de la vía de transducción de señales del gen *ras*, lo que provoca un estímulo constante de la proliferación celular.

### **3.3.5.2. Genes supresores de tumores que actúan como sistemas de transducción de señales**

La infrarregulación en las señales promotoras del crecimiento es otra área potencial en la que los genes supresores de tumores pueden ser operativos. El gen *APC* y el gen *NF-1* son dos genes supresores de tumores cuyas mutaciones germinales se asocian con el desarrollo de tumores benignos, que se comportarán como precursores de posteriores carcinomas.

Los individuos con poliposis adenomatosa familiar nacen con un alelo mutado del gen *APC* (Complejo Promotor de la Anafase), y cuando pierden la segunda copia desarrollan invariablemente cientos o miles de pólipos adenomatosos en el colon y generalmente uno o más de estos pólipos sufren transformación maligna hacia carcinomas. La implicación del gen *APC* en el desarrollo de los carcinomas colónicos es evidente, ya que en la mayoría de

los carcinomas colorrectales no familiares (70%-80%) y de los adenomas esporádicos se observa una pérdida homocigota del gen.

Como ya vimos en el apartado 3.2.2.3., el complejo APC se encuentra en el citoplasma celular degradando proteínas, como por ejemplo la  $\beta$ -catenina, una proteína capaz de entrar en el núcleo y activar la transcripción de genes promotores de tumores. La función del *APC* es mantener los niveles bajos de  $\beta$ -catenina en el citoplasma mediante su proteólisis. Si se inactiva el APC, se incrementan los niveles de  $\beta$ -catenina y consecuentemente se estimula la proliferación celular (Gumbiner 1997; Shibata 1997). Existen carcinomas colorrectales donde el gen *APC* es normal, y sin embargo el gen que codifica a la  $\beta$ -catenina está mutado. Esto hace que la  $\beta$ -catenina no sea susceptible de ser degradada por el complejo APC (Peifer 1997).

Los pacientes con neurofibromatosis tipo 1 heredan una única copia del gen *NF-1*, y presumiblemente a causa de la pérdida de la segunda copia estos pacientes comienzan a desarrollar numerosos neurofibromas, y alguno de ellos puede transformarse en neurofibrosarcomas. La neurofibromina, el producto proteínico del gen *NF-1*, es una GAP o proteína activadora de las GTPasas que regulan la vía de transducción de señales de la proteína ras permitiendo su inactivación rápida. La pérdida del *NF-1* provoca un estado activo del gen ras que emite señales mitogénicas continuas.

### **3.3.6. Factores de transcripción nuclear**

En última instancia todas las señales de transducción entran en el núcleo y actúan a través de factores de transcripción sobre una serie de genes reguladores del crecimiento, cuyos productos se localizan en el núcleo y permiten el avance ordenado del ciclo celular. Los factores de transcripción contienen aminoácidos específicos que les permiten unirse al ADN, activando o inhibiendo la transcripción genética. Por ello, no es raro que mutaciones que afecten a genes que codifican factores de transcripción nuclear se asocien a transformación maligna.

Entre los factores de transcripción que regulan la proliferación celular existen una serie de protooncogenes, como el *c-myc*, y varios tipos de genes supresores de tumores o antioncogenes, como el *p53* y el *Rb*, cuyas mutaciones se han demostrado asociadas al desarrollo de tumores.

#### **3.3.6.1. El gen *c-myc***

El protooncogén *c-myc* es un factor de transcripción que se une a secuencias específicas de ADN activando la producción de genes críticos para la síntesis del ADN, como ciertas CDK, entre ellas la CDK2. De hecho su inhibición evita la entrada de la célula en la fase S.

Tras su activación, la proteína *c-myc* se transloca rápidamente al núcleo formando un heterodímero con otra proteína denominada *max*. El heterodímero *myc-max* se une a secuencias específicas de ADN actuando como un potente activador transcripcional. La

proteína *max* puede unirse también a otra proteína, llamada *mad*, formando el heterodímero *mad-max* que actúa como un represor de la activación transcripcional. De este modo, la proteína *mad* podría considerarse un antioncogén o gen supresor de tumores. Por lo tanto, el grado de activación transcripcional del *c-myc* está regulado por sus propios niveles, y también por la disponibilidad de las proteínas *mad* y *max* (Desbarats 1996).

El gen *c-myc* no sólo controla el crecimiento celular, sino que también conduce a la célula a la apoptosis. Si la activación del *c-myc* ocurre en ausencia de señales de supervivencia (factores de crecimiento) las células sufren apoptosis. Se trata de un modelo de conflicto: la apoptosis ocurre cuando hay un conflicto entre las señales de parada (ausencia de factores de crecimiento) y avance (activación del *c-myc*) del ciclo celular (Green 1997).

El gen *c-myc* se considera como uno de los factores de transcripción más comúnmente afectados en tumores humanos (mama, colon, pulmón, etc.), ya que sus versiones oncogénicas se asocian a una transcripción mantenida de genes críticos del ciclo celular que posibilitan la transformación neoplásica. Por ejemplo, la disregulación del *c-myc* puede producir una sobreexpresión del complejo ciclina E-CDK2, con la consiguiente progresión patológica del ciclo celular. Asimismo, la disregulación del *c-myc* debida a una translocación es una de las alteraciones responsables del desarrollo del linfoma de Burkitt (Koskinen 1993; Grandori 1997).

### 3.3.6.2. El gen del retinoblastoma (*Rb*)

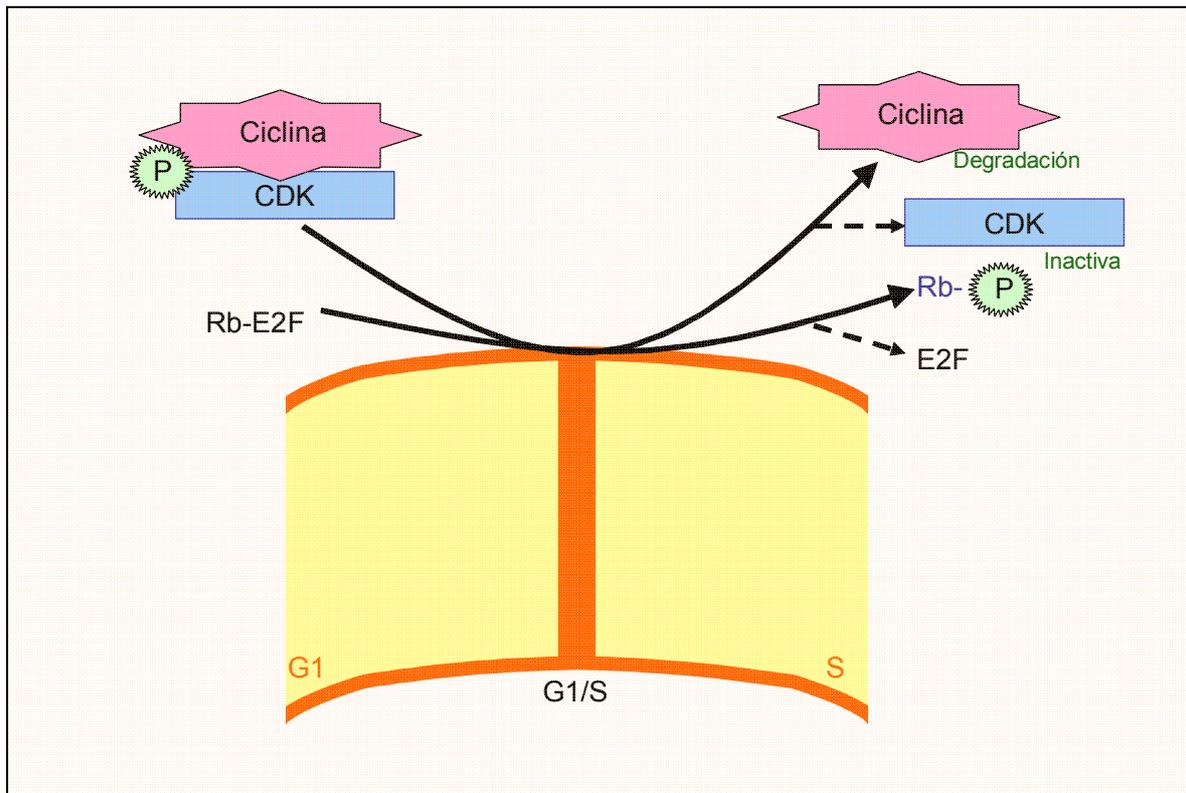
El gen *Rb* fue uno de los primeros genes supresores de tumores descritos y posee un papel crítico y esencial en la regulación del ciclo celular: frenar la transición entre las fases G1 y S.

El producto del gen del retinoblastoma, la proteína Rb (pRb), puede encontrarse en forma activa (hipofosforilada) o en forma inactiva (hiperfosforilada). La pRb hipofosforilada previene la replicación celular uniéndose y secuestrando a varios miembros de la familia de los factores de transcripción E2F (Harbour 2000). La represión activa del ciclo celular por el complejo pRb-E2F es necesaria para detener a la célula en la fase G1 frente a ciertas señales antiproliferativas. Cuando los factores de crecimiento estimulan la proliferación celular, las concentraciones de las ciclinas D y E aumentan y, por lo tanto, también aumenta la formación de los complejos formados por estas ciclinas (ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 y ciclina E-CDK2), capaces de fosforilar e inactivar a la pRb.

La hiperfosforilación de la pRb en la fase G1 final libera a los E2F, lo que activa la transcripción coordinada de una batería de genes cuyas actividades son esenciales para que las células atraviesen el punto de control G1/S y entren en la fase S (p.e., ciclinas de fase S) y comiencen la síntesis de ADN (ADN polimerasas, timidin-cinasas, etc). Entre los genes regulados por los E2F se encuentran las ciclinas E y A, ambas requeridas para catalizar la transición G1/S. La capacidad de los E2F de inducir la síntesis de ciclina E, que una vez unida a la CDK2 refuerza la fosforilación de la pRb, crea un bucle de retroalimentación positivo que contribuye a la irrevocabilidad de la transición G1/S. De

hecho, se ha objetivado que las células quiescentes pueden entrar en la fase S debido a una sobreexpresión de los E2F, lo que destaca el papel central de esta familia de factores en la regulación de la transición G1/S.

Las CDK dependientes de ciclina A y B activadas posteriormente en el ciclo celular mantienen a la pRb hiperfosforilada hasta que las células salen de la mitosis. Al final de la mitosis, la acción de las fosfatasas permite a los grupos fosfatos abandonar a la pRb, regenerando en la fase G1 temprana la forma hipofosforilada o activa de la pRb, que vuelve de nuevo a controlar la transición G1/S (Cotran 1999) (**Esquema 7**).



**Esquema 7:** Las ciclinas D y E, junto con sus subunidades catalíticas específicas, la CDK4/6 y CDK2 respectivamente, regulan secuencialmente la fosforilación de la pRb, controlando así el punto de transición G1/S del ciclo celular.

La consecuencia principal de que la proteína Rb esté ausente o bien haya perdido su habilidad para regular a los factores de transcripción E2F, independientemente de la causa, es que la célula entra libremente y sin ningún tipo de control en la fase S.

Evidentemente, el estado de fosforilación de la pRb es un determinante crítico de la progresión del ciclo celular. Por ello, mutaciones en genes que controlen la fosforilación de la pRb pueden simular los efectos de una pérdida del *Rb*, aunque el gen en sí mismo no esté alterado. El incremento o la activación mutacional de la ciclina D y E, o bien de la actividad de las CDK de fase G1 y S, encargadas de la fosforilación de la pRb, favorecería también la proliferación celular. De la misma forma, la inactivación de las CKI (p.e., deleciones o mutaciones del p16<sup>INK4a</sup>) provocaría una activación sin control de los complejos ciclina-CDK y la consiguiente inactivación de la pRb, desembocando finalmente en una proliferación celular.

Existen otras vías de la regulación del crecimiento celular que convergen en la pRb, y que si se ven alteradas pueden originar oncogénesis, aunque el gen del *Rb* este íntegro (Cotran 1999):

- El TGF- $\beta$  y el gen *p53* realizan su acción inhibitoria de la proliferación celular mediante la sobre-regulación de las CKI p27<sup>KIP1</sup>, p15<sup>INK4b</sup> y p21<sup>CIP1</sup> respectivamente. Esto incrementa la inhibición de los complejos ciclina-CDK, disminuyendo la fosforilación de la pRb, activándola e impidiendo el paso de la transición G1/S.

- Algunos virus humanos ADN pueden neutralizar las actividades inhibitorias de la pRb (p.e., proteína E7 del VPH).

### **3.3.6.3. El gen del *p53***

Aproximadamente el 50% de las neoplasias humanas contienen mutaciones en el gen supresor de tumores *p53*. Las mutaciones que inactivan al gen son en su mayor parte adquiridas en las células somáticas y menos frecuentemente hereditarias (Síndrome de Li-Fraumeni) (Evans 1997). El hecho de que las mutaciones del *p53* sean tan comunes en una amplia variedad de tumores sugiere que la proteína p53 es un producto importante contra la formación de cáncer (Levine 1997).

La p53 se localiza en el núcleo y su función primaria es controlar la transcripción correcta de otros genes. Al contrario que la pRb, en condiciones fisiológicas el *p53* no controla continuamente el ciclo celular y sólo se activa cuando se daña el ADN (Caspari 2000). De hecho, en condiciones normales, la p53 se presenta en concentraciones muy bajas ya que interactúa con la Mdm2, una ubiquitin-ligasa que lo señala para su destrucción a través de la vía ubiquitin-proteasoma, manteniendo de esta forma unos niveles basales de p53. Si se daña el ADN se produce entonces una activación y un rápido incremento de los niveles de la p53, que actúa como factor de transcripción uniéndose al ADN y estimulando la transcripción de varios genes que median sus dos principales efectos: el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Cotran 1999).

La p53 induce el arresto celular en la fase G1 tardía estimulando la transcripción del gen de la proteína p21<sup>CIP1</sup>, una CKI que se une a los complejos CDK-G1/S y CDK-S inhibiéndolos y bloqueando así la entrada a la fase S. Asimismo, El ADN dañado es también capaz de inactivar a las protein-cinasas que fosforilan a la p53, reduciendo así su unión con la Mdm2 y, de esta forma, su degradación. Esto aumenta la concentración celular de la p53, y consecuentemente la transcripción genética de la p21<sup>CIP1</sup> y la inhibición de los complejos CDK.

La acción inhibitoria de la p21<sup>CIP1</sup> sobre los complejos ciclina-CDK previene la fosforilación del pRb y ofrece así el tiempo necesario para que el ADN celular se repare. Si el ADN se repara, la p53 activa el gen de la Mdm2 (Haupt 1997), cuya proteína producto permite su propia degradación, dejando que el ciclo continúe. Si el ADN no se repara, la p53 induce la activación de los genes inductores de la apoptosis bax e IGF-BP3. El bax se une y antagoniza la acción de la proteína inhibidora de la apoptosis bcl-2, y el IGF-BP3 se une al receptor IGF bloqueando sus señales intracelulares, induciendo de este modo la apoptosis.

Existen diferentes mecanismos que inactivan las funciones de la p53:

- Las mutaciones más comunes de la p53 afectan sobre todo al dominio que la une al ADN, impidiendo así la transcripción de genes dependientes de la p53. Con la pérdida homocigota del *p53*, el ADN no se repara y las mutaciones quedan fijas en las células que se dividen, abriendo un camino a la transformación maligna.

- Las proteínas transformantes de varios virus ADN, incluyendo la proteína E6 del virus del papiloma humano, pueden unirse a la p53 degradándola (ver apartado 3.3.11.) (Scheffner 1992).
- La Mdm2 puede estar sobreexpresada como resultado de una amplificación genética, actuando como un oncogén al promover la rápida degradación de la p53.

En resumen, la p53 detecta el daño del ADN y permite su arreglo mediante el arresto de la célula en G1 y la inducción de genes reparadores del ADN. Si el ADN no puede ser reparado, la p53 hace que la célula entre en apoptosis. Por todo ello, el gen del *p53* ha recibido el nombre de guardián del genoma.

### **3.3.7. Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas**

Como hemos comentado previamente, la progresión ordenada a través de las fases del ciclo celular en las células animales está gobernada por los complejos ciclinas-CDK y éstos, a su vez, por sus reguladores: proteínas inhibidoras o CKI, protein-cinasas, fosfatasa y, finalmente, por procesos de síntesis y degradación.

Es lógico pensar que si la actividad de las CDK es una de las principales responsables del control del ciclo celular, alteraciones que provoquen cambios en la actividad de los complejos ciclina-CDK y en los niveles de cualquiera de sus reguladores, pueden alterar la progresión normal del ciclo celular e inducir el desarrollo de tumores. De hecho, la alteración en la expresión de ciclina D1 y en la CDK4 y, como veremos posteriormente,

trastornos en las CKI, en particular la p16<sup>INK4a</sup> y la p27<sup>KIP1</sup>, parecen ser eventos comunes en varios cánceres humanos.

### **3.3.8. Alteraciones en los genes que regulan la reparación del ADN**

El daño del ADN puede originarse a partir de múltiples agentes ambientales (radiación ionizante, luz solar, carcinógenos de la dieta, etc) o bien por alteraciones resultantes de errores que ocurren espontáneamente durante la replicación del ADN. Por ello, las células normales deben poseer la habilidad no sólo de detectar el daño del ADN (ver apartado 3.2.2.4.), sino también de repararlo.

La importancia de la reparación del ADN reside en mantener la integridad del genoma y sobre todo de los genes que regulan el crecimiento y la apoptosis celular. Los genes que reparan el ADN no son por sí mismos oncogénicos, sin embargo si no realizan su función permiten mutaciones en protooncogenes y genes supresores de tumores importantes en el proceso de la división celular normal. De hecho, los genes reparadores del ADN se comportan en su modo de herencia de forma parecida a los genes supresores de tumores, pero en contraste a éstos no afectan directamente al crecimiento celular.

Existen varias enfermedades hereditarias donde los genes que codifican proteínas involucradas en la reparación del ADN son defectivas, siendo estos pacientes los que poseen el mayor riesgo de desarrollar cáncer (síndrome de Bloom, anemia de Fanconi y la Ataxia-telangiectasia), en comparación con otras mutaciones hereditarias.

Las células con alteraciones en los genes que reparan el ADN poseen el denominado fenotipo de error de replicación (RER), que puede documentarse rápidamente examinando las secuencias de microsatélites del ADN de las células tumorales. Los microsatélites son repeticiones seguidas de nucleótidos dispersas a lo largo del genoma, fijas durante la vida y en cada tejido, y cuya disposición se altera cuando hay un error en el ADN. Por tanto, la inestabilidad de microsatélites es la marca de una reparación delectuosa y de una alteración del ADN (Cotran 1999).

### **3.3.9. Alteraciones en los genes que regulan la apoptosis**

Los genes que previenen o inducen la muerte celular programada son también importantes variables en la oncogénesis. Existen dos tipos de genes que regulan la apoptosis: los genes antiapoptóticos (*bcl-2* y *bcl-xL*) y los genes proapoptóticos (*bax*, *bad* y *bcl-xS*). Los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos actúan como un reóstato regulando la muerte celular programada, ya que el equilibrio en la relación entre los niveles de antagonistas y agonistas determina la respuesta de la célula a un estímulo apoptótico (Chao 1998).

No están enteramente claros los mecanismos que precipitan la apoptosis. Esta parece ser el punto final de una cascada de sucesos moleculares que se inician por múltiples estímulos y finalizan con la activación de unas enzimas proteolíticas denominadas caspasas, que en último término son las responsables de la desintegración celular. La liberación del citocromo C de las mitocondrias al citoplasma parece ser el paso crítico en la cadena de eventos que tienen como consecuencia la apoptosis. Los miembros proapoptótico, como el *bax*, forman un canal en la membrana mitocondrial que permite la salida de la citocromo

C, y ésta a su vez la activación de las caspasas y el inicio de la apoptosis. El *bcl-2* y sus agonistas bloquean el canal impidiendo la salida de la citocromo C de la mitocondria y evitando así la activación de las caspasas y la muerte celular (Kroemer 1997).

Una sobreexpresión de la proteína *bcl-2* protegería a las células tumorales de la apoptosis, permitiéndoles sobrevivir durante largos períodos de tiempo. Consecuentemente, la neoplasia originada primariamente como una proliferación celular incontrolada y exagerada se ve favorecida por alteraciones en el gen del *bcl-2*, ya que las células tumorales se vuelven resistentes a la muerte celular programada, adquiriendo un fenotipo tumoral inmortalizado (Wyllie 1997).

El *p53* y el *c-myc* son dos genes íntimamente asociados al mecanismo de la apoptosis y al desarrollo de cáncer. La acción proapoptótica del gen supresor de tumores *p53* parece estar mediada a través de la sobreexpresión de la expresión del gen *bax*, mientras que el *c-myc* induce apoptosis al activar el crecimiento celular cuando la disponibilidad de los factores de crecimiento es mínima. Sin embargo, la apoptosis iniciada por el *c-myc* puede ser frenada si existe concomitantemente una sobreexpresión patológica del *bcl-2*.

Es evidente que alteraciones conjuntas del *c-myc* y del *bcl-2* pueden promover la oncogénesis por vías distintas. Por un lado, el *c-myc* dispara la proliferación y el *bcl-2* previene la muerte celular, independientemente de la limitación de los factores de crecimiento. Este es uno de los muchos ejemplos en los que dos o más genes cancerígenos cooperan para originar cáncer.

### **3.3.10. Los telómeros y el cáncer**

Después de un número fijo de divisiones, las células normales entran en un estado terminal estable de no división conocido como senescencia celular replicativa. Ésta parece ser secundaria a cambios en la estructura de los telómeros, unas estructuras especializadas constituidas por secuencias repetitivas de ADN y proteínas asociadas que se encuentran cubriendo los extremos de cada cromosoma, y que se sintetizan y se mantienen mediante una enzima denominada telomerasa.

En cada división celular se produce un acortamiento de los telómeros. Cuando el tramo telomérico es demasiado corto, estos pierden su función originando fusiones entre extremos de diferentes cromosomas provocando la muerte de la célula. Por ello, se cree que el acortamiento de los telómeros puede actuar como un reloj que cuenta las divisiones celulares o, dicho de otra forma, la pérdida de los telómeros es la responsable de la pérdida de la habilidad replicativa de la célula y, por lo tanto, el mecanismo principal de origen de las células senescentes.

En las células germinales capacitadas para replicarse extensivamente, el acortamiento de los telómeros se previene mediante las telomerasas. En condiciones fisiológicas esta enzima está inactivada, o al menos no totalmente activada en la mayoría de las células somáticas, lo que implica una pérdida progresiva de los telómeros y de su poder replicativo (Bodnar 1998).

Aunque teóricamente el acortamiento de los telómeros y la consiguiente senescencia celular constituirían un freno en la proliferación celular y, por lo tanto, se comportarían como mecanismos supresores de tumores, si una célula perteneciente a un grupo celular que entra en senescencia la evita debido a una mutación adquiere una ventaja competitiva sobre sus compañeras, incluso mucho mayor a la que adquiriría si estuviera dentro de una población no senescente. Por lo tanto, desde este punto de vista, la senescencia sería un mecanismo favorecedor del cáncer (Alberts 2002).

Por otro lado, y al contrario que la mayoría de las células normales, muchas células cancerígenas reactivan sus telomerasas previniendo el acortamiento de los telómeros, evitando así el desarrollo de la senescencia. Esta parece ser una de las razones por las cuales las células cancerígenas en cultivo se dividen sin límite constituyendo líneas celulares inmortalizadas. En la gran mayoría de tumores humanos se ha detectado la reactivación de las telomerasas como un evento tardío respecto a las principales alteraciones genéticas causantes del cáncer.

La reactivación de las telomerasas y las alteraciones en la apoptosis constituyen mecanismos de inmortalización y supervivencia de las células cancerígenas, por lo que su presencia aumenta, además de la masa tumoral, la probabilidad de desarrollar nuevas mutaciones que puedan permitir a las células tumorales continuar creciendo o incluso adquirir propiedades metastásicas.

### **3.3.11. El papel de los virus en el desarrollo de cáncer**

La misión de los virus es utilizar la maquinaria de replicación de la célula huésped para replicar su propio genoma. Para fabricar partículas víricas infecciosas a partir de una célula huésped, el virus debe utilizar su propio equipamiento (v-oncogenes) para comandar la maquinaria celular y replicar rápidamente su propio genoma, proceso que acaba destruyendo a célula en la mayoría de los casos (infección lítica). Otra opción es propagar su propio genoma paralelamente al ADN de la célula huésped durante las divisiones celulares ordinarias (infección latente), hasta que se produzcan las condiciones necesarias que permitan su replicación lítica.

Hay que destacar que mucha de nuestra comprensión del control del crecimiento en las células eucariotas proviene del estudio de su disregulación por las proteínas virales. Estas proteínas virales son potencialmente oncogénicas en los huéspedes infectados, una característica común que denota un grado notable de convergencia considerando que las producen virus que pueden no estar relacionados entre sí. Indudablemente la inducción de tumores por estos virus debe considerarse un accidente biológico y plantea la cuestión de porqué los diversos virus han desarrollado y/o conservado estos genes. La necesidad de restablecer una proliferación competente de las células infectadas del huésped podría ser una explicación. Gracias al estudio de los tumores producidos por virus se describieron los oncogenes y protooncogenes víricos y, posteriormente, los oncogenes y protooncogenes celulares, así como los virus promueven a los oncogenes virales y/o alteran la expresión de genes de la célula huésped (ver apartado 3.3.1.).

La capacidad de reemplazar el control celular normal forzando a las células a entrar y completar el ciclo celular es una característica común y esencial de los virus DNA tumorales, ya que así aseguran el ambiente celular apropiado para la réplica y propagación viral (Alberts 2002). El único inconveniente para alcanzar este objetivo es transpasar el punto de control G1/S y entrar en la fase S, y para ello las actividades dependientes de la ciclina D y E deben ser estimuladas o sus acciones simuladas. Consecuentemente, los virus DNA tumorales, entre ellos los adenovirus, el virus simian 40 (VS40), los virus del papiloma humano y los  $\gamma$ -herpesvirus como el VHH-8 (Holzerlandt 2002; Means 2002), han desarrollado numerosos mecanismos a este nivel a través de los cuales logran alterar el control del crecimiento celular normal.

El antígeno T del virus simian 40 (SV40) y la oncoproteína E1A del adenovirus 5 superan la detención G1 porque poseen la capacidad de desplazar a los factores celulares que participan en la inhibición de la pRb. De esta forma, impiden que la pRb realice su función en la prevención de la entrada en la fase S sin la necesidad de la actividad de los complejos ciclina D-CDK. Adicionalmente, la oncoproteína E1A puede unirse también a la CKI p27<sup>KIP1</sup> inactivándola, permitiendo así la liberación de los complejos que contienen CDK2 y, por lo tanto, la progresión del ciclo celular (Mann 1999).

Los productos virales E6 y E7 de los papilomavirus pueden interactuar con múltiples proteínas de la célula huésped, pero en particular suelen secuestrar a los productos de dos genes supresores de tumores críticos en la progresión del ciclo celular: la pRb y la p53. La proteína viral E7, al unirse a la pRb la inactiva, evitando su enlace con otras moléculas; y la proteína viral E6, al unirse a la p53, induce su destrucción. Esto permite que la célula

infectada replique su ADN y se divida de forma incontrolada aumentando simultáneamente la probabilidad de acumular mutaciones. Por lo tanto, los virus del papiloma humano son un claro ejemplo de virus ADN productores de oncogenes virales (Slebos 1994; Ishiji 2000; Wang 2001). Por otro lado, las células infectadas con el VPH-16 muestran activación de la telomerasa (Yasumoto 1995) lo que permite su inmortalización.

Recientemente se ha descrito un mecanismo novel por el cual las proteínas virales de los  $\gamma$ -herpesvirus y, en particular del VHH-8, pueden derribar el control normal del crecimiento. En el caso del VHH-8, se ha observado que esto se consigue con la codificación de una oncoproteína vírica denominada v-ciclina o ciclina k, capacitada para formar complejos con las CDK4/6 celulares (ver apartado 3.4.14.1.). Estos complejos víricos poseen dos características básicas que los diferencian de los complejos ciclina D-CDK celulares: tienen un rango de especificidad de sustrato más amplio, incluyendo a la  $p27^{KIP1}$ ; y son resistentes a la inhibición de las CKI ( $p27^{KIP1}$ ,  $p21^{CIP1}$  y  $p16^{INK4a}$ ) evitando las detenciones en G1 impuestas por los niveles elevados de estos inhibidores (Ellis 1999; Mann 1999; Laman 2001). Por lo tanto, el complejo ciclina k-CDK6 del VHSK además de ser resistente a la acción inhibitoria de la  $p27^{KIP1}$ , es capaz de estimular la degradación de la  $p27^{KIP1}$  mediante su fosforilación. Esta acción, junto a la fosforilación de la pRb, permite la transición del punto de control G1/S, la entrada en la fase S y la progresión del ciclo celular en la célula infectada por el VHH-8.

La inactivación de la  $p27^{KIP1}$  se ha descrito recientemente como un hallazgo común en los virus oncogénicos, sobre todo en los  $\gamma$ -herpesvirus. Aunque la inactivación de la función de la  $p27^{KIP1}$  es característica del VHH-8, se ha demostrado que las oncoproteínas

codificadas por los virus ADN tumorales clásicos como el adenovirus 5 (E1A) y el papilomavirus (E7), también deterioran el funcionamiento molecular de la p27<sup>KIP1</sup> (Mal 1996; Zerfass-Thome 1996).

### **3.4. LAS CITOCINAS, LOS FACTORES DE CRECIMIENTO Y OTRAS MOLÉCULAS IMPLICADAS EN EL DESARROLLO DEL SK**

Aunque no está enteramente claro lo que dispara el origen, la proliferación incontrolada y el mantenimiento de las células del SK, un gran número de estudios previos han mostrado que las citocinas inflamatorias y los factores de crecimiento producidos por las células mononucleares del infiltrado inflamatorio acompañante y posteriormente por las células tumorales tienen un papel crítico en el desarrollo de las lesiones del SK (Moore 1996). Estas moléculas permiten que las células endoteliales precursoras adquieran las características típicas de las células tumorales del SK, además de promover su crecimiento y proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, algunos estudios han demostrado que el desarrollo de lesiones de SK en pacientes con SIDA es más probable tras infecciones oportunistas, es decir, cuando los niveles de citocinas están más incrementados, confirmando la importancia de estos factores en el desarrollo del SK.

La síntesis y secreción celular de factores de crecimiento y citocinas inflamatorias está estimulada por la infección por el VHH-8/HVSK y por el VIH-1 en los casos asociados a SIDA. Se postula que quizás la infección vírica dote a las células precursoras tumorales y a la celularidad inflamatoria del huésped asociada a las lesiones, de la capacidad para secretar estos factores actuando como punto de origen de estos mediadores.

La creación de líneas celulares a partir de cultivos de células fusiformes procedentes de lesiones de SK de derrames pleurales y de células monoclonales de la sangre periférica de individuos VIH-1-positivos y VIH-1-negativos con SK, ha permitido reconocer algunos de

estos factores humorales necesarios para el desarrollo del SK. Entre las principales citocinas inflamatorias implicadas en el SK identificamos al grupo de las interleucinas (IL-6, IL-8, IL-1), a las quemocinas (MIP-1 $\alpha$ ), al INF- $\gamma$  y al TNF- $\alpha$ . Entre los factores de crecimiento con actividad angiogénica destacan el HGF, el VEGF, el  $\beta$ -FGF o bFGF y el PDGF- $\beta$ . No hay que olvidar que el desarrollo de muchos tumores está asociado con condiciones inflamatorias en las que participan estas moléculas.

El mecanismo para el reclutamiento del infiltrado inflamatorio en las lesiones está mantenido por las propias células del SK, que expresan una serie de moléculas necesarias para la atracción y activación de los leucocitos como las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1), el FAP, la proteína quimiotáctica de los monocitos-1 y la IL-8 (Sciacca 1994; Galea 1998).

Asimismo, y como hemos comentado previamente, estudios recientes han revelado que el VHH-8/VHSK posee genes homólogos a los humanos que tienen la capacidad de codificar y sintetizar proteínas funcionales que participan en la inflamación y en la angiogénesis, y también poseen la habilidad de inducir proliferación y transformación celular (Moore 2001; Paulose-Murphy 2001). Estas incluyen citocinas y quemocinas (la v-IL-6 y la v-MIP-1 $\alpha$ ), receptores (el v-receptor vinculado a la proteína G), moléculas que participan en el ciclo celular (la v-ciclina) y en la apoptosis (el v-bcl-2). Adicionalmente, todas estas moléculas incrementan los efectos de sus homólogas fisiológicas secretadas por las células del huésped. Por otro lado, el VIH-1 a partir de su genoma es también capaz de sintetizar una proteína denominada transactivadora o proteína tat con una importante función en el desarrollo del SK asociado a SIDA como veremos posteriormente.

Por lo tanto, el VHH-8 ejerce sus efectos directamente codificando proteínas proinflamatorias y angiogénicas promotoras del crecimiento y antiapoptóticas; y también indirectamente, a través de la inducción de la síntesis de citocinas y proteínas angiogénicas por parte de las células inflamatorias e infectadas. Además, por su parte el VIH-1, induce también la síntesis de productos víricos, como la proteína tat que amplifica todas las acciones de estos mediadores. Es decir, nos hallamos ante un virus con la capacidad de sintetizar moléculas que dirigen los principales mecanismos de control de la inflamación, proliferación y muerte celulares, creando así un microambiente humoral favorecedor para la inducción del SK.

#### **3.4.1. La interleucina-6 viral (v-IL-6)**

La IL-6 es una de las citocinas involucradas en la inmunidad natural y se considera, junto con la IL-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), uno de los elementos responsables de las reacciones sistémicas de fase aguda asociadas a infección o daño orgánico, y también uno de los pirógenos endógenos primarios más potentes. La IL-6 y TNF- $\alpha$  son también importantes componentes iniciales de las vías de señalización involucradas en la mitogénesis y en la regeneración tisular.

La relevante función de la IL-6 fue demostrada en ratones transgénicos que no poseían esta citocina. En estos animales, la regeneración hepatocitaria tras una hepatectomía parcial era defectiva, produciéndose una necrosis hepática masiva que se prevenía mediante la administración previa de IL-6.

La IL-6 codificada viralmente por el VHH-8 (v-IL-6) es similar estructural y funcionalmente a la humana (Nicholas 1997) y parece actuar como estimuladora mitogénica de las células fusiformes del SK. En las lesiones iniciales del SK, la v-IL-6 se ha detectado confinada en las células endoteliales CD34+ y en células hematopoyéticas CD45+. Probablemente esto indica que el genoma vírico de estas células infectadas puede codificar y sintetizar v-IL-6, que una vez secretada es capaz de ejercer su efecto estimulante y promotor del crecimiento de forma autocrina y paracrina en las células endoteliales precursoras y en las células del SK adyacentes.

#### **3.4.2. La v-proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$ (v-MIP-1 $\alpha$ )**

La proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) es una quemocina del tipo C-C o  $\beta$ -quemocina cuya acción principal es el reclutamiento quimiotáctico y la activación de leucocitos, especialmente monocitos y basófilos.

Parece ser que en el desarrollo de las lesiones del SK el incremento de los niveles de expresión del v-MIP-1 $\alpha$  (Nicholas 1997) produce un aumento en la atracción de las células inflamatorias infectadas productoras de citocinas, sobre todo potenciando la secreción y, de este modo, los efectos de la v-IL-6.

#### **3.4.3. El v-receptor vinculado a la proteína G (v-receptor G)**

De las tres clases genéricas de receptores de superficie celular existentes, los vinculados a la proteína G (CXCR o CCR) son los más utilizados por las quemocinas y las citocinas

para mediar sus actividades, aunque también puede actuar uniéndose a hormonas (glucagon o epinefrina). El receptor vinculado a la proteína G es una molécula que contiene siete rizos transmembrana, por lo que también se le ha denominado “receptor serpentina”. La activación de la proteína G por su ligando quemocina/citocina activa a su vez vías de transducción de señales y segundos mensajeros intracelulares, únicos o compartidos con otras familias de receptores, que generan en último término señales mitogénicas en el núcleo.

Mediante la clonación del fragmento abierto del genoma 74 del VHH-8/HVSK (ORF 74) se ha identificado que codifica al receptor vinculado a la proteína G (v-receptor G), homólogo al receptor de la proteína G codificado por el herpesvirus samiri y por el ADN humano. La presencia de un mayor número de receptores G disponibles (v-receptor G) facilita y amplifica las acciones de las citocinas y quemocinas sintetizadas por el genoma viral y por las propias células inflamatorias del huésped (Bais 1998).

El receptor vinculado a la proteína G codificado por el propio virus (v-receptor G) permite la estimulación de la proliferación celular mediante su unión a varias moléculas y, por lo tanto, debe considerarse como un firme candidato a oncogén viral.

Actualmente se ha descrito que este v-receptor vinculado a la proteína G puede ejercer mecanismos oncógenos indirectos. Parece ser que simplemente la expresión de este receptor viral en líneas celulares constituidas por linfocitos T, monocitos y células epiteliales transfectadas provoca una activación de los factores de transcripción NF-kappaB y AP-1, lo que a su vez induce la síntesis de moléculas proinflamatorias

dependientes de estos factores: IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína quemoattractiva de los monocitos-1 (MCP-1) y IL-8, y bFGF respectivamente.

Aparte de su acción directa favoreciendo la acción de las citocinas y quemocinas, se ha demostrado que algunos subtipos de receptores vinculados a la proteína G, como el CXCR-4 y el CCR-5, pueden actuar como correceptores virales para la glicoproteína de recubrimiento viral del VIH-1 permitiendo la unión y la entrada del virus en los linfocitos CD4 (Doranz 1997; Bieniasz 1998). Consecuentemente, la síntesis del v-receptor G a partir del genoma del VHH-8 podría facilitar hipotéticamente la coinfección por el VIH-1.

#### **3.4.4. La interleucina-8 (IL-8)**

La IL-8 es una  $\alpha$ -quemocina prototipo del grupo C-X-C secretada por macrófagos y células endoteliales, que actúa principalmente produciendo la activación y quimotaxis de los neutrófilos y, en menor grado, de los basófilos. La IL-8 posee también actividad mitógena en las células endoteliales y es capaz de promover angiogénesis.

Como la IL-8 humana se une con gran afinidad al receptor vinculado a la proteína G, celular o vírico, en los casos asociados a infección por VHH-8 las acciones quimiotácticas, mitógenas y angiogénicas de la IL-8 se encuentran amplificadas (Rosenkilde 1999). De hecho, los niveles séricos de la IL-8 se encuentran aumentados en los casos de SK en comparación con los controles. Igualmente, la reducción de la cantidad de IL-8 y de su ARNm en cultivos inhibe el crecimiento de las células del SK de forma dosis-dependiente (Masood 2001). Asimismo, la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , dos moléculas abundantes en el medio

humoral del SK y de la infección por el VHH-8, estimulan a la IL-8 potenciando aún más sus acciones.

#### **3.4.5. La interleucina-1 (IL-1)**

Como hemos visto, las líneas celulares derivadas de lesiones del SK pueden ser también altamente dependientes de la IL-1, una citocina proinflamatoria y multifuncional liberada tanto por las células infectadas como por las células inflamatorias. La fuerte expresión de los receptores de estas moléculas en las células del SK subraya la significación *in vivo* de estos hallazgos.

La IL-1 es una de las citocinas con mayor acción inflamatoria y mitógena ejerciendo sus efectos sobre todo en el endotelio, y secundariamente en los leucocitos y en los fibroblastos. La activación endotelial mediante la IL-1 se regula a nivel de la transcripción genética, induciendo la síntesis de moléculas de adhesión endoteliales y mediadores químicos que aumentan la adhesión leucocitaria, como por ejemplo, otras citocinas (IL-6), quemocinas (IL-8), factores de crecimiento (PDGF- $\beta$ ), eicosanoides como la prostaciclina (PGI), óxido nítrico (NO), enzimas asociadas al remodelamiento de la matriz extracelular y sustancias procoagulantes. La síntesis de IL-1 también induce la secreción del factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), aumentando indirectamente la concentración de leucocitos en el medio.

Asimismo, en estudios *in vivo* sobre los procesos de reconstrucción del parénquima pulmonar por daño inflamatorio, se ha observado que tras la adición de la IL-1 se produce

un incremento dosis-dependiente de la expresión de HGF y de su receptor c-Met en las células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana. Estos resultados sugieren que el HGF interviene en el proceso de reconstrucción del tejido pulmonar mediado por la IL-1 (Morisako 2001).

Estudios actuales han descrito que IL-1 es capaz de promover el crecimiento tumoral *in vivo* mediante la inducción de factores angiogénicos. Para ello, se realizó una transducción del vector retroviral que codifica el gen humano de la IL-1 a células del carcinoma de pulmón en ratones (LLC/IL-1), inoculando estas células transformantes posteriormente en otros ratones. Los tumores derivados de las células LLC/IL-1 crecieron más rápidamente y mostraron mayor vasculatura. Se observó que la IL-1 secretada por estas células era capaz de inducir a partir de las células propiamente tumorales y estromales la producción de varios factores angiogénicos promotores del crecimiento vascular, como el VEGF, la proteína inflamatoria derivada de los macrófagos tipo 2 (CXCL2) y el HGF, cuya concentración incluso se cuadruplicaba (Saijo 2002).

#### **3.4.6. El factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

El TNF- $\alpha$  es una citocina encargada de la activación de células inflamatorias, sobre todo macrófagos. Los propios macrófagos activados lo producen, y su secreción puede estar estimulada por endotoxinas, inmunocomplejos, toxinas, daño físico y una gran variedad de procesos inflamatorios.

Sus acciones más importantes en los procesos inflamatorios son a nivel del endotelio, en los leucocitos, en los fibroblastos y en la inducción de las reacciones sistémicas de fase aguda.

El TNF- $\alpha$  es una citocina que ejerce un espectro de importantes efectos sobre las células endoteliales, la mayoría regulados a nivel de transcripción genética, y referidos en general como activación endotelial. El TNF- $\alpha$  sobrerregula la expresión de moléculas que promueven la adhesión de células inflamatorias circulantes al endotelio (E-selectina); induce la síntesis y secreción de mediadores químicos (otras citocinas, quemocinas, factores de crecimiento, eicosanoides y óxido nítrico); produce enzimas relacionadas con el remodelamiento de la matriz extracelular; e incrementa la trombogenicidad de superficie del endotelio. Todos estos cambios en el endotelio facilitan la extravasación de linfocitos y monocitos en el lugar donde se produce la reacción inflamatoria.

El TNF- $\alpha$  causa también agregación y activación de los neutrófilos, aumentando las respuestas de estas células a otros mediadores y la liberación de enzimas proteolíticas de las células mesenquimales, contribuyendo así al daño tisular.

Asimismo, el TNF- $\alpha$  es uno de los factores involucrados en la producción de las respuestas sistémicas de fase aguda asociadas a infección o daño, actuando en particular sobre los efectos hemodinámicas. De hecho, es un mediador extremadamente importante en el CID por shock séptico.

Adicionalmente a los efectos previamente mencionados, el TNF- $\alpha$  realiza otras muchas funciones: controla de la masa corporal, ya que sus concentraciones disminuyen en pacientes obesos y se encuentran incrementados en pacientes con anorexia y caquexia; junto con la IL-6, es un importante componente de las vías iniciales involucradas en la regeneración hepática; y por último, el TNF- $\alpha$ , mediante su unión al receptor TNFR-1, puede activar la apoptosis celular (Cotran 1999).

A pesar de su efecto citotóxico en algunas líneas celulares tumorales, el TNF- $\alpha$  actúa como un estimulador del crecimiento en el SK. De todas formas, las vías utilizadas por el TNF- $\alpha$  para la producción de respuestas mitogénicas no son aún bien conocidas. En algunos estudios, las cinasas reguladoras de señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2) de las células del SK están significativamente activadas por el TNF- $\alpha$  a través de una fosforilación tirosina/treonina (Murakami-Mori 1999). Parece ser que el crecimiento de las células del SK inducido por el TNF- $\alpha$  y la activación de las ERK1/2 está mediada únicamente por el receptor del TNF- $\alpha$  tipo 1 (TNFR-1) y no por el TNFR-2. Consecuentemente la vía TNFR-1-ERK1/2 juega un importante papel en la transmisión de las señales mitogénicas del TNF- $\alpha$  en las células del SK. Anticuerpos dirigidos contra elementos de esta vía confirman estos hallazgos, ya que se bloquea la proliferación celular inducida por el TNF- $\alpha$ .

#### **3.4.7. El interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )**

El IFN- $\gamma$  es una linfocina producida por los linfocitos T y activadas por las células NK. Tiene múltiples efectos, aunque su función principal es la de activar a los macrófagos y

monocitos, además de ser un importante mediador de la hipersensibilidad de tipo retardada y participar en la respuesta antiviral.

El IFN- $\gamma$  es un potente activador de los macrófagos, de forma que éstos modifican sus acciones: aumentan su habilidad para fagocitar y matar microorganismos y células tumorales; aumentan la expresión de moléculas de clase II en su superficie, facilitando así la presentación de antígenos; e incrementan la secreción de varios factores de crecimiento polipeptídicos como el PDGF- $\beta$  y el TGF- $\beta$ , que estimulan la proliferación fibroblástica y aumentan la síntesis de colágeno.

Así, estos macrófagos activados secretan citocinas (p.e., IL-12) que producen la activación de los linfocitos T helpers CD4+ y CD8+, y estos a su vez incrementan la secreción de más mediadores inflamatorios encargados de mantener el estado de respuesta inflamatoria, entre ellos el propio IFN- $\gamma$ .

El IFN- $\gamma$  tiene un papel crucial en el desarrollo del SK, ya que permite la activación de las células endoteliales normales o precursoras, induciendo la adquisición de las características fenotípicas y funcionales que caracterizan a las células fusiformes con actividad angiogénica típicas del SK (Fiorelli 1995). Por otro lado, las células activadas por el IFN- $\gamma$  son capaces de incrementar la producción del bFGF y del VEGF, dos factores angiogénicos altamente expresados en las células fusiformes del SK, cuya función es mediar el crecimiento fusiforme, la migración celular, la angiogénesis y la permeabilidad vascular.

El IFN- $\gamma$  también parece actuar como mediador del reclutamiento de las células a la piel, lo que permite concentrar a las células infectadas por el VHH-8 para que ejerzan sus efectos. Esto podría explicar como en algunos estudios la expresión del IFN- $\gamma$  precede a la detección de la infección por el VHH-8. Asimismo, el IFN- $\gamma$  ha mostrado cierto efecto proliferativo a bajas concentraciones *in vitro*.

Otras citocinas inflamatorias incluyendo al TNF- $\alpha$ , la IL-1, la IL-6 y la oncostatina M, pueden incrementar la función del IFN- $\gamma$ . Por lo tanto, aunque el IFN- $\gamma$  por sí solo es suficiente, la presencia de otros mediadores amplifica sus efectos en el desarrollo del SK.

#### **3.4.8. El factor de crecimiento hepatocitario (HGF)**

El factor de crecimiento hepatocitario o HGF se identificó inicialmente en ratas que tras una hepatectomía parcial mostraban un incremento rápido de sus niveles plasmáticos. El HGF actuaba en estos hígados como un potente mitógeno, por lo que fue considerado un factor clave en la proliferación, el crecimiento y función de los hepatocitos. Posteriormente, se ha identificado que aparte de las células no-parenquimatosas hepáticas, las células mesenquimales de otros órganos también pueden producir HGF, por lo que también se le denominó factor ubicuo (SF).

Estudios ulteriores han definido al HGF como una citocina pleiotrópica por las múltiples funciones en las que se le ha implicado, siendo la angiogénesis una de las más relevantes (Rosen 1997). El HGF es capaz de inducir *in vivo* una potente respuesta angiogénica dosis dependiente, aumentada por la heparina y mediada, al menos en parte, por el factor

activador de plaquetas (PAF) sintetizado por los macrófagos (Camussi 1997) y también por la IL-1 (Maier 1996). De hecho, el HGF es el mayor mediador de la angiogénesis inducido por la heparina, una de las moléculas con mayor efecto angiogénico *in vivo* (Rosen 1993) e *in vitro*. La adición de heparina en suero produce un incremento significativo del HGF en plasma, y en menor grado del FGF- $\beta$  y del VEGF, otros dos factores de crecimiento angiogénicos relacionados con la heparina. Consecuentemente, el HGF parece ser el mayor mediador de la angiogénesis inducida por heparina (Okada 1999).

Las acciones del HGF se realizan a través de un receptor tipo tirosin-cinasa transmembrana denominado c-Met. El receptor del HGF es el producto del protooncogén *c-Met* y se ha observado su expresión en las células endoteliales, en las células musculares lisas vasculares, en dendrocitos dérmicos y en células del SK, tanto *in vivo* como *in vitro*. En estudios recientes se ha observado que ciertas sustancias pueden inducir la producción de una forma soluble del c-Met en las células musculares lisas de la aorta y en las células endoteliales de la vena umbilical humanas. El c-Met soluble es capaz de unirse al HGF, aunque con menor afinidad en comparación con la forma transmembrana. Según parece esta forma del c-Met podría constituir un mecanismo de regulación de los efectos mitogénicos y angiogénicos del HGF (Wajih 2002).

Actualmente comienza a considerarse al HGF además como un factor de movilidad celular, ya que se ha identificado en la interfase entre las células cancerígenas y la matriz extracelular, actuando probablemente como un factor favorecedor de la invasividad, y por lo tanto su presencia o sobreexpresión podría interpretarse como una característica de progresión tumoral. Asimismo, en estudios *in vitro* sobre células no tumorales y tumorales

no-SK, el HGF parece bloquear la inducción de la apoptosis producida por agentes terapéuticos mediante la inducción de bcl-2 (Fan 1998). La protección contra la apoptosis mediada por el HGF en un contexto tumoral, sugiere que su presencia puede contribuir a la inmortalidad de las líneas celulares cancerígenas.

En las células endoteliales y fusiformes cultivadas a partir de lesiones de SK humanas, la potente actividad angiogénica del HGF se traduce *in vitro* a través de acciones directas como la estimulación de la migración y proliferación celular (Bussolino 1992), la producción de proteasas y la organización en estructuras tubulares similares a capilares. No obstante, el HGF puede también actuar indirectamente a través de la inducción de la secreción y expresión de otros factores y citocinas angiogénicas, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Van Belle 1998), al menos en estudios realizados en gliomas malignos (Rosen 1996) y otras neoplasias.

Los últimos estudios apoyan que el efecto antiapoptótico y de estimulación de la invasividad de las células del SK son también dos relevantes funciones del HGF que evidentemente favorecen la progresión del SK.

#### **3.4.9. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG)**

El VEGF, también denominado factor de permeabilidad vascular, pertenece a una amplia familia de factores de crecimiento angiogénicos constituida por los siguientes miembros: VEGF, VEGF-B, VEGF-C y el factor de crecimiento placentario (PIGF). Están producidos en pequeños niveles en una gran variedad de tejidos adultos, aunque únicamente se

producen a altos niveles en escasas localizaciones, como por ejemplo en los podocitos glomerulares y en los miocitos cardíacos.

En general, sus principales funciones son promover la angiogénesis, incrementar la permeabilidad vascular, estimular la migración y proliferación de las células endoteliales, sobreregular la expresión endotelial del activador del plasminógeno, del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI1), del factor tisular y de la collagenasa intersticial. No obstante, cada miembro de la familia VEGF tiene a parte funciones distintas. El VEGF promueve la angiogénesis en el cáncer, en los estados inflamatorios crónicos y en las cicatrices, mientras que el VEGF-C induce específicamente la proliferación de las células endoteliales de la vasculatura linfática (Dvorak 1995).

Ciertos hallazgos clinicopatológicos característicos del SK, como el edema perilesional, la neoangiogénesis y la extravasación de eritrocitos, han evocado interés en el VEGF, como otro posible factor relacionado con la patobiología del SK.

Estudios moleculares han revelado que diferentes citocinas que se han demostrado activas en el desarrollo del SK, como el PDGF, la IL-1 (Cornali 1996) y el HGF, regulan el nivel de producción y expresión del VEGF. El FGF- $\beta$ , otra citocina involucrada en el desarrollo del SK, no incrementa directamente la expresión del VEGF sino que actúa sinérgicamente con él induciendo lesiones pseudokaposiformes en modelos experimentales con ratones. Claramente, la angiogénesis y la celularidad de estas lesiones pseudokaposiformes se incrementaron al inyectarse los dos factores simultáneamente. Asimismo, se obtuvo una

reacción angiogénica comparable cuando se sometieron cultivos de células fusiformes de SK-SIDA a supernadantes con FGF-  $\beta$  y VEGF.

Las células fusiformes cultivadas a partir de lesiones del SK-SIDA estimuladas por estas citocinas pueden secretar VEGF bioactivo en cantidad suficiente como para activar la proliferación de las células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana y promover la angiogénesis de las células fusiformes. De hecho, al inocular en ratones células que contienen VEGF procedentes de cultivos de SK, se inducen lesiones angiogénicas semejantes a las del SK. Los análisis *in vivo* de lesiones humanas de SK revelan una concentración elevada de la proteína VEGF y de su ARNm en las células fusiformes. Por lo tanto, las células fusiformes del SK producen y sintetizan VEGF *in vivo* e *in vitro* (Masood 1997), además de expresar sus receptores específicos a nivel de la superficie de las células endoteliales (VEGF-R1 y el VEGF-R2), y pueden también unirse a receptores que median los anclajes con la matriz extracelular (integrinas- $\alpha_v \beta_5$ ).

En general, todos estos datos indican que el VEGF (junto con el PDGF, la IL-1, el FGF- $\beta$  y el HGF) es un mediador clave en la angiogénesis y permeabilidad vascular en las lesiones del SK *in vivo* e *in vitro*.

#### **3.4.10. El factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF o FGF- $\beta$ )**

La familia de factores de crecimiento FGF está compuesta por un componente ácido (aFGF o FGF-1) y uno básico (bFGF o FGF-2 o FGF- $\beta$ ), sintetizados por una gran variedad de células. Los FGF pueden liberarse a la matriz extracelular, que sirve como reservorio de

algunos de los factores de crecimiento que controlan la proliferación celular. Los FGF son reconocidos por una familia de receptores de superficie celular que poseen actividad tirosin-cinasa intrínseca, aunque también pueden unirse a receptores celulares de proteínas de la matriz extracelular denominadas integrinas, específicamente al subtipo  $\alpha v\text{-}\beta 3$ . Las integrinas son reguladoras del proceso angiogénico, ya que son las encargadas de controlar la motilidad y la migración de las células endoteliales, siendo críticas para la formación y el mantenimiento de los vasos sanguíneos neoformados.

Se atribuyen un gran número de funciones a los FGF, como la angiogénesis, ya que el bFGF en particular tiene la habilidad de inducir todos los pasos necesarios para la formación de nuevos vasos sanguíneos, tanto *in vitro* como *in vivo*; la cicatrización, participando en la migración de células endoteliales, fibroblastos y macrófagos al tejido dañado; en el desarrollo embrionario del tejido muscular esquelético y en la maduración pulmonar; y por último, en la hematopoyesis.

El FGF- $\beta$  está involucrado en la patogénesis de varias enfermedades caracterizadas principalmente por una neovascularización exagerada, como el SK (Cavallaro 1998). Tanto en la forma clásica del SK como en la asociada a SIDA, el bFGF está altamente expresado. Experimentalmente el FGF- $\beta$  media la formación de lesiones pseudokaposiformes en ratones “desnudos” tras la inoculación con células de SK o células endoteliales activadas (Samaniego 1997). Es decir, estas células inoculadas tienen la capacidad de sintetizar y liberar FGF- $\beta$  activo.

Asimismo, el FGF- $\beta$  produce un efecto mitogénico o de proliferación en las células SK humanas. De hecho, anticuerpos dirigidos contra el FGF- $\beta$  inhiben la proliferación de las células SK evitando la entrada en fase S del ciclo celular. No obstante, es indispensable la presencia de otros factores de crecimiento externos para inducir estos efectos del FGF- $\beta$  (Murakami-Mori 1998).

Se han investigado sus efectos en las líneas celulares TTB y se ha observado que el FGF- $\beta$  estimula la migración de las células TTB a través de tres mecanismos: provocando alteraciones en el citoesqueleto celular que promueven la adquisición de un fenotipo migratorio; relocalizando los uPAR; y estimulando la síntesis y secreción del HGF y de su receptor c-Met (Cavallaro 1998). Por otro lado, se ha confirmado que la proteína tat y el FGF- $\beta$  actúan sinérgicamente a través del mismo tipo de receptor (integrinas- $\alpha v$ - $\beta 3$ ) (Barillari 1999) ejerciendo efectos de migración, invasión y promoción del crecimiento en las células endoteliales y en las células del SK *in vivo* e *in vitro*. Esto justifica el motivo por el cual la expresión del FGF- $\beta$  está claramente incrementada *in vivo* en los pacientes con SIDA, ya que las células infectadas por el VIH-1 son también capaces de producir altos niveles de FGF- $\beta$ .

La producción y liberación del bFGF está inducida de forma sinérgica por el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y el IFN- $\gamma$ . Asimismo la quimocina atrayente de las células B-1 (BCA-1) o CXCL13, cuya función es atraer a los linfocitos B, inhibe los efectos del FGF- $\beta$  en las células endoteliales (Spinetti 2001).

### **3.4.11. El factor activador de las plaquetas (PAF)**

El PAF es un mediador fosfolípido secundario sintetizado por una gran variedad de tipos celulares, incluyendo plaquetas, basófilos, mastocitos, neutrófilos, monocitos/macrófagos y células endoteliales. Además de sus obvios efectos vasculares (agregación plaquetaria, incremento de la permeabilidad vascular y dilatación/constricción vascular según su concentración), adicionalmente posee importantes acciones proinflamatorias y activadoras de las células endoteliales vasculares (quemotaxis de neutrófilos y eosinófilos e incremento de la adhesión leucocitaria al endotelio). El PAF media sus efectos a través del receptor vinculado a la proteína G.

*In vitro* las células del SK producen y liberan PAF, y también expresan su receptor (Bussolino 1995). En estas células se ha observado, tras un leve incremento de la concentración de PAF, una estimulación en la quemotaxis y quemocinesis de las células SK, células endoteliales y células musculares lisas vasculares y, consecuentemente, de la neoangiogénesis, proceso esencial para el crecimiento y progresión del SK. La acción del PAF está amplificada por la expresión de otros factores angiogénicos y quemocinas: bFGF, PlGF, VEGF, HGF y la proteína inflamatoria de los macrófagos-2. De la misma forma, la IL-1, el TNF- $\alpha$  y la trombina incrementan la síntesis de PAF. Estos hallazgos indican que la PAF puede cooperar con otras moléculas angiogénicas y quemocinas en la inducción de las lesiones vasculares típicas del SK.

### **3.4.12. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)**

El PDGF se sintetiza en tres isoformas (AA, AB y BB) que ejercen sus efectos uniéndose a dos tipos de receptores de superficie, designados  $\alpha$  y  $\beta$ . El PDGF se almacena en las plaquetas y se libera tras la activación de éstas. Además de las plaquetas pueden sintetizarlo los macrófagos activados, las células endoteliales, las células musculares lisas vasculares y algunas células tumorales. El PDGF causa fundamentalmente migración y proliferación de los fibroblastos, células musculares lisas y monocitos. Asimismo posee propiedades neoangiogénicas, ya que toma parte en la maduración y remodelación de los vasos neoformados, fases finales de la angiogénesis (Heldin 1992).

Se ha demostrado que la proliferación y migración de las células fusiformes del SK *in vitro* está mediada por el PDGF- $\beta$ . Sin embargo, el PDGF- $\beta$  es también capaz de inducir la expresión de la proteína *c-myc* en las células del SK. Como ya se ha comentado, el *c-myc* es un protooncogén que actúa como un potente factor transcripcional uniéndose a secuencias específicas de ADN y activando la producción de las proteínas necesarias para su síntesis. El gen *c-myc* es uno de los factores de transcripción más comúnmente afectados en tumores humanos, ya que sus versiones oncogénicas se asocian a una transcripción mantenida de genes críticos del ciclo celular que posibilitan la transformación neoplásica. Varios estudios han mostrado que si existe un incremento del PDGF- $\beta$  en las células del SK, éste se traducirá en una activación del *c-myc* y provocará de esta forma la proliferación celular. De hecho, experimentalmente la supresión de la expresión del *c-myc* inhibe la proliferación y la migración de las células del SK tratadas

con PDGF- $\beta$  (Koster 1996). Consecuentemente, debe considerarse al PDGF- $\beta$  como otro factor oncogénico más en el desarrollo del SK.

#### **3.4.13. Resumen: citocinas y factores de crecimiento**

En resumen, las células del SK y las células B circulantes acompañantes infectadas por el VHSK son capaces de producir una amplia variedad de citocinas y, además de las anteriormente mencionadas, quizás otras aún desconocidas.

Entre la mayoría de las citocinas inflamatorias mencionadas existen efectos angioproliferativos sinérgicos. Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  estimula la expresión del receptor del TNF- $\alpha$ ; el TNF- $\alpha$  y la IL-1 incrementan, a su vez, los niveles del receptor del IFN- $\gamma$ ; y el TNF- $\alpha$  ejerce los mismos efectos que la IL-1 en las células endoteliales. Por otro lado, la IL-1 y el TNF- $\alpha$  cooperan con el IFN- $\gamma$  activando la expresión y liberación del bFGF, y el HGF a su vez estimula la secreción de VEGF.

Estos mediadores coordinados entre sí estimulan el crecimiento de las células fusiformes actuando de forma autocrina (las células del SK producen citocinas que, uniéndose a sus propios receptores, estimulan su crecimiento) y/o paracrina (las células del SK producen citocinas que estimulan el crecimiento de las células vecinas uniéndose a los receptores de dichas células).

Evidentemente, los leucocitos inflamatorios asociados al SK son los responsables de conservar y amplificar la funcionalidad de estos circuitos autocrinos/paracrinos,

encargados de mantener la proliferación del SK y contribuir al reclutamiento de las células vasculares del huésped.

#### **3.4.14. Otras moléculas implicadas en el desarrollo del SK**

En general, el VHH-8 codifica otros productos génicos, como la v-ciclina y el v-bcl-2, que actúan a otros niveles del crecimiento celular y que poseen características potencialmente oncogénicas en las células huésped infectadas (Moore 1998). Estas moléculas serían, junto con las citocinas y factores de crecimiento virales y endógenos, las principales responsables de la actividad oncogena de este virus, contribuyendo al desarrollo de las lesiones del SK.

##### **3.4.14.1. La v-ciclina**

Uno de los fragmentos abiertos de lectura del genoma del VHH-8/VHVK, el ORF 72, codifica una proteína homóloga a las ciclinas celulares (Li 1997). Esta ciclina, denominada v-ciclina o ciclina k, es similar estructuralmente a las ciclinas del tipo D, pero bioquímicamente se comporta de forma distinta en varios aspectos. Aunque también puede unirse a las mismas cinasas y es capaz de realizar las mismas funciones que su homóloga humana en la célula huésped, los complejos formados por la ciclina k y la CDK6 endógena pueden fosforilar una gama más amplia de sustratos, incluyendo a la pRb, a la histona H1, a la Cdc25, a algunos E2F, a la Myb, a la Id-2 y a la p27<sup>KIP1</sup>. Otra de las características de los complejos víricos ciclina k-CDK6 es su resistencia a las acciones inhibitoras de las CKI p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup> (Swanton 1997; Ellis 1999; Mann 1999).

Varios experimentos han demostrado que la ciclina codificada viralmente amplía el repertorio y la especificidad de sustrato de la subunidad CDK6 asociada. Esto permite la fosforilación de sustratos que en condiciones normales suelen realizarse casi exclusivamente por el complejo ciclina-CDK2, pero no por el complejo ciclina D-CDK, como por ejemplo la p27<sup>KIP1</sup>, el factor básico Id-2 y la Cdc25. Experimentos *in vivo* sobre estos tres sustratos han mostrado que su fosforilación por el complejo ciclina k-CDK6 es eficiente. Mientras que la fosforilación por el complejo ciclina D1-CDK6 celular no se produce o es muy débil. Estos resultados apoyan la idea de que la unión de la ciclina k amplía el rango de sustratos de la CDK6 para incluir, por lo menos, un subconjunto de los sustratos de la CDK2 (Mann 1999).

Este incremento en el número de sustratos permite que el complejo ciclina k-CDK6 del VHSK pueda fosforilar en la treonina 187 (Tre187) a la p27<sup>KIP1</sup>, señalizándola para su degradación a través de la vía ubiquitin-proteasoma. A su vez, la inactivación de la p27<sup>KIP1</sup> desviará el bloqueo del ciclo celular que induce sobre los complejos endógenos de ciclina-CDK2, permitiendo así el avance del ciclo celular. Diferentes estudios experimentales han identificado complejos de ciclina k-CDK6 unidos a la p27<sup>KIP1</sup> fosforilada en líneas celulares derivadas del linfoma primario de derrames y en el sarcoma de Kaposi, lo que demuestra que la degradación viralmente inducida de la p27<sup>KIP1</sup> ocurre en tumores asociados al VHH-8 (Ellis 1999).

De todas formas, y aunque parezca que el complejo ciclina k-CDK6 puede sustituir el papel de la ciclina E-CDK2 en la entrada en la fase S, la actividad inherente del complejo v-ciclina-CDK6 no es suficiente por sí sólo para finalizar el ciclo celular y necesita de la

actividad de la CDK2 humana para promover la finalización del ciclo celular (Ellis 1999). Por ello la actividad de los complejos celulares ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2 está mantenida en las células infectadas con el VHH-8. De hecho, para terminar un ciclo completo de división, las células infectadas requieren la activación del resto de cinasas dependientes de ciclina de la célula huésped para que promuevan la progresión en las diversas transiciones del ciclo celular. Por lo tanto, la cooperación entre la ciclina viral y las ciclinas endógenas, sobre todo la ciclina E, facilita la entrada en la fase S y la finalización del ciclo celular.

Actualmente, algunos autores opinan que el complejo formado por la ciclina k-CDK6 es capaz de realizar las funciones de los complejos que permiten la salida de la célula de G0 (ciclina D-CDK6), el paso a través de G1 (ciclina E-CDK2) y la entrada en la fase S (ciclina A-CDK2) (Laman 2001).

Actualmente se desconoce el mecanismo exacto por el cual se realiza esta extensión del repertorio de sustratos de la CDK6, del mismo modo que los parámetros que dictan la especificidad de sustrato de las CDK. Teóricamente se puede distinguir entre dos posibilidades: que las interacciones entre la ciclina y el sustrato dicten la especificidad de la CDK; o bien, que la ciclina imponga alteraciones en la estructura de la CDK que determinen la especificidad de ésta. Este segundo modelo parece ser el más probable, ya que puede explicar porqué la activación de las CDK6 por la ciclina k es más eficiente en comparación con la ciclina D1, y quizás también la capacidad del complejo ciclina k-CDK6 para resistir la inhibición por las CKI (Mann 1999).

La ciclina k no solamente tiene la capacidad de interactuar con la CDK6, sino que también interactúa, aunque débilmente, con la CDK4, CDK3 y la CDK2. En cada caso, los complejos resultantes pueden fosforilar *in vitro* a la pRb. Estas observaciones destacan diferencias importantes entre las ciclinas de tipo D, especialmente la ciclina D1, con la que la ciclina k muestra mayores semejanzas. La ciclina D1 solamente puede activar a la CDK4 y CDK6. Actualmente no está claro si la habilidad de la ciclina k para formar complejos activos con estos otros tipos de cinasas es fisiológicamente relevante, aunque todas ellas tienen papeles esenciales en la transición G1/S, ya que la sobreexpresión de mutantes negativos dominantes de cada una de ellas conlleva la detención de la célula en G1.

Sin embargo, de todas las posibles combinaciones binarias entre la ciclina k y las subunidades CDK, la unión de la ciclina k con la CDK6 es la más eficiente, ya que el complejo resultante parece ser el más activo y muestra la mayor resistencia a las CKI. Por tanto, es probable que la activación de la CDK6 sea la función más relevante de la ciclina k. Esta conclusión es verificada por la observación de que la CDK6 es una CDK abundante en linfocitos, una de las células diana de la infección por el VHH-8. Dado que los linfocitos se mantienen en su mayoría en las fases G0/G1 gracias a los altos niveles de p27<sup>KIP1</sup>, es probable que las características de la ciclina k sean fundamentales para producir alteraciones en el estado proliferativo de estas células, siendo probablemente el mecanismo de origen de los linfomas de cavidades corporales asociados al HVSK (Mann 1999).

A través de la ciclina k, el VHH-8 ejemplifica otra estrategia para evitar el arresto del ciclo celular mediado por la INK4 y las CIP/KIP, ya que los complejos formados por la unión de

la ciclina k vírica y la CDK6 endógena son resistentes a la inhibición de las CKI p16<sup>INK4a</sup> y p27<sup>KIP1</sup>. Por lo tanto, y teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, la expresión de la v-ciclina en células cultivadas permite superar el bloqueo del ciclo celular impuesto por estas CKI en la fase G1 y en la transición G1/S a través de la resistencia a su actividad inhibitoria y de la estimulación de su degradación, esta última sobre todo en el caso de la p27<sup>KIP1</sup> (Sherr 1999).

Las transcripciones del gen viral ORF 72 se encuentran comúnmente en células de linfoma con infección latente, incrementando significativamente su concentración cuando se induce la infección lítica en estas células (Zhong 1996; Sarid 1998). Como confirman varias líneas de investigación, la pRb y las CKI están implicadas en el establecimiento de la réplica incompetente que precede a la diferenciación celular y al proceso de senectud de la célula. Por lo tanto, la expresión de la v-ciclina durante la latencia, inactivando y fosforilando a la p27<sup>KIP1</sup> y a la pRb respectivamente, podría ser un medio de prevenir la replicación incompetente que, de establecerse, haría imposible la reactivación de la réplica del genoma y la producción de la progenie viral en este tipo de células.

Aunque no existe evidencia directa de la implicación de la v-ciclina en la actividad tumorigénica atribuida al VHH-8, las características bioquímicas de la v-ciclina indican que puede accionar acontecimientos asociados a la tumorigénesis. En consecuencia, la ciclina k debe considerarse un oncogén viral.

En resumen, la combinación de la resistencia a la inhibición de las CKI y de la modulación de la especificidad de sustrato de la CDK6, ambas secundarias a la presencia de la ciclina

k, es probablemente fundamental en la disregulación del control normal del crecimiento celular inducido por el VHH-8 y la causa principal de los procesos patológicos asociados a este virus.

#### **3.4.14.2. El v-bcl-2**

Las células tumorales pueden evadir el control normal de la supervivencia celular mediante la sobreexpresión de protooncogenes que actúen como antagonistas de la apoptosis.

Existen dos tipos de genes que regulan la apoptosis: los genes antiapoptóticos (*bcl-2*, *bcl-xL* y *Mcl-1*) y los genes proapoptóticos (*bax*, *bad* y *bcl-xS*), que actúan como un reóstato regulando la muerte celular programada. Aunque el mecanismo exacto de la apoptosis no está del todo claro, la liberación de la citocromo C de la mitocondria al citoplasma y la consiguiente activación de una cadena citoplasmática de caspasas parece ser el mecanismo básico. Mientras que el *bax*, un miembro proapoptótico, forma un canal en la membrana mitocondrial que permite la salida de la citocromo C y el inicio de la apoptosis, el *bcl-2* y sus agonistas centran su acción antiapoptótica bloqueando el canal, evitando la salida de la citocromo C de la mitocondria, e impidiendo la activación de las caspasas (Alberts 2002).

Teóricamente una neoplasia que muestre una sobreexpresión del *bcl-2* alarga la vida media de sus células impidiendo su apoptosis. De esta forma, la masa tumoral no sólo está constituida por las células proliferantes, sino también por las células tumorales que no mueren. Estudios previos han mostrado que el patrón de expresión del *bcl-2* y de sus

homólogos *bcl-xL* y *Mcl-1* puede variar en algunas neoplasias de acuerdo con la progresión tumoral.

El reciente hallazgo de que el VHH-8/VHVK pueda codificar un homólogo funcional al gen del *bcl-2* (*v-bcl-2*) a partir del fragmento abierto de lectura ORF 16 evidencia que el genoma de este virus puede ejercer mecanismos antiapoptóticos en el SK, contribuyendo así a la progresión tumoral de la enfermedad (Cheng 1997).

La sobreexpresión *in vivo* e *in vitro* del *bcl-2* en las células fusiformes del SK prolonga la viabilidad de estas células (Simonart 1998). El efecto resultante directo es el mantenimiento del crecimiento y la progresión tumoral del SK, sobre todo si simultáneamente se acompaña del estímulo inflamatorio y angiogénico de las citocinas, los factores de crecimiento y de la proteína *tat*, esta última en los casos asociados a SIDA.

En experimentos realizados sobre algunos de nuestros casos (Fernández-Figueras 2000) se observó una sobreexpresión del *bcl-2*, tanto en el SK-C como en el SK-SIDA, correlacionada con la progresión tumoral, de forma que la expresión en el estadio de placa era menor que en el estadio tumoral. La variación de expresión de esta molécula dependiendo de los estadios de la enfermedad apoyaría la hipótesis de que en los estadios iniciales el SK es una proliferación reactiva, mientras que en los estadios tumorales la naturaleza del SK sería la de una verdadera neoplasia. Respecto al tipo clínico-epidemiológico del SK, se observó que aunque existía en ambos una sobreexpresión de moléculas antiapoptóticas, en el SK-C predominaba el *bcl-2*, mientras que en el SK-SIDA

predominaba el bcl-xL y el Mcl-1. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la proteína tat del VIH-1.

Asimismo, alteraciones en factores que regulen la transcripción de los miembros de las moléculas que participan en la apoptosis, influenciarán directamente el proceso de muerte celular. El *p53* y el *c-myc*, dos genes claramente asociados al desarrollo de cáncer, poseen también funciones reguladoras de la apoptosis. Experimentos *in vitro* en células del SK indican que en algunos casos el *c-myc* está activado, estimulando la proliferación celular, y simultáneamente la proteína bcl-2 se encuentra sobreexpresada (Kaaya 2000) por la acción del HGF y, sobre todo, por la síntesis de v-bcl-2 a partir del genoma del VHH-8.

Algunos de los factores de crecimiento angiogénicos involucrados en la patogénesis del SK pueden inducir la expresión de bcl-2. El bFGF, el VEGF y el HGF parecen estimular la supervivencia de las células endoteliales cultivadas de la microvasculatura dérmica humana estimulando la producción de bcl-2. Los altos niveles de estos factores presentes en el SK aseguran una sobreexpresión del bcl-2 mantenida.

La disregulación de las vías apoptóticas controladas por el bcl-2 puede ser un factor importante en la patogénesis del SK y podría ser uno de los primeros escalones en la transformación de un proceso inicialmente hiperplásico en neoplasia.

### 3.5. PRODUCTOS DEL VIH-1

Aunque múltiples evidencias implican al VHH-8 como el agente etiológico del SK, la infección por el VHH-8 es necesaria, pero no suficiente para el desarrollo del SK sin la implicación de otros cofactores. El VIH-1 se considera como uno de los cofactores más importantes (Huang 2001), sin embargo, tampoco es absolutamente necesario para el desarrollo del SK. La ausencia de secuencias del VIH-1 en células tumorales del SK y el desarrollo de la enfermedad en pacientes VIH-1 negativos, sugiere que el VIH-1 juega un papel indirecto en la patogénesis del SK (Gallo 1998).

Se ha propuesto que la función del VIH-1 en el desarrollo del SK se relaciona con tres eventos: la inducción de la producción de citocinas por las células infectadas y no infectadas del huésped, la síntesis de la proteína tat y la estimulación de la replicación del VHH-8.

#### 3.5.1. Inducción de la producción de citocinas por las células del huésped y síntesis de la proteína tat

Las células del SK-SIDA muestran, al igual que las infectadas por el VHH-8, la capacidad de inducir citocinas y factores promotores del crecimiento (Brockmeyer 1999) así como de estimular la expresión de moléculas de adhesión (Kelly 1998). El VIH-1 contiene varios genes reguladores que coordinan su expresión y su replicación, entre ellos el gen *tat* que codifica a la proteína tat, encargada de transactivar la expresión génica viral. Parece ser que la proteína transactivadora o proteína tat extracelular, liberada por los linfocitos T

durante la infección aguda por el VIH-1, es capaz de estimular el crecimiento (Ensoli 1990) y la angiogénesis en las células endoteliales y fusiformes del SK (Albini 1995) y, por lo tanto, puede tener un papel decisivo en la patogénesis del SK-SIDA.

Los efectos angiogénicos de la proteína tat se observaron por primera vez en ratones transgénicos VIH-1-*tat*, en donde se apreció el desarrollo de lesiones cutáneas angiomatosas pseudokaposiformes. Teniendo en cuenta que en el modelo de ratones transgénicos, la expresión del gen *tat* está típicamente confinada al tejido cutáneo y que además las células de Langerhans epidérmicas en humanos son las mayores dianas cutáneas para el VIH-1, debe considerarse la posibilidad de que la producción de la proteína tat en dichas células y su consecutiva liberación en la dermis podría proveer, por proximidad física, los estímulos coadyuvantes necesarios para la inducción de las lesiones pseudokaposiformes.

De todas formas, estudios experimentales posteriores confirmaron *in vitro* que la proteína tat no estimula la angiogénesis cuando es inoculada de forma aislada. Sólo tras la exposición de células cutáneas y células T infectadas con el VIH-1 cultivadas a supernadantes ricos en citocinas, las células endoteliales normales -probablemente las progenitoras de las células del SK-, devienen más receptivas a los efectos mitogénicos/angiogénicos de la proteína tat.

De esto se deduce que para ser receptivas a los efectos de la proteína tat, las células requieren ser preactivadas mediante citocinas inflamatorias, como por ejemplo la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  (Barillari 1999). Normalmente éstas se encuentran ya incrementadas en

el medio secundariamente a la reacción inflamatoria frente a las infecciones víricas por el VHH-8 y el VIH-1 (Pugliese 2002). A su vez, las citocinas estimulan la expresión tisular de factores de crecimiento angiogénicos como el HGF, el bFGF y el VEGF, y también de sus receptores.

Los propios factores bFGF y VEGF inducen la expresión de unos receptores que median las interacciones entre las células endoteliales y la matriz extracelular, denominados integrinas, a través de las cuales promueven la angiogénesis. El VEGF promueve la expresión de la integrina- $\alpha$ v- $\beta$ 5, mientras que el bFGF promueve la expresión de la integrina- $\alpha$ v- $\beta$ 3.

La proteína tat posee un dominio similar al del resto de factores de crecimiento angiogénicos mediados por la heparina (Albini 1996). Este dominio ácido o RGD de la proteína tat es capaz de unirse a las integrinas de tipo  $\alpha$ v- $\beta$ 3 inducidas por la bFGF, pero no a las inducidas por el VEGF. Por lo tanto, el efecto angiogénico de la proteína tat es sinérgico al del factor bFGF y se correlaciona con la expresión de las integrinas- $\alpha$ v- $\beta$ 3. De hecho, los receptores  $\alpha$ v- $\beta$ 3 están altamente expresados en las células fusiformes y en las células endoteliales preactivadas de las lesiones del SK, colocizándose con el tat extracelular. La unión de la proteína tat a las células endoteliales a través de las integrinas- $\alpha$ v- $\beta$ 3, ofrece la señal necesaria para que éstas proliferen, migren y crezcan, favoreciendo de esta forma la progresión tumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Estos hallazgos confirman que la proteína tat actúa como un factor de crecimiento angiogénico indirecto, ya que necesita la activación de las células endoteliales y la

inducción específica de los receptores por las citocinas inflamatorias y los factores de crecimiento, para poder ejercer su actividad angiogénica.

En respuesta a la estimulación con la proteína tat y en presencia de un medio acondicionado por las células T activadas, las células del SK comienzan la proliferación y la migración celular, degradando la membrana basal de colágeno tipo IV, lo que indica la adquisición de un cierto potencial invasivo (Corallini 1996).

En resumen, los linfocitos T CD4+, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas infectadas con el VIH-1 son capaces de producir proteína tat soluble que se une a las integrinas- $\alpha$ v- $\beta$ 3 de la superficie de las células del SK estimulándolas de forma que proliferan, y son capaces de producir y liberar citocinas proinflamatorias (IL-6) y angiogénicas (FGF- $\beta$ ) que mediante un efecto paracrino estimulan el crecimiento tumoral. Las citocinas inflamatorias liberadas por los leucocitos infectados por el VIH-1 y por las propias células del SK pueden iniciar mecanismos de estimulación del crecimiento y de la proliferación de ciertas células de respuesta -probablemente células endoteliales normales y/o células precursoras del SK-, que a partir de ese momento adquieren características funcionales y fenotípicas de células del SK y se transforman en autónomas.

Con todos estos datos es lógico especular que la estimulación crónica del sistema inmune a través de la liberación continua de citocinas inflamatorias, efecto dramáticamente incrementado por la proteína tat, puede contribuir a la patogénesis del SK-SIDA.

Se cree que en los casos de SK-SIDA, el VHH-8 y el VIH-1 sobrerregulan su expresión génica recíprocamente. Por ejemplo, el producto del gen KIE2 del VHH-8 interactúa sinérgicamente con la proteína tat activando la expresión de genes del VIH-1. Por otro lado, la proteína tat y otras codificadas por el VIH-1 incrementan la expresión intracelular de genes del VHH-8. Estos resultados correlacionan la coinfección del VHH-8 y del VIH-1 con una mayor incidencia del SK en pacientes con SIDA (Huang 2001).

Por otro lado, se ha descrito una molécula de aproximadamente 30kDa denominada oncostatina M, una citocina producida por macrófagos y linfocitos T activados, que parece ser uno de los principales componentes promotores del crecimiento en los medios infectados por retrovirus, ya que se ha identificado su ARNm y la propia proteína en células aisladas de lesiones de SK-SIDA. De hecho, en los casos controles la oncostatina M no se expresa en ninguno de los diversos órganos examinados. Mientras que en los pacientes VIH-1 positivos la oncostatina M se expresa en las células fusiformes y en las células endoteliales tumorales, en las células musculares lisas que revisten las glándulas sudoríparas, en las capas epidérmicas de la piel, y también en las células endoteliales que revisten vasos no afectados por el SK. La conclusión es que la oncostatina M sólo se expresa en la piel y en las lesiones de SK de los individuos VIH-1 positivos (Cai 1994).

Tras la exposición *in vitro* a oncostatina M, las células cultivadas del SK-SIDA adquieren una morfología fusiforme, muestran un incremento de su proliferación y secretan una gran cantidad de IL-6, de lo que se deduce que la actúa como un potente mitógeno (Miles 1992). No obstante, la oncostatina M no induce directamente el crecimiento de las células endoteliales, sino que al incrementar la expresión de IL-6 en estas células, permite que ésta

ejerza su actividad mitogénica sobre los cultivos de células fusiformes derivadas del SK. Adicionalmente, la oncostatina M actúa como un factor de crecimiento autocrino para el SK, ya que tras la utilización de un antisuero específico, la proliferación de las células fusiformes del SK se inhibe, de forma correlativa con la disminución de IL-6.

### **3.5.2. Inducción de la reactivación del ciclo lítico del VHH-8 por el VIH-1**

Como hemos comentado con anterioridad, todos los herpesvirus, incluyendo el VHH-8, establecen infecciones latentes en las células del huésped. La reactivación VHH-8 en las células infectadas permite el desarrollo de una infección lítica con la consiguiente destrucción de la célula huésped y propagación de la infección a otras células. Es evidente que la regulación de la inducción de la infección lítica y de la replicación vírica del VHH-8 puede ser un punto crítico en la progresión de las enfermedades relacionadas con este virus, como es el caso del SK. No obstante, se desconoce en general el mecanismo por el cual el virus establece la latencia y permite su posterior reactivación.

Algunos autores han planteado que el VIH-1 puede participar en la patogénesis del SK modulando la replicación del VHH-8, amplificando de esta forma sus efectos. Para ello han realizado estudios que examinan la replicación del VHH-8 en líneas celulares infectadas del linfoma B de cavidades (BCBL-1), tras el cocultivo con una línea de células T CD4+ infectadas con el VIH-1 (Mercader 2000; Mercader 2001).

Un gran número de estudios previos han demostrado que las citocinas inflamatorias producidas por las células mononucleares del infiltrado inflamatorio acompañante y

posteriormente por las células tumorales del SK, tienen un papel crítico en el desarrollo de las lesiones del SK, permitiendo que las células endoteliales precursoras adquieran las características típicas de las células tumorales del SK, promoviendo su crecimiento y proliferación tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los resultados sobre la línea celular BCBL-1/VIH-1 han demostrado que algunas de estas citocinas inflamatorias, en particular la oncostatina M, el HGF y el IFN- $\gamma$ , producidas por las células mononucleares infectadas con el VIH-1, y en menor grado por las propias líneas celulares infectadas por el VHH-8 (BCBL-1), son capaces de inducir la replicación del ciclo lítico del VHH-8. Estos resultados indican que las citocinas, pueden estar involucradas en la iniciación y progresión del SK, también a través de la reactivación del VHH-8. Las citocinas involucradas en la reactivación del VHH-8, a excepción de la oncostatina M, pueden producirse en pacientes VIH-1 negativos y bajo condiciones inflamatorias fisiológicas, lo que explicaría la reactivación del VHH-8 y la aparición del SK en otros grupos clínicos.

Aunque algunos estudios refieren que la reactivación del VHH-8 se debe a la estimulación por las citocinas, algunos autores han postulado que otras proteínas asociadas al VIH-1 puedan estar también involucradas en la inducción de la infección lítica del VHH-8. Entre ellas se deben considerar la proteína tat, la gp120, la gp160 y la gp41. Los únicos estudios referidos a este tema parecen indicar que la proteína tat extracelular podría tener un papel crítico, desechando a la gp120 como posible responsable de la reactivación del VHH-8 (Lu 2002). Asimismo, proteínas asociadas al VHH-8, como el antígeno nuclear asociado a latencia (LANA 1), parece estar implicado en la persistencia episomal, en la regulación de

la transcripción y en la interacción con las proteínas celulares (Collins 2002; Komatsu 2002). Alteraciones en esta molécula podrían producir trastornos en la estructura episomal del VHH-8. El gen *Lyta* del VHSK, codificado a partir del ORF50 del genoma vírico, es un gen de activación lítica que permite la salida de latencia. Se ha identificado que la región promotora del gen *Lyta* está altamente metilada en las células con infección latente derivadas de PEL (Chen 2001). La desmetilación de esta región induce la fase lítica viral *in vitro* de estas células, observándose los mismos resultados *in vivo*. Es decir, existe una relación entre la desmetilación del promotor del *Lyta* y la reactivación del VHH-8, pero hasta ahora se desconoce el mecanismo que lo precipita. No obstante, son necesarios más estudios para confirmar de una manera certera estas hipótesis.

Es evidente que el contacto directo entre las células infectadas y las células endoteliales precursoras puede ser importante para la transmisión de la infección y el desarrollo del SK. Esta proximidad física promueve aún más la estimulación de la replicación del VHH-8 por los productos del VIH-1 y, también la transmisión de la infección por el VHH-8 a otras células adyacentes. El VIH-1 se identifica además de en los linfocitos T, en las células dendríticas dérmicas, en las células de Langerhans y en los queratinocitos basales de las lesiones cutáneas del SK, en proximidad con las células infectadas por el VHH-8 (queratinocitos basales, células dendríticas, queratinocitos, macrófagos, células endoteliales y células tumorales del SK).

Asimismo, varios estudios han mostrado que la carga viral del VHH-8 es mayor en pacientes con SK que en individuos infectados con VHH-8 que no ha desarrollado SK. Consecuentemente, esto concuerda también con la reciente evidencia de que la carga viral

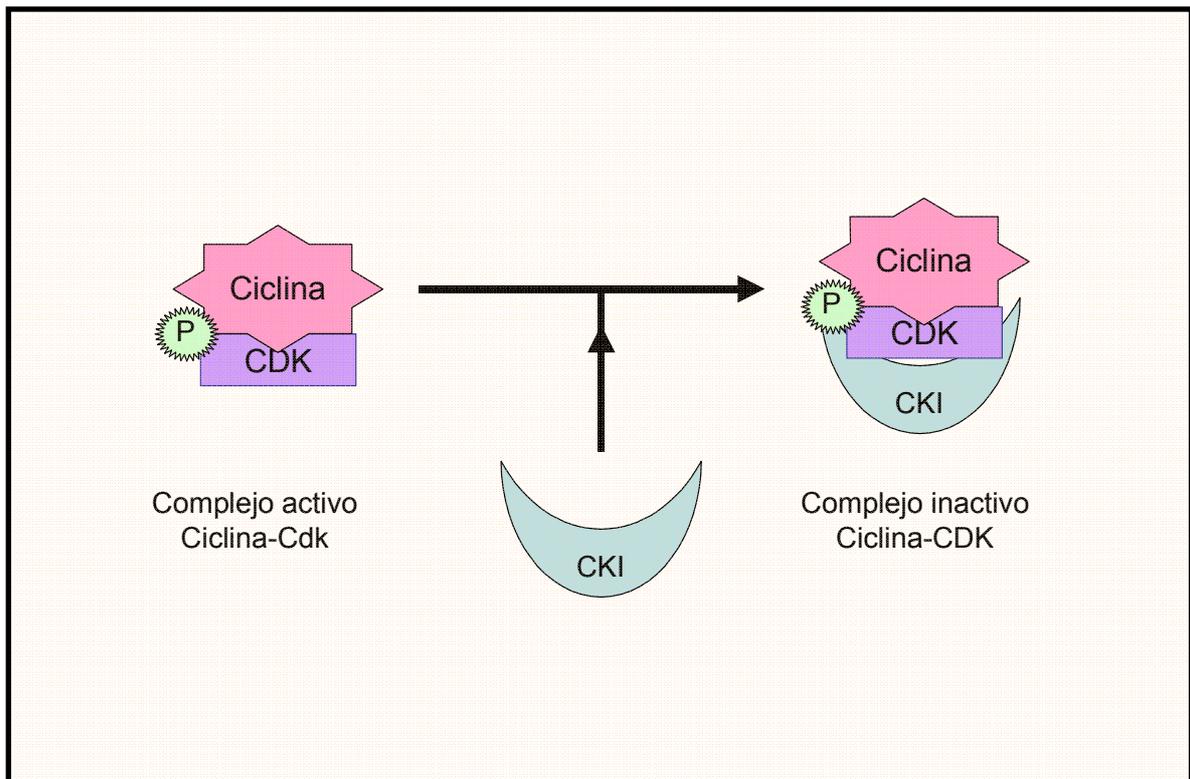
y la prevalencia del VHH-8 se incrementa con la progresión de las lesiones, siendo más alta en el estadio nodular o final de la enfermedad, puesto que cuantas más células estén infectadas más extensos serán los efectos patogénicos del VHH-8. Estos hallazgos correlacionarían con el hecho demostrado de que la detección de la infección por el VHH-8, mediante anticuerpos o bien a través de la carga viral, puede ser predictiva del desarrollo de la enfermedad.

### 3.6. LAS PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LAS CDK (CKI): LA P27<sup>KIP1</sup>

En general, las proteínas inhibidoras de las CDK (CKI) son un grupo de factores proteicos con actividad inhibidora sobre los complejos formados por la unión de la ciclina y de las cinasas dependientes de ciclina o CDK. La unión de la CKI produce una redistribución de la estructura tridimensional del lugar de activación de la CDK, manteniéndola inactiva e impidiendo de este modo que realice su acción cinasa sobre proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular (**Esquema 8**). Restringiendo la actividad de los complejos ciclina-CDK, las CKI previenen la proliferación de la célula. La actividad de las CKI se afecta en muchos tumores, indicando que estas proteínas son críticas para el control de la proliferación celular.

Existen dos familias de CKI según su estructura y según las CDK a las que se unen: la familia INK4 y la familia CIP/KIP. La familia INK4 (inhibidores de la CDK4) está constituida por las proteínas p16<sup>INK4a</sup>, la p15<sup>INK4b</sup>, la p18<sup>INK4c</sup> y la p19<sup>INK4d</sup> o p19<sup>SKP1</sup>, que actúan únicamente sobre los complejos formados por las cinasas CDK4 o CDK6 y las ciclinas de tipo D. La familia CIP/KIP, constituida por las proteínas p21<sup>CIP1</sup>, la p27<sup>KIP1</sup> y la p57<sup>KIP2</sup>, posee una amplia actividad inhibidora sobre casi todas las CDK, pero principalmente sobre los complejos formados por las cinasas dependientes de la ciclina D, E y A. Se han identificado otras moléculas con función inhibidora dentro del ciclo celular, por lo que se cree que existen más tipos de CKI. Sin embargo, su estructura no está todavía completamente definida. Las principales CKI en las células de los mamíferos son la p27<sup>KIP1</sup>, la p21<sup>CIP1</sup> y la p16<sup>INK4a</sup> (Sherr 1995; Nakayama 1998).

Aunque inicialmente se pensó que la única actividad de las CKI era inhibidora, trabajos más recientes basados en experimentos *in vitro* y estudios de sobreexpresión *in vivo* han revelado que algunas proteínas CIP/KIP también pueden actuar como reguladores positivos de las CDK, entre ellas la p27<sup>KIP1</sup> (ver apartado 3.2.2.5.).



**Esquema 8:** Inhibición de un complejo ciclina-CDK por la CKI p27<sup>KIP1</sup>. La p27<sup>KIP1</sup> se une tanto a la ciclina como a la CDK, distorsionando el lugar de activación de esta última.

### 3.6.1. La p27<sup>KIP1</sup>

La proteína CKI p27<sup>KIP1</sup> es un inhibidor de la división y proliferación celular, siendo uno de los responsables primarios del control de la transición G1/S. La acción principal de la p27<sup>KIP1</sup> es la regulación negativa de la progresión del ciclo celular, a través del control específico de la actividad de los complejos ciclina-CDK que actúan en dicha transición. Es decir, el producto del gen *p27<sup>KIP1</sup>* se une e inhibe a los complejos ciclinas D-CDK4/6, ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2. Al operar en un punto crítico del ciclo celular, la p27<sup>KIP1</sup> toma parte activa en múltiples funciones decisivas de la célula como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Sgambato 2000).

Al impedir la transición entre las fases G1 y S, la p27<sup>KIP1</sup> es una de las moléculas encargadas de ayudar a las células a retirarse del ciclo celular, lo que explicaría la presencia de concentraciones elevadas de p27<sup>KIP1</sup> en células diferenciadas y quiescentes (fase G0) (Steeg 1997). Esto se ha demostrado experimentalmente en linfocitos T y en fibroblastos en donde los niveles elevados de la p27<sup>KIP1</sup> parecen ser uno de los determinantes primarios en el mantenimiento de su estado de quiescencia (Kato 1994; Nourse 1994; Coats 1996; Rivard 1996). Por lo tanto, la p27<sup>KIP1</sup> podría tener una función similar a la de la pRb activa en la permanencia de las células en G0 y, en último término, en la diferenciación celular. Consecuentemente, para que las células quiescentes inicien de nuevo la división es necesaria la disminución de la p27<sup>KIP1</sup>, mientras que para que las células proliferantes abandonen el ciclo celular se requiere un incremento en la concentración de la p27<sup>KIP1</sup>.

Adicionalmente, algunos estudios han descrito que la  $p27^{KIP1}$  puede ejercer efectos protectores contra la apoptosis celular disminuyendo la actividad de la CDK2. En general, es lógico que la CKI  $p27^{KIP1}$  coordine el ciclo celular y los programas de muerte celular para que la viabilidad de la célula se mantenga cuando ésta decide salir de la división celular (Hiromura 1999).

La implicación de la  $p27^{KIP1}$  en la regulación negativa de la proliferación celular en los modelos experimentales y en los estudios con tumores humanos sugiere que puede comportarse potencialmente como un gen supresor de tumores (Loda 1997; Sgambato 2000), proporcionando nuevas evidencias en el vínculo entre el ciclo celular y la oncogénesis. En contraste con la mayoría de los genes supresores de tumores estudiados hasta la fecha (como el pRb) la  $p27^{KIP1}$  no necesita la inactivación de sus dos alelos para perder su función, ya que la pérdida de sus efectos como gen supresor de tumores se realiza a través de mecanismos que estimulan su degradación (ver apartado 3.6.3.). Es decir, la  $p27^{KIP1}$  parece pertenecer a un nuevo tipo de genes supresores de tumores en los que la reducción de la expresión de la proteína no está generalmente causada por cambios genéticos. La ausencia de mutaciones en el gen de la  $p27^{KIP1}$  en cánceres humanos apoya esta hipótesis. De todas formas, el hecho de que la función supresora tumoral de la  $p27^{KIP1}$  dependa críticamente de su nivel absoluto de expresión indica que actúa como un reóstato, más que como un verdadero gen recesivo en el control del crecimiento y de la transformación neoplásica (Gstaiger 2001; Philipp-Staheli 2001).

Además de su papel como CKI y potencial gen supresor de tumores, la proteína  $p27^{KIP1}$  puede coordinar varias señales procedentes del medio extracelular, actuando como límite o

umbral de tolerancia para la progresión a la fase S o la salida del ciclo celular (Polyak 1994). De hecho, la cantidad celular de p27<sup>KIP1</sup> se incrementa en respuesta a múltiples estímulos antimitogénicos, ejerciendo una función similar, aunque contraria, a la que realiza la ciclina D frente a estímulos mitogénicos. Si la p27<sup>KIP1</sup> es capaz de controlar la activación del ciclo celular en respuesta a estímulos antimitogénicos ambientales, debe considerarse una molécula esencial en la regulación de la progresión del ciclo celular. De esto se deduce que una de las formas de asegurar que las células tumorales no respondan a señales ambientales antimitogénicas una vez han iniciado la fase S podría ser eliminar a la p27<sup>KIP1</sup>.

Una vez que una célula entra en la fase S está obligada a completar el ciclo celular independientemente de los estímulos que reciba del medio exterior, de lo que se deduce que debe existir un mecanismo que asegure la irrevocabilidad de esta decisión. La entrada en fase S es dependiente de la activación coordinada de las cinasas CDK4, 6 y CDK2 que, a su vez, es regulada por su asociación con la p27<sup>KIP1</sup>. Además, la p27<sup>KIP1</sup> desempeña un importante papel en la salida de la célula del ciclo en respuesta a señales ambientales. Teniendo esto en cuenta, es probable que gracias a su relación con estas cinasas, la p27<sup>KIP1</sup> sea una de las moléculas de la maquinaria del ciclo celular encargadas de asegurar la irrevocabilidad de la entrada en la fase S (Nguyen 1999).

En cultivos se ha observado que la expresión de la p27<sup>KIP1</sup> está regulada negativamente por contacto celular y por algunos factores de crecimiento específicos. El contacto intercelular (que ocurre por confluencia de las células epiteliales o mesenquimales en cultivo) y la pérdida de adhesión celular (en crecimientos celulares en suspensión) regulan

positivamente los niveles de la p27<sup>KIP1</sup> (St Croix 1996). El TGF- $\beta$  es un factor estimulante *in vivo* de la p27<sup>KIP1</sup> y también de la p15<sup>INK4b</sup>, por lo que actúa como un factor inhibidor del ciclo celular. De la misma forma, agentes que eleven la concentración del AMPc y algunos fármacos inhibidores del crecimiento incrementan la concentración de p27<sup>KIP1</sup> (Kato 1994; Kawana 1998; Lloyd 1999).

En las células eucariotas, otras moléculas del ciclo celular (como las propias CDK) son también encargadas de regular a las CKI, existiendo una regulación mútua entre las CKI y las CDK. Por ejemplo, la CDK2 dependiente de ciclina E/A es la encargada de fosforilar a la p27<sup>KIP1</sup>, lo que precipita su degradación a través de la vía ubiquitin-proteasoma (Montagnoli 1999; Nguyen 1999). Asimismo, las CDK son capaces de inhibir proteínas reguladoras necesarias para la transcripción genética y la síntesis de la p27<sup>KIP1</sup>, disminuyendo de esta otra forma sus niveles en la célula.

Recientemente se ha descrito la existencia de un mecanismo capaz de anular la actividad de la p27<sup>KIP1</sup> sin degradarla, y que consiste básicamente en el secuestro de la p27<sup>KIP1</sup> por parte del complejo ciclina D-CDK (ver apartado 3.2.2.5.). Aunque en un principio se creía que el complejo ciclina D-CDK tenía una actividad semejante a la del complejo ciclina E-CDK2, en lo que se refiere a la fosforilación y degradación de la p27<sup>KIP1</sup>, se ha observado que el complejo ciclina D-CDK es capaz de unirse a la p27<sup>KIP1</sup> formando un complejo ternario que anula la actividad inhibidora de la CKI pero mantiene la actividad cinasa intrínseca del complejo, permitiéndole realizar sus principales funciones, como la fosforilación de la pRb. El secuestro de la p27<sup>KIP1</sup> impide que ésta realice su acción inhibidora sobre el complejo ciclina E-CDK2, permitiendo la progresión del ciclo celular

y, en último término, facilitando su propia degradación vía ubiquitin-proteasoma. El complejo ciclina E-CDK2 es también capaz de formar este complejo ternario con la p27<sup>KIP1</sup>, pero ello conlleva la inhibición de su actividad cinasa y el freno de la transición G1/S.

Este descubrimiento ha puesto de relieve nuevas funciones de la p27<sup>KIP1</sup> como regulador positivo (Moller 2000): estabilización de la formación y mantenimiento del complejo ciclina D-CDK; y constitución de un reservorio latente de p27<sup>KIP1</sup> que puede ser liberado del complejo para realizar funciones específicas sobre otras cinasas.

Como regulador pleiotropo, la p27<sup>KIP1</sup> es una molécula diana de alteraciones que pueden tener como consecuencia la disregulación del ciclo celular y el desarrollo de cáncer (Desdouets 2000). Al funcionar controlando la salida del ciclo celular durante el desarrollo, la p27<sup>KIP1</sup> tiene un papel negativo en la progresión tumoral y, por lo tanto, suele ser inactivada durante la transformación neoplásica. Numerosos estudios clínicos han mostrado que los niveles de la p27<sup>KIP1</sup> se encuentran frecuentemente reducidos en diversos cánceres humanos, correlacionándose con un peor pronóstico (Tsihlias 1999).

### **3.6.2. La degradación de las moléculas del ciclo celular**

Los mecanismos cruciales utilizados por las células en el control de los niveles de las proteínas reguladoras específicas que se requieren en cada paso del ciclo celular son, además de la estimulación y la inhibición, la síntesis y la degradación. La interrupción de estos dos últimos mecanismos también puede originar una proliferación celular anormal e

incluso el desarrollo de neoplasias, especialmente si la alteración tiene como última consecuencia la pérdida de control en la transición entre las fases G1 y S.

En general, la degradación de las proteínas es un mecanismo regulador clave de la progresión del ciclo celular. Los acontecimientos proteolíticos pueden actuar no sólo en la transición G1/S, sino también en la entrada en la fase S asegurando la irrevocabilidad de ésta y manteniendo el orden del ciclo celular. Igualmente, la separación de las cromátidas hermanas y la salida de la mitosis son también dependientes de la proteólisis.

En los últimos años los mecanismos de degradación de proteínas han atraído una gran atención y se han realizado intensos esfuerzos para intentar dilucidar las características intrínsecas de la maquinaria involucrada en la degradación de las proteínas con vida media corta que toman parte en el ciclo celular.

Aunque existen múltiples vías proteolíticas, la proteólisis más regulada se realiza mediante un mecanismo denominado vía ubiquitin-proteasoma, que consta de tres pasos principales: señalización de la proteína diana o sustrato, unión de múltiples moléculas de ubiquitina al sustrato proteínico y, por último, la degradación a través del proteasoma (Alberts 2002).

### **3.6.2.1. El sistema de degradación de proteínas dependiente de la ubiquitina y el complejo proteasoma**

#### **El proteasoma**

En las células eucariotas el proteasoma es el dispositivo final dedicado a la proteólisis de polipéptidos. Se trata de una proteasa compleja dependiente de ATP que constituye un 1% del total de las proteínas dispersas en el citosol y en el núcleo. Estructuralmente cada proteasoma consiste en un cilindro con un hueco central (núcleo de 26S del proteasoma) formado por múltiples subunidades proteínicas que se ensamblan como una estaca de cuatro anillos heptaméricos. Algunas de estas subunidades son proteasas distintivas cuya actividad se localiza hacia la cara interna del proteasoma. Cada extremo del cilindro se asocia con un complejo proteínico de 19S que contienen ATPasas y son los responsables de la unión e introducción de las proteínas sustrato en el interior de la cámara de proteólisis, actuando también como verjas reguladoras de la entrada a esta cámara proteolítica.

La propiedad crucial y una de las razones de la complejidad del diseño del proteasoma es la procesividad de su mecanismo. En contraste con una proteasa simple que degrada únicamente pequeñas porciones de un sustrato polipéptido, el proteasoma procesa el sustrato entero en su interior hasta que todo él se encuentra convertido en pequeños polipéptidos (Voges 1999).

## La ubiquitinación

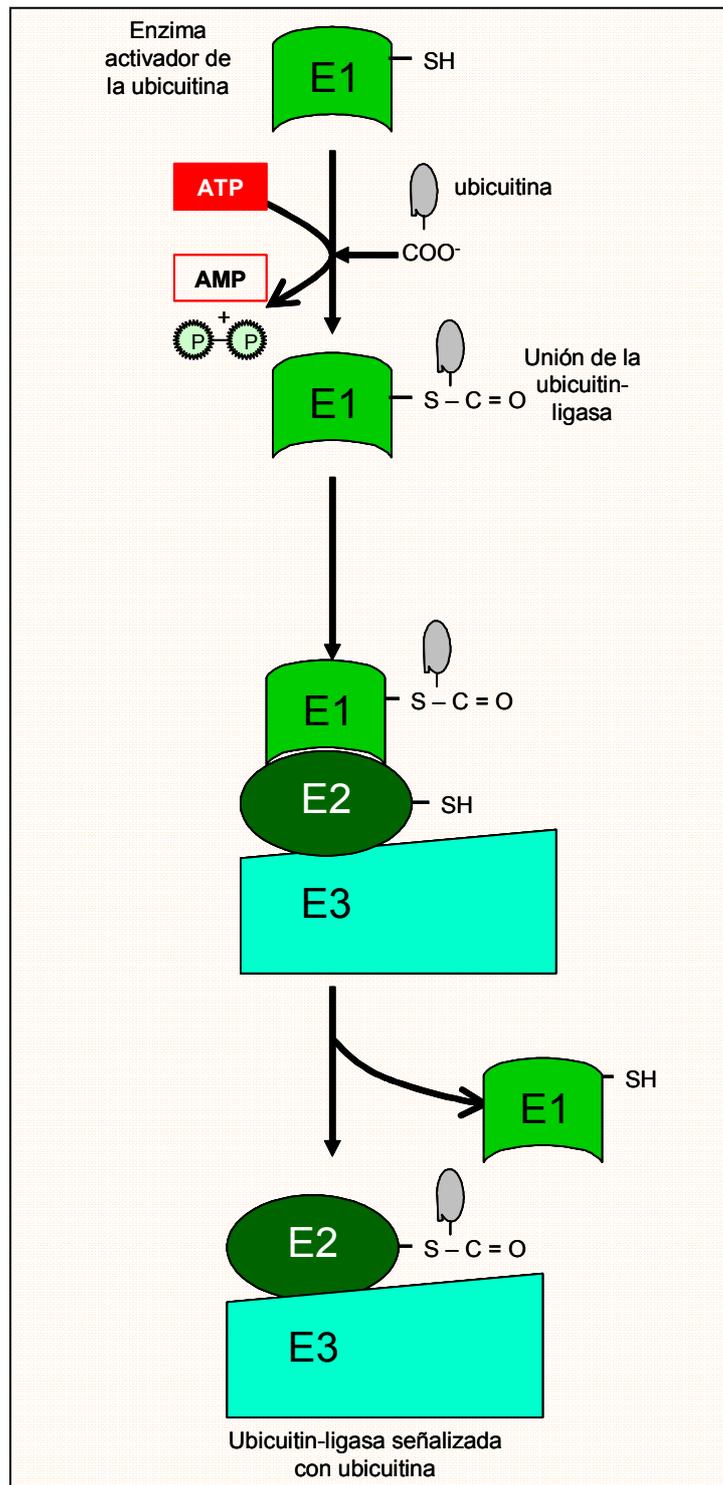
Con escasas excepciones, los proteasomas actúan en proteínas que han sido específicamente marcadas para su destrucción mediante el enlace covalente de múltiples copias de una pequeña proteína de 76 aminoácidos denominada ubiquitina. La ubiquitina se encuentra en la célula libre o bien unida covalentemente a una amplia variedad de proteínas intracelulares. Para la mayoría de estas proteínas, la unión con la ubiquitina constituye una señalización que las dirige hacia su destrucción posterior mediante el proteasoma.

La transferencia de la ubiquitina al sustrato requiere al menos la colaboración de una enzima activadora de la ubiquitina o E1 dependiente de ATP, que crea una ubiquitina activada que se transfiere a una serie de enzimas conjugadoras de la ubiquitina o E2. Generalmente para favorecer el reconocimiento del sustrato se requiere la colaboración de un tercer componente constituido por unas proteínas accesorias denominadas genéricamente E3, que actúan en conjunción con las enzimas E2. En el complejo E2-E3, denominado también ubiquitin-ligasa, el componente E3 se une a lugares de degradación específicos de la proteína sustrato y ayuda a la E2 a unir una molécula de ubiquitina a una lisina de la proteína sustrato. De esta forma, el residuo C-terminal de cada ubiquitina se une a la lisina específica de la ubiquitina precedente, originando en la proteína diana una serie lineal de conjugados ubiquitina-ubiquitina o cadena multiubiquitina, que es reconocida por un receptor específico en el proteasoma (**Esquema 9A y 9B**). Por lo tanto, el paso limitante en la destrucción de las proteínas es la transferencia final de la ubiquitina catalizada por los enzimas conocidos como ubiquitin-ligasas (E2-E3).

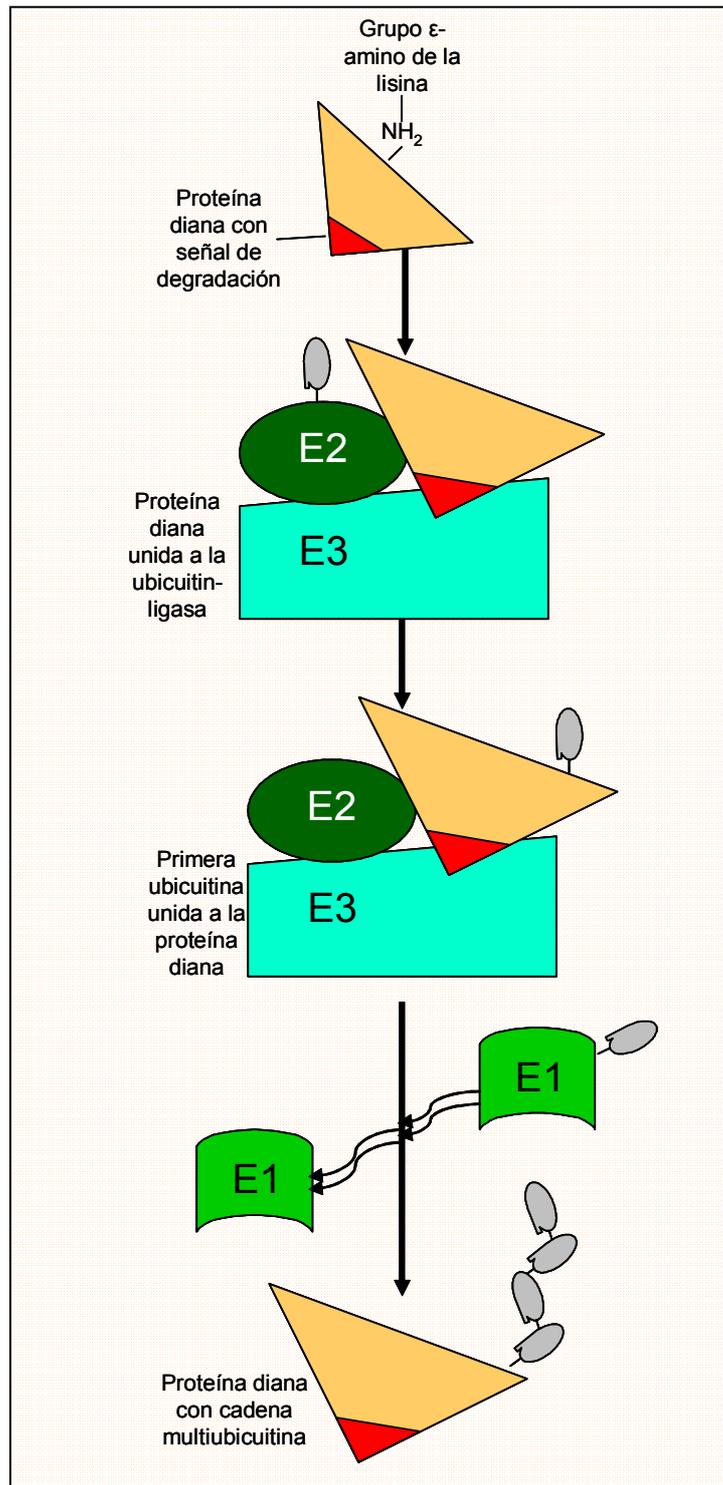
En los mamíferos existen aproximadamente unas 30 enzimas E2 y cientos de proteínas E3 que, aunque son estructuralmente parecidas, poseen especificidad de sustrato. De esto se traduce que el sistema ubiquitin-proteasoma está constituido por múltiples vías proteolíticas diferentes pero organizadas de un modo similar, que tienen en común las enzimas E1 y difieren en la composición de sus ubiquitin-ligasas E2-E3. Cada ubiquitin-ligasa reconoce ciertas señales de degradación y, por lo tanto, marcan para su destrucción proteínas intracelulares específicas (Hershko 2000).

Como se ha comentado previamente (ver apartado 3.2.2.3.) existen dos tipos principales de complejos enzimáticos (Peters 1998) en el sistema de control del ciclo celular:

- el complejo SCF, implicado en la transición G1/S, ya que sus sustratos diana son las ciclinas G1 y las CKI;
- y el complejo promotor de la anafase (APC), que se requiere para la separación de las cromátidas hermanas en la anafase y para la salida de la fase M a la G1, mediante la ubiquitinación de las ciclinas mitóticas y de algunos inhibidores de la anafase (p.e., securinas).



**Esquema 9A:** Marcaje de las proteínas diana con ubiquitina (ubiquitinilación). Adición secuencial de la proteína ubiquitina a la enzima activadora de la ubiquitina (E1) y al complejo ubiquitin-ligasa (E2-E3).



**Esquema 9B:** Marcaje de las proteínas diana con ubiquitina (ubiquitinación). Adición de una cadena multiubiquitina a una proteína diana.

### **Señalización de las proteínas diana o sustrato**

La señal que permite la unión de las moléculas de ubiquitina a las proteínas puede adquirirse por distintos mecanismos. Un modo frecuente de crear esta señal es fosforilar un punto específico en la proteína que, a su vez, enmascara una señal de degradación escondida en condiciones normales. De la misma forma, la respuesta a señales intracelulares o del medio extracelular puede crear una señal de destrucción en la proteína causando su rápida ubiquitinación. Alternativamente, pueden crearse potentes señales de degradación produciendo la ruptura de un vínculo peptídico que origine un extremo N-terminal desestabilizante de la proteína. Finalmente, alteraciones en la actividad de la ubiquitin-ligasa debidas a la fosforilación o a la transición alostérica de la E3, ya sea por la unión con una molécula específica o por la adición de una subunidad proteínica, pueden inducir una ubiquitinación anormal.

### **Función de la vía ubiquitin-proteasoma**

Las principales funciones de los mecanismos proteolíticos intracelulares son reconocer y eliminar proteínas malformadas y conferir una vida media corta a ciertas proteínas estructuralmente normales cuyas concentraciones deben variar rápidamente para permitir cambios en el estado celular. Algunas de las proteínas que toman parte en el sistema de control del ciclo celular, como las ciclinas y las CKI, son degradadas por el sistema ubiquitin-proteasoma.

La señal que permite la ubiquitinación de estas proteínas reguladoras del ciclo celular suele ser la fosforilación de ciertas localizaciones en su estructura proteínica. Los estudios concernientes a las modificaciones post-transcripcionales de la ciclina D1, la ciclina E y la p27<sup>KIP1</sup> en las células de los mamíferos, demuestran la importancia de la fosforilación de estas moléculas en una localización específica de su estructura para hacerlas susceptibles a la ubiquitinación.

### **Importancia de la vía ubiquitin-proteasoma**

Gran parte de las investigaciones realizadas en la última década relacionadas con la oncología se han centrado en la comprensión de la regulación del ciclo celular. Evidentemente, la caracterización de los mecanismos que controlan el recambio de las moléculas reguladores de la transición G1/S es necesaria para un entendimiento completo del ciclo celular y de la carcinogénesis.

En este sentido, se ha podido constatar que la regulación post-transcripcional, especialmente el sistema de degradación de las proteínas dependiente de la ubiquitina y el proteasoma o vía ubiquitin-proteasoma, desempeña un papel fundamental en el control del ciclo celular y, por lo tanto, en la proliferación celular y en el desarrollo del cáncer a través de su participación en la degradación de las moléculas de vida media corta reguladoras de la división celular.

La degradación de las proteínas dependiente de la vía ubiquitin-proteasoma es un proceso altamente selectivo y preciso en el tiempo que permite una activación instantánea de un

programa funcional a otro. La especificidad de sustrato y la rapidez en la degradación de las proteínas son características básicas para controlar las fluctuaciones en las concentraciones de estas proteínas reguladoras a lo largo del ciclo celular.

La destrucción excesiva o defectiva de la proteólisis mediante la vía ubiquitin-proteasoma de algunas de estas moléculas puede producir alteraciones en la división celular. Evidentemente, si la proteína seleccionada para la proteólisis es un estimulador del ciclo celular, como una ciclina, su destrucción frenará la fase del ciclo celular que ésta regula. Mientras que si se trata de una proteína con función inhibitoria, como la p27<sup>KIP1</sup>, se producirá una pérdida del control inhibitorio, lo que en última instancia se traduce en un incremento de la proliferación. Estos ejemplos reflejan la importancia para la célula de un correcto funcionamiento de la degradación de las moléculas reguladoras del ciclo celular, indicando a la vía ubiquitin-proteasoma como otro mecanismo crucial del sistema de control del ciclo celular eucariota.

Como ya hemos comentado, los principales puntos de control de la actividad de los complejos ciclina-CDK son la unión o degradación de las ciclinas, la fosforilación de la subunidad catalítica, o bien la unión de las CKI. La proteólisis mediada por la ubiquitina y el proteasoma puede actuar a todos estos niveles y, por tanto, desempeña un papel decisivo en la regulación de los complejos ciclina-CDK y en el control del ciclo celular de las células mamíferas (Argilés 1998). Por ejemplo, los complejos ciclina-CDK que están involucrados en las decisiones más críticas del crecimiento y la quiescencia celular son los complejos formados por las ciclinas de tipo D y las ciclinas E y A con sus respectivas subunidades catalíticas, cuyas actividades son esenciales para conducir a las células de la

fase G1 a la fase S. La proteólisis mediada por la vía ubiquitin-proteasoma es uno de los principales reguladores de la actividad de estas ciclinas (Krek 1998).

La actividad de la proteína p53 en relación al daño del ADN se asocia al reconocimiento de la lesión genética por medio de proteínas específicas que activan directa o indirectamente a los complejos de reparación del ADN. En este sentido, se ha identificado que la enzima de conjugación de la ubiquitina UBC2 interacciona con una de estas proteínas de reconocimiento de la lesión genética. Esto indica que la degradación proteica mediada por la ubiquitina y el proteasoma tiene un papel importante en la transducción de la señal de lesión del ADN (UBC2), e impidiendo la degradación de la p53 mediante la inhibición de las protein-cinasas que la fosforilan (ver apartado 3.3.6.3.). La vía ubiquitin-proteasoma participa en la degradación proteolítica de la proteína p53 a través de una ubiquitin-ligasa denominada Mdm2 (Haupt 1997).

Además de la ciclinas y de la proteína p53, existen otros productos de oncogenes con funciones importantes en la progresión normal del ciclo celular, que son también susceptibles de ser degradados por la vía ubiquitin-proteasoma. Entre ellos cabe destacar al *c-mos* o *factor citostático-1 (CSF-1)*, el *c-jun* y el *c-fos*.

Es interesante destacar que parecen existir oncogenes relacionados con la vía ubiquitin-proteasoma. El oncogén humano *tre-2* codifica una enzima relacionada con el sistema de la ubiquitina que cataliza la ruptura del enlace entre la ubiquitina y los remanentes del sustrato original todavía unidos al complejo proteasómico. Otro de los genes cuya

expresión podría relacionarse con la aparición de tumores humanos es el *UBE1L*, cuyo producto tiene un elevado grado de identidad con la enzima E1.

Además, la vía ubiquitin-proteasoma también participa en otros tipos de situaciones patológicas diferentes al desarrollo neoplásico, como la enfermedad de Alzheimer, las distrofias musculares o la caquexia (Argilés 1998).

En el caso del cáncer, el estudio de la implicación de la vía ubiquitin-proteasoma es particularmente interesante, ya que debe averiguarse si los cambios observados en ella son el efecto o la causa del crecimiento tumoral. Igualmente, un mayor conocimiento del ciclo celular y de los mecanismos de control y regulación de la vía ubiquitin-proteasoma *in vivo* podría servir para el descubrimiento de nuevos oncogenes relacionados con esta vía y para el diseño de futuras estrategias terapéuticas.

De todo lo anteriormente expuesto se puede extraer la conclusión de que la vía ubiquitin-proteasoma se halla involucrada en numerosos tipos de situaciones patológicas.

### **3.6.2.2. El complejo SCF/p45<sup>SKP2</sup> ubiquitin-ligasa**

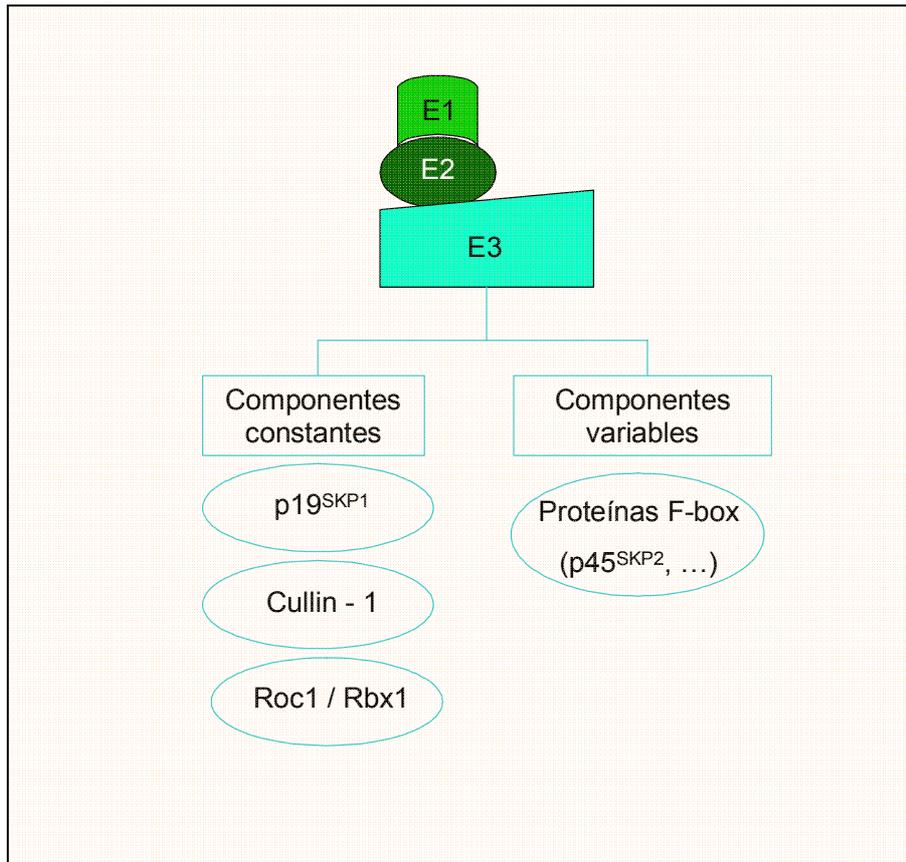
Mediante la formación de unidades ubiquitin-ligasa específicas, el complejo enzimático SCF permite la ubiquitinación y posterior proteólisis de varias proteínas reguladoras de la transición G1/S como la p27<sup>KIP1</sup>, la p21<sup>CIP1</sup>, las ciclinas de tipo D, la ciclina E, la ciclina A y los E2F (Lisztwan 1998; Yu 1998; Marti 1999; Nakayama 2001).

El complejo proteínico SKP1/CDC53/F-box (o simplemente SCF) es un complejo enzimático recientemente descrito. El complejo SCF contiene componentes constantes como la p19<sup>SKP1</sup>, la CDC53 (Cullin-1 o Cul1) y la proteína reguladora de la cullins/RING box (Roc1/Rbx1), así como componentes variables conocidos como proteínas F-box, que son las responsables de la especificidad de sustrato de la ubiquitin-ligasa (**Esquema 10**). La unión de la ubiquitin-ligasa SCF específica a su proteína sustrato permite la ubiquitinación. Normalmente, el estado de fosforilación de las proteínas diana es el que permite el reconocimiento por parte de su ubiquitin-ligasa: sólo las proteínas específicamente fosforiladas son reconocidas, ubiquitinadas y destruidas (Lisztman 1998).

La proteína F-Box p45<sup>SKP2</sup>, mediante su unión con la p19<sup>SKP1</sup>, constituye una de las ubiquitin-ligasas específicas denominada SCF/p45<sup>SKP2</sup> (Schulman 2000). La p45<sup>SKP2</sup> se expresa en la fase G1 tardía, uniéndose al complejo SCF que se encuentra localizado en el citoplasma y permitiéndolo el traslado del complejo SCF/p45<sup>SKP2</sup> al interior del núcleo, en donde promueve la ubiquitinación de las proteínas seleccionadas. Frecuentemente se ha identificado la presencia de una variante C-terminal de la p45<sup>SKP2</sup> denominada p45<sup>SKP2</sup>-CTV que se encuentra en el citoplasma de algunas líneas celulares asociada a la forma usual de la p45<sup>SKP2</sup>. El dominio C-terminal de esta variante parece contener un dominio de retención citoplasmático que es más potente que la señal de atracción nuclear. Por ello, esta variante de la p45<sup>SKP2</sup> falla en su intento de unirse a la p19<sup>SKP1</sup> para constituir el complejo y permanece anclada en el citoplasma. Debido a su deslocalización citoplasmática, es probable que la p45<sup>SKP2</sup>-CTV sea incapaz de realizar correctamente la ubiquitinación de las proteínas seleccionadas. De esto se deduce que un incremento de la producción de esta

variante reduciría la degradación de varias moléculas del ciclo celular, que consecuentemente permanecerían activas (Ganiatsas 2001).

La ciclina E y la p27<sup>KIP1</sup> son las moléculas que muestran unos cambios de concentración más marcados durante la transición de la fase G1 a la fase S, cambios regulados predominante por mecanismos post-translacionales dependientes de la vía ubiquitin-proteasoma. De hecho, existen evidencias bioquímicas y genéticas que sugieren que la SCF/p45<sup>SKP2</sup> funciona como la ubiquitin-ligasa específica de la ciclina E y la p27<sup>KIP1</sup>. De acuerdo con esto, la p45<sup>SKP2</sup> puede ser un importante factor en el control de las concentraciones de dos de los principales reguladores positivos y negativos del ciclo celular en la transición G1/S (Nakayama 2001).



**Esquema 10:** Complejo proteínico SCF (SKP1/CDC53/F-box).

### **3.6.3. La degradación de la p27<sup>KIP1</sup>**

Es evidente que la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> es necesaria, tanto en las células normales como en las tumorales, para posibilitar la entrada de una célula en reposo en la división celular y permitir la progresión del ciclo celular, sobre todo a nivel de la transición G1/S. Obviamente, la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> es indispensable en las células infectadas por virus para que éstos puedan replicar su genoma utilizando la maquinaria de la célula huésped.

Basándonos en lo anterior, es prioritario examinar cuáles son los principales mecanismos que pueden originar una disminución de la expresión de la p27<sup>KIP1</sup>. Teóricamente, en cualquier proteína existen tres niveles principales cuya alteración puede tener como consecuencia un descenso de la concentración celular de la molécula en cuestión: mutaciones en el gen codificador, fallos en la transcripción y/o translación, y por último alteraciones post-transcripcionales.

La disminución de la expresión de proteínas mediante la adquisición de mutaciones es un fenómeno común en el desarrollo de tumores humanos. No obstante, mutaciones en los genes que codifican a las CKI inactivándolas funcionalmente son raras, sobre todo en la familia CIP/KIP. Una excepción es el gen de la p16<sup>INK4a</sup> de la familia INK4 que sufre con cierta frecuencia deleciones y mutaciones en varios tipos de cánceres. El gen p27<sup>KIP1</sup> se localiza en el brazo corto del cromosoma 12, en las cercanías del 12p12-12p13.1, en donde se han descrito algunas deleciones y reordenamientos en leucemias y mesoteliomas. Se han realizado varios estudios mediante RCP en diferentes tipos de carcinomas humanos

para intentar determinar posibles mutaciones en el gen  $p27^{KIP1}$ . Aparte de polimorfismos silentes, no se detectaron mutaciones somáticas específicas en la región del gen  $p27^{KIP1}$ . Consecuentemente, y aunque se ha confirmado la reducción de los niveles de  $p27^{KIP1}$  en muchos tumores humanos, los resultados observados en la literatura revisada sugieren que las mutaciones en el gen  $p27^{KIP1}$  son excepcionales en las neoplasias humanas (Kawamata 1995; Morosetti 1995; Ponce-Castaneda 1995; Ferrando 1996; Shi 1996; Spirin 1996; Takeuchi 1998).

No hay que olvidar que la expresión de algunos genes puede estar suprimida por metilación de su región promotora (Nakatsuka 2003). Esto provoca la disminución de la expresión tanto del ARNm como de la proteína  $p27^{KIP1}$ , de forma que la metilación del ADN se correlaciona inversamente con la expresión del producto del gen  $p27^{KIP1}$  en las células normales y tumorales. Sin embargo, el rango de disminución de expresión de la  $p27^{KIP1}$  es mucho mayor en las células tumorales. Por lo tanto, estos resultados sugieren que un incremento en la metilación del ADN es un posible mecanismo de silenciamiento del gen  $p27^{KIP1}$  con cierta relevancia en la oncogénesis de algunas neoplasias. De todas formas, y aunque las alteraciones transcripcionales y translacionales en la síntesis de proteínas son un mecanismo de control más avanzado, están poco descritas en la regulación de la cantidad de  $p27^{KIP1}$  durante el ciclo celular, lo que indica que no se trata de uno de los principales mecanismos en la infrarregulación de la  $p27^{KIP1}$  (Qian 1998).

Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la degradación post-transcripcional es el sistema principal de regulación de la cantidad de  $p27^{KIP1}$  en la célula,

siendo la vía ubiquitin-proteasoma el mecanismo proteolítico fundamental (Pagano 1995).

Múltiples hechos argumentan esta suposición:

- En las células quiescentes las concentraciones de la p27<sup>KIP1</sup> son elevadas, sin observarse un incremento en su síntesis o en su ARNm. Asimismo, muestran muy poca actividad de ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup>, en comparación con las células proliferantes. Esto indica que probablemente la acumulación de p27<sup>KIP1</sup> en las células quiescentes se deba a una disminución de su ubiquitinación, lo que además concuerda con el marcado incremento en la vida media de la p27<sup>KIP1</sup> en estas células.
- Varios estudios han mostrado que las células de algunos carcinomas con baja expresión de p27<sup>KIP1</sup> muestran un incremento de la actividad de la vía ubiquitin-proteasoma y de la ubiquitin-ligasa específica de la p27<sup>KIP1</sup> (Gstaiger 2001; Hershko 2001; Kudo 2001).
- Por otro lado, la inhibición o depleción del proteasoma o la adición de mutantes de ubiquitina bloquean la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>, independientemente de su estado de fosforilación, manteniendo su concentración constante (Nguyen 1999).

La próstata, uno de los órganos más estudiados respecto a la relación entre la expresión de p27<sup>KIP1</sup> y el desarrollo de patología, ejemplifica claramente las diferentes vías de infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup>. La hiperplasia benigna prostática y el carcinoma prostático se asocian a niveles reducidos de expresión de la p27<sup>KIP1</sup>. En la hiperplasia benigna prostática hay una disminución del ARNm de la p27<sup>KIP1</sup>, lo que sugiere que la pérdida de

expresión de la p27<sup>KIP1</sup> es debida a una reducción de la transcripción. En cuanto al carcinoma prostático, los niveles de ARN mensajero (ARNm) son similares a los presentes en la próstata normal, lo que indicaría que la supresión de la p27<sup>KIP1</sup> en esta neoplasia maligna es post-transcripcional (Cordón-Cardo 1998).

En resumen, estas observaciones demuestran que la degradación post-transcripcional de la p27<sup>KIP1</sup> vía ubiquitin-proteasoma es el mecanismo más trascendente en la regulación de la expresión de la p27<sup>KIP1</sup>, tanto en las células normales como en las células transformadas.

La vía ubiquitin-proteasoma es la vía final de degradación de la proteína p27<sup>KIP1</sup>. El paso limitante de este proceso, tanto *in vitro* como *in vivo*, es la reacción de transferencia de la ubiquitina catalizada por una ubiquitin-ligasa denominada SCF/p45<sup>SKP2</sup>, que reconoce específicamente a la p27<sup>KIP1</sup> fosforilada en la Tre187 (Carrano 1999).

La fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> en la treonina 187 (Tre187), realizada principalmente por la cinasa CDK2, origina la desestabilización de la molécula y es el requisito indispensable que inicia y permite el reconocimiento específico por la SCF/p45<sup>SKP2</sup> y posterior degradación de la p27<sup>KIP1</sup> en las células (Sheaff 1997; Carrano 1999; Tsvetkov 1999). Aunque el complejo ciclina E-CDK2 es el principal inductor de la fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup>, el complejo formado por la ciclina k, codificada por el VHH-8, y la cinasa celular CDK6 es capaz de fosforilar a la p27<sup>KIP1</sup> iniciando su desestabilización (Ellis 1999). De hecho, la capacidad de la ciclina k de promover la progresión del ciclo celular en las células infectadas que expresan p27<sup>KIP1</sup> depende de la degradación de esta CKI y de la

activación consecuente de los complejos ciclina E-CDK2 celulares que en condiciones normales son inhibidos por la p27<sup>KIP1</sup>.

La ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup> por la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> posibilita su posterior degradación en el proteasoma. Múltiples evidencias han demostrado la relación entre la actividad de las CDK, la vía ubiquitin-proteasoma y la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>. De hecho, la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> se controla dualmente por la acumulación de las CDK y de las ubiquitin-ligasas SCF/p45<sup>SKP2</sup> (Carrano 1999).

Recientes estudios han identificado la existencia de unas moléculas denominadas subunidades cinasas Cdc (Cks) que parecen tener un papel importante facilitando la unión y reconocimiento entre la p27<sup>KIP1</sup> y la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> (Harper 2001). También existen otros procesos proteolíticos con menor relevancia que pueden degradar a la p27<sup>KIP1</sup>. La activación de otras cinasas (ERK) por vías de transducción de señales (vía del Ras) activadas a su vez por mitógenos, la disfunción del gen *c-myc* y los procesos de rápida proteólisis (independientes de la vía ubiquitin-proteasoma) forman parte de este grupo (Malek 2001).

Por otro lado, en modelos experimentales con ratones la proteína p38 codificada por el gen *Jab1* interactúa específicamente con la p27<sup>KIP1</sup>. La sobreexpresión de p38 en células de mamíferos causa la translocación de la p27<sup>KIP1</sup> del núcleo al citoplasma, lo que desencadena una aceleración de su degradación y la consiguiente disminución de su concentración. Por lo tanto, la p38 puede funcionar como un regulador negativo de la p27<sup>KIP1</sup> promoviendo su degradación (Tomoda 1999).

En conclusión, y partiendo del hecho de que la degradación post-transcripcional de la p27<sup>KIP1</sup> a través de la vía ubiquitin-proteasoma es el mecanismo principal de regulación de la expresión de la p27<sup>KIP1</sup> en la célula, deben valorarse los diferentes niveles que componen la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>, sobre todo la fosforilación (CDK2 o v-ciclina) y la ubiquitinación (ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> y Cks), para poder valorar en conjunto el proceso degradativo de esta CKI y las posibles consecuencias de su alteración en el desarrollo de tumores.

### **3.6.3.1. Regulación de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> por las CDK**

Los complejos ciclina E-CDK2, ciclina A-CDK2 y ciclina D-CDK6 actúan como moduladores del comportamiento de las CKI p21<sup>CIP1</sup> y p27<sup>KIP1</sup>, y también de algunos de los factores de transcripción E2F, del antígeno nuclear de reparación y replicación del ADN (PCNA) y de las proteínas p19<sup>SKP1</sup> y p45<sup>SKP2</sup>, entre otros.

La p27<sup>KIP1</sup> puede unirse a los complejos ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 y ciclina E-CDK2, siendo no obstante los efectos resultantes distintos (ver apartado 3.2.2.5.). El ensamblaje de la ciclina D y la CDK4 en respuesta a los mitógenos requiere la presencia de una CKI, normalmente la p27<sup>KIP1</sup> o bien alguna de sus compañeras CIP/KIP. Esta asociación con la p27<sup>KIP1</sup> estabiliza a los complejos ciclina D1-CDK, permitiendo que continúen siendo catalíticamente activos. En estos complejos el residuo Tre187 de la p27<sup>KIP1</sup> no suele ser fosforilado. La formación del complejo ternario ciclina D-CDK4-p27<sup>KIP1</sup> parece realizarse a expensas de la p27<sup>KIP1</sup> contenida en los complejos ciclina E-

CDK2-p27<sup>KIP1</sup> presentes en G1. Por lo tanto, la activación parcial de la CDK2 se logra gracias al secuestro de la p27<sup>KIP1</sup> por parte de los complejos ciclina D-CDK4. Posteriormente, la activación completa de la CDK2 facilitará la fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> en la Tre187, señalándola para su proteólisis mediada por la vía ubiquitin-proteasoma.

De esto se deduce que la p27<sup>KIP1</sup> puede unirse al complejo ciclina E-CDK2 tanto de un modo inhibitorio, como no inhibitorio. En el modo inhibitorio la p27<sup>KIP1</sup> transforma al complejo ciclina E-CDK2 en una enzima catalíticamente inactiva. Mientras que en el modo no inhibitorio, la p27<sup>KIP1</sup> es fosforilada en la Tre187 por la ciclina E-CDK2, que la señala para su ubiquitinación. Cómo se modula la transición entre ambos tipos de unión *in vivo* es actualmente desconocido (Krek 1998).

En condiciones normales, el aumento de la cantidad de p27<sup>KIP1</sup> conduce a la detención de la célula en la fase G1, suceso que se supera mediante un incremento de la expresión de la ciclina D o de la ciclina E. Durante la sobreexpresión de la ciclina D1, la célula se incorpora a la fase S, pero la concentración de la p27<sup>KIP1</sup> no se reduce (Blain 1997), ya que se encuentra secuestrada o almacenada en los complejos ciclina D-CDK (Sherr 1999). Durante la sobreexpresión de la ciclina E, la concentración de la p27<sup>KIP1</sup> se reduce debido a que su degradación se activa (Sheaff 1997). Por lo tanto, el complejo ciclina D-CDK es capaz de impedir la acción inhibitoria de la p27<sup>KIP1</sup> y simultáneamente mantener sus propias funciones, permitiendo así la entrada en la fase S por mecanismos no degradativos.

Todas estas observaciones sugieren que las células pueden regular la actividad de la p27<sup>KIP1</sup> en la transición G1/S mediante la combinación de dos mecanismos distintos:

secuestrándola de una manera dependiente de la ciclina D-CDK4, o bien degradándola mediante la fosforilación dependiente de la ciclina E-CDK2.

En suma, la actividad de la CDK2 es necesaria para la ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de la p27<sup>KIP1</sup>, ya que la reacción degradativa de la p27<sup>KIP1</sup> es específicamente dependiente de la fosforilación del residuo Tre187 por parte de la CDK2. De todas formas, no está claro cómo ocurre la fosforilación del residuo Tre187 de la p27<sup>KIP1</sup>. El enlace de la p27<sup>KIP1</sup> al complejo ciclina-CDK debe desenmascarar al grupo carboxilo terminal del inhibidor; o bien, debe existir un aumento de la concentración del inhibidor alrededor de la cinasa que facilite dicha fosforilación (Nguyen 1999).

### **3.6.3.2. Regulación de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> por la v-ciclina**

La expresión de la v-ciclina o ciclina k codificada por el gen ORF 72 del VHH-8 representa un nuevo medio para lograr la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>. De hecho, la fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> mediada por la v-ciclina es crítica para la progresión del ciclo celular en las células infectadas por el VHH-8. La característica más importante de la ciclina k es su capacidad de resistir la actividad inhibitoria de la p27<sup>KIP1</sup> y conseguir su degradación, para permitir así el avance del ciclo celular y la replicación del genoma del VHH-8.

En condiciones normales, el incremento de las CKI p27<sup>KIP1</sup> y p16<sup>INK4a</sup> produce un arresto de las células en G1, impidiendo la entrada de la célula en la fase S. La v-ciclina es capaz de superar la detención en G1 impuesta por los represores del crecimiento p16<sup>INK4a</sup> y

p27<sup>KIP1</sup>, substituyendo funcionalmente a las ciclinas del tipo D en la activación de las CDK6. Así, la ciclina k mediante la activación de las CDK6 endógenas suprime el arresto impuesto en G1 por la sobreexpresión de la p16<sup>INK4a</sup>, ya que los complejos ciclina k-CDK6 son resistentes a la inhibición mediada por las CKI, entre ellas la p16<sup>INK4a</sup> (ver apartados 3.3.11. y 3.4.14.1).

Sin embargo, el arresto impuesto en G1 por la p27<sup>KIP1</sup> se evita no sólo por la resistencia intrínseca del complejo ciclina k-CDK6 a esta CKI, sino también gracias a la habilidad de la ciclina k para ampliar el repertorio de sustratos que pueden ser fosforilados por la cinasa CDK6 endógena, en comparación a cuando forma complejos celulares con las ciclinas de tipo D. Gracias a esta propiedad, el complejo vírico ciclina k-CDK6 es capaz de fosforilar a la CKI p27<sup>KIP1</sup> en la Tre187, un sustrato propio de la CDK2, induciendo su degradación vía ubiquitín-proteasoma, disminuyendo su concentración y permitiendo que la célula infectada supere la transición G1/S. De esto se deduce que la célula infectada por el VHH-8 vence el freno en G1 impuesto por la p27<sup>KIP1</sup> mediante dos mecanismos: resistiendo a su acción inhibitoria y estimulando su degradación.

La reducción de los niveles de p27<sup>KIP1</sup> secundarios a la acción del complejo ciclina k-CDK6 favorece la activación de la ciclina E-CDK2, que completa la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> y posibilita la progresión del ciclo celular.

Al contrario que en los complejos ciclina D-CDK endógenos, la estabilidad del complejo ciclina k-CDK6 no está limitado por la unión a la p21<sup>CIP1</sup> o a la p27<sup>KIP1</sup>, indicando que el

holoenzima vírico, aparte de no estar antagonizado por los inhibidores CIP/KIP, tampoco requiere a una proteína CIP/KIP para su ensamblaje (Sherr 1999).

Aunque generalmente la fosforilación es la responsable de la desestabilización de la p27<sup>KIP1</sup>, es concebible que una hiperactivación de las vías de transducción de señales que accionan la inactivación de la p27<sup>KIP1</sup> pueda provocar su desestabilización y posterior degradación. Mutaciones del gen *Ras* o una expresión disregulada del *c-myc*, como consecuencia de la actividad de productos sintetizados por el VHH-8, podrían producir una activación de la ciclina E-CDK2 y la consiguiente fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup>. No obstante, aunque las alteraciones en la expresión del *c-myc* se observan con frecuencia en linfomas humanos, no se ha identificado en el linfoma primario de derrames asociado a VHH-8 (Ellis 1999).

En suma, la resistencia a la inhibición y el estímulo de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> secundarias a la presencia de la ciclina k son algunos de los sucesos críticos en la alteración del control del crecimiento celular normal inducido por el VHH-8, y que probablemente contribuyen a la oncogénesis asociada a este virus.

### **3.6.3.3. Regulación de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> por la vía ubiquitin-proteasoma: la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>**

La degradación de la p27<sup>KIP1</sup> en la fase S puede ser bloqueada, *in vivo* e *in vitro*, en los extractos que contengan ubiquitinas mutantes (ubiquitina K48R) inhibidores del proteasoma, o bien en los que las ubiquitinas o los proteasomas se encuentren

depleccionados o agotados. Estos datos confirman que la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> es claramente dependiente de la ubiquitinación y de la actividad del proteasoma, y en general, de la integridad de la vía ubiquitin-proteasoma.

Múltiples líneas investigadoras han mostrado numerosas evidencias que indican que la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> es la enzima específica y necesaria para la degradación mediada por ubiquitina de la CKI p27<sup>KIP1</sup> fosforilada (Carrano 1999):

1. La p45<sup>SKP2</sup> es esencial para la ubiquitinación *in vitro* e *in vivo* de la p27<sup>KIP1</sup> fosforilada. La p45<sup>SKP2</sup> promueve la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup> interactuando físicamente y específicamente con el extremo COOH terminal de la p27<sup>KIP1</sup>, sólo cuando la Tre187 está fosforilada.
2. La p27<sup>KIP1</sup> interactúa *in vitro* con la p45<sup>SKP2</sup>, pero no con otras proteínas F-box.
3. Anticuerpos anti-p45<sup>SKP2</sup> impiden la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup>. Asimismo, se observa un incremento en la cantidad celular de p21<sup>CIP1</sup> y ciclina D1, indicando también el papel del p45<sup>SKP2</sup> en la regulación de estas dos moléculas del ciclo celular.
4. Los extractos celulares sin p45<sup>SKP2</sup> son deficientes en la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup>; mientras que la adición de p45<sup>SKP2</sup> recombinante reconstituye la ubiquitinación dependiente de fosforilación.
5. Las células de ratones doble nulos para el gen de la p45<sup>SKP2</sup> acumulan p27<sup>KIP1</sup> en su forma Tre187-fosforilada, y esta situación es revertida por la adición de p45<sup>SKP2</sup>.

6. Su unión *in vivo* es más predominante en la fase S que en la G1, hecho que correlaciona con el momento de mayor incremento de CDK2.
7. En cultivos la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup> sólo ocurre en G1 cuando se añade p45<sup>SKP2</sup> y ciclina E-CDK2; por lo tanto, la p45<sup>SKP2</sup> y la ciclina E-CDK2 son moléculas limitantes en la ubiquitinación y degradación de la p27<sup>KIP1</sup>.

La fosforilación del residuo Tre187 desestabiliza a la p27<sup>KIP1</sup> siendo condición *sine qua non* para su identificación como sustrato específico por parte de la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> (Tsvetkov 1999). No obstante, se ha identificado la fosforilación de otros residuos distintos en la p27<sup>KIP1</sup>. De hecho, algunos estudios han observado que aproximadamente el 70% de la fosforilación total de la p27<sup>KIP1</sup> está localizada en la Serina 10 (Ser10), y que ésta es más frecuente en las células G0/G1, fases en que la p27<sup>KIP1</sup> se encuentra estable. De estas observaciones se deduce que la Ser10 parece ser la localización de fosforilación principal y la que ofrece mayor estabilidad a la p27<sup>KIP1</sup>. Este incremento de estabilidad de la p27<sup>KIP1</sup> sugiere que la desfosforilación de este residuo Ser10 puede tener un importante papel en la entrada de las células G0/G1 en el ciclo celular. Se desconoce la cinasa y fosfatasa responsables de la fosforilación y desfosforilación de la Ser10, así como cuáles son los mecanismos por los que esta fosforilación estabiliza a la p27<sup>KIP1</sup> y si ésta se encuentra relacionada con señales externas mitogénicas.

En general, el descubrimiento de la fosforilación de la Ser10 indica la posibilidad de que la estabilidad de la p27<sup>KIP1</sup> sea sujeto de una regulación dual entre la fosforilación de la Tre187, que conlleva su degradación y la fosforilación de la Ser10, que estabiliza la molécula (Ishida 2000).

Disfunciones en los distintos componentes del complejo SCF pueden conllevar alteraciones en el recambio de sus proteínas sustrato específicas, entre ellas la p27<sup>KIP1</sup>. El hecho de que la p45<sup>SKP2</sup> no sólo tenga potencial oncogénico *in vitro* sino que también esté sobreexpresado en ciertos tumores indica que su expresión disregulada puede ser el mecanismo de pérdida de los efectos supresores de tumores de la p27<sup>KIP1</sup> (Gstaiger 2001; Masuda 2002). Alteraciones estructurales en las proteínas F-box como la variante p45<sup>SKP2</sup>-CTV, que se localiza únicamente en el citoplasma y, por lo tanto, es inactiva respecto a su acción habitual sobre la p27<sup>KIP1</sup> y el resto de proteínas diana específicas a las que debe ubiquitinar. Activaciones oncogénicas del *gen Myc* o la presencia de proteínas del tipo Nedd8, que tendrían como efecto la sobreexpresión o modificación de la subunidad Cull1 del complejo SCF respectivamente, podrían producir un aumento de la degradación mediada por este complejo. Asimismo, el segundo miembro de la familia de proteínas RING box, la Rbx2, también denominada producto del gen sensible a la apoptosis (SAG), es capaz de unirse a la p45<sup>SKP2</sup>. Esto tendría como consecuencia un incremento bruto en la cantidad y probablemente en la actividad del complejo SCF/p45<sup>SKP2</sup>, como consecuencia del sumatorio de los complejos SCF constituidos por la Rbx1 -componente habitual- y los constituidos por la Rbx2.

Evidentemente, la descripción relativamente reciente de los componentes del complejo SCF sugiere la posible existencia de otras moléculas constitutivas o relacionadas no identificadas con una contribución incierta sobre la actividad del complejo y, por lo tanto, sobre la p27<sup>KIP1</sup>. Estudios adicionales serán necesarios para acabar de describir con exactitud la regulación de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> por el complejo SCF/ p45<sup>SKP2</sup>.

#### 3.6.3.4. Regulación de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> dependiente de las Cks

Ciertas CDK forman complejos con unas pequeñas proteínas de 9-18 kDa conocidas genéricamente como las subunidades cinasas Cdc (Cks), de las que se han descrito dos tipos: la Cks1 y la Cks2. Las Cks humanas son proteínas conservadas estructural y funcionalmente en los eucariotas, y se unen específicamente con las CDK1, CDK2 y CDK3 (Harper 2001).

Cuando las Cks se unen a las CDK no actúan como inhibidores o activadores en el sentido clásico, sino que parecen modular la selección o la extensión de la fosforilación del sustrato. Se desconoce exactamente cómo las Cks facilitan la fosforilación de los sustratos de las CDK. Es factible que ciertas proteínas sustrato puedan interactuar con un fosfato de unión localizado en la superficie de las Cks y, en este contexto, dichas proteínas sean fosforiladas más eficientemente por las CDK.

Estudios recientes han identificado que un miembro de este un nuevo grupo de proteínas está implicado en la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>. La Cks1, denominada también p9Cks1, parece actuar como un cofactor esencial en la ubiquitinación de la proteína CKI p27<sup>KIP1</sup> a través de la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> (**Esquema 11**), participando así en su proteolisis vía ubiquitin-proteasoma.

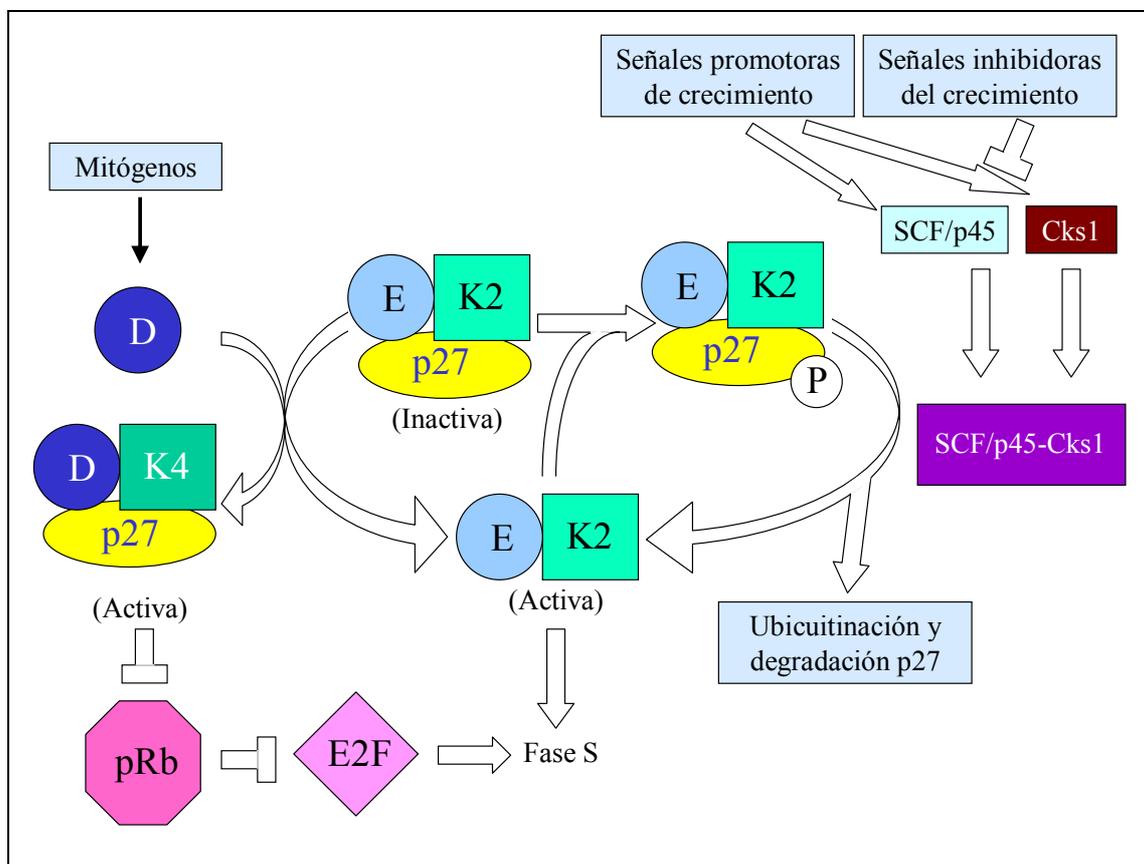
Hechos que apoyan la hipótesis de la existencia de otro cofactor en la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup> es que la p27<sup>KIP1</sup> fosforilada en la Tre187 no puede interactuar con la p45<sup>SKP2</sup> en extractos purificados que únicamente contienen p45<sup>SKP2</sup>. Asimismo, las células en

extractos sin Cks muestran una gran acumulación de p27<sup>KIP1</sup> fosforilado, lo cual sugiere que estas células son defectivas en la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup>, ya que ésta se encuentra bloqueada un paso después de la fosforilación. La adición de Cks1 recombinante al medio reconstituye la reacción, implicándola como una molécula necesaria para la ubiquitinación.

La Cks1 parece participar aumentando la interacción entre la p27<sup>KIP1</sup> fosforilada y la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>, aunque se desconoce exactamente cómo. Una posibilidad es que al unirse, la Cks promueva un cambio estructural en la p45<sup>SKP2</sup> que facilite su interacción con la p27<sup>KIP1</sup> fosforilada. Alternativamente, la Cks1 podría físicamente actuar como puente entre la p27<sup>KIP1</sup> y la p45<sup>SKP2</sup> de dos formas posibles: interactuando con la p27<sup>KIP1</sup> de una forma dependiente de fosforilación mientras simultáneamente se une a la p45<sup>SKP2</sup>; o bien, permitiendo el reconocimiento específico de la Tre187 fosforilada por la p45<sup>SKP2</sup>.

La ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup> por la SCF/p45<sup>SKP2</sup> requiere que esta se encuentre ensamblada a la ciclina E-CDK2 o a la ciclina A-CDK2; y a su vez, la asociación de la Cks es necesaria para el ensamblaje del complejo ciclina E-CDK2-p27<sup>KIP1</sup> a la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>. En estos complejos ciclina E-CDK2-p27<sup>KIP1</sup>, la Cks1 puede contactar simultáneamente con la p27<sup>KIP1</sup> y con la p45<sup>SKP2</sup>, manteniendo así a una o a ambas proteínas en la conformación apropiada para su interacción. De todas formas, son necesarios más análisis estructurales del complejo para determinar la naturaleza de estas interacciones y si la función de la Cks1 es directamente dependiente o no de la actividad de las CDK.

Estas observaciones evidencian la selectividad de la Cks1 en la promoción de la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup>. Asimismo, esta función de las Cks las relaciona directamente con las vías de control del crecimiento que regulan la transición G1/S y el desarrollo de cáncer. De igual modo que la p45<sup>SKP2</sup>, la expresión de la Cks1 está regulada por el crecimiento y su ARNm está ausente durante G1 pero presente durante la fase S. Por ello, es lógico pensar que la inactivación de la p27<sup>KIP1</sup> en el cáncer a través de la vía ubiquitin-proteasoma debe requerir no sólo la inducción de la p45<sup>SKP2</sup>, sino también la de la Cks1. También es posible que los genes de la p45<sup>SKP2</sup> y de la Cks1 se activen coordinadamente para asegurar que ambas proteínas están presentes en el momento apropiado del ciclo para catalizar la destrucción de la p27<sup>KIP1</sup>.



**Esquema 11: Integración de la Cks1 con la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> en la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> y en la vía de regulación de G1.** Las células responden a estímulos mitogénicos mediante la expresión de ciclinas de tipo D, que se ensamblan con la CDK4 a través del secuestro de la p27<sup>KIP1</sup>. Estos complejos ternarios participan en la inactivación de la pRb y en la liberación de los E2F, promoviendo la entrada en la fase S. Por otro lado, el secuestro de la p27<sup>KIP1</sup> permite una activación parcial de la ciclina E-CDK2, que a su vez, fosforila a la p27<sup>KIP1</sup> señalándola para su degradación a través de la vía ubiquitin-proteasoma. Este proceso requiere una ubiquitinación previa mediante la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> y la Cks1. La SCF/p45<sup>SKP2</sup> y la Cks1 se expresan de una forma regulada por la célula y, por lo tanto, pueden responder a las mismas señales de promoción del crecimiento. La expresión de Cks1 puede estar disminuida por vías inhibitorias del crecimiento mediadas por el TNF-β. Esto también indica que la inducción de las Cks1 puede ser un evento frecuente durante la transformación celular.

### 3.6.3.5. Otras vías de degradación de la p27<sup>KIP1</sup>

Cinasas distintas a las CDK pueden disparar también la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> en respuesta a diversas vías de señalización. Los miembros pertenecientes a la familia de las cinasas ERK activadas por mitógenos a través de la vía del *Ras* pueden estar también implicadas en la fosforilación y subsiguiente degradación de la p27<sup>KIP1</sup>. Asimismo, la inducción del *c-myc* puede generar una activación rápida de la ciclina E-CDK2 con la consiguiente fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup>. La degradación final de la p27<sup>KIP1</sup> será también a través de la vía ubiquitin-proteasoma (Steiner 1995; Kawada 1997; Malek 2001).

Algunos estudios han observado que, en paralelo con su degradación dependiente de ubiquitinación, la p27<sup>KIP1</sup> puede mostrar una degradación rápida de su extremo terminal NH<sub>2</sub>, mediante un mecanismo dependiente de ATP que muestra mayor actividad durante la fase S que durante la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. El resultado es una disminución de la masa molecular de la p27<sup>KIP1</sup> de 27 a 22 kDa. La molécula de p27<sup>KIP1</sup> de 22 kDa no posee dominio de unión a ciclina, por lo que no tiene actividad inhibidora. Este proceso es independiente de la ubiquitinación. Estos hallazgos sugieren que la p27<sup>KIP1</sup> puede eliminarse por ambos mecanismos degradativos en la progresión de la fase G<sub>1</sub> a la fase S. De todas formas, la vía ubiquitin-proteasoma sigue siendo el proceso predominante (Shirane 1999).

### 3.6.3.6. Resumen de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>

La concentración celular de la proteína p27<sup>KIP1</sup> está regulada primariamente a nivel post-transcripcional mediante el recambio de proteínas. La fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> en la

Tre187 por la CDK2 es el mecanismo de iniciación de la proteólisis de la p27<sup>KIP1</sup>, ya que permite la creación de un punto de enlace para la ubiquitin-ligasa específica SCF/p45<sup>SKP2</sup>. La ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup> por la SCF/p45<sup>SKP2</sup> conlleva su degradación a través de la vía ubiquitin-proteasoma. A su vez, los requerimientos de la p45<sup>SKP2</sup> en la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup>, junto con la necesidad de la CDK2, indica la existencia de un control de la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> por estas dos moléculas durante la progresión del ciclo celular. La reciente descripción de las Cks como cofactor adyuvante en la unión entre la p27<sup>KIP1</sup> y la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> sugiere que podría constituir un nuevo nivel de control en la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>.

En G0 o G1 temprana la p27<sup>KIP1</sup> no suele ser degradada, debido a que se encuentra secuestrada por el complejo ciclina D-CDK y a que los niveles de ciclina E-CDK2 son bajos. Tras la estimulación mitogénica, la fosforilación de la pRb y la liberación de los E2F, permite un incremento en la concentración de ciclina E-CDK2 que compite con la ciclina D-CDK por la p27<sup>KIP1</sup>, fosforilándola y causando su rápida degradación. Durante la fase S y G2, las concentraciones de p27<sup>KIP1</sup> se mantienen bajas por los altos niveles de ciclina A-CDK2 y SCF/p45<sup>SKP2</sup>.

Basándonos en lo anterior, la infrarregulación fisiológica de p27<sup>KIP1</sup> está controlada por dos mecanismos. El primero actúa en las células de la fase G1 temprana/media y parece ser independiente de la fosforilación de la Tre187 por la CDK2. El segundo actúa en las fases G1-tardía, S y G2 y parece ser dependiente de la fosforilación de la Tre187 por la CDK2 (Malek 2001).

Los niveles de la proteína p27<sup>KIP1</sup> son inferiores en las células G1 que en las células quiescentes. Igualmente, en las células quiescentes la molécula de p27<sup>KIP1</sup> es relativamente estable (vida media, 10-12 horas). Mientras que tras la estimulación mitogénica en las células G1 y S disminuye su estabilidad y también su vida media (2 horas). El incremento del recambio de la p27<sup>KIP1</sup> en las células se inicia de la fase G1 temprana/media y está mediada por la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>, pero de forma independiente a la fosforilación específica de la Tre187. El recambio de p27<sup>KIP1</sup> en esta fase es discreto, incrementándose gradualmente a medida que avanza el ciclo celular. Los puntos de fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> y/o de la p45<sup>SKP2</sup> que median su interacción en G1 no se han identificado todavía.

En las células de las fases S y G2, después de que la CDK2 sea activada por las ciclinas E y A, la fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> en la Tre187 dispara su ubiquitinación por la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>. En conclusión, estos datos implican que el inicio de la proteólisis de la p27<sup>KIP1</sup> difiere en las fases G1 y S. No obstante ambas vías coinciden, en último término, en la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> a través la vía ubiquitin-proteasoma, siendo la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> la encargada específica de la ubiquitinación de la p27<sup>KIP1</sup>.

Las dos vías proteolíticas actúan secuencialmente durante el ciclo celular para controlar la cantidad de p27<sup>KIP1</sup>. La primera vía funciona durante G1-temprana/media y se inicia a través de mitógenos. La inhibición de la p27<sup>KIP1</sup> a nivel de translación y por secuestro en los complejos ciclina D-CDK también contribuye a la infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup> en estas fases. La reducción de la p27<sup>KIP1</sup> durante la fase G1-temprana/media puede ser también estimulada por la activación del *Ras* y del *c-myc*, poniendo de relieve la habilidad

de estas proteínas para modificar las concentraciones de esta molécula. La infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup> mediante la acción concertada de estos mecanismos tiene como último resultado el inicio de la producción del complejo ciclina E-CDK2 activo, y consecuentemente el inicio de la segunda vía de recambio de la p27<sup>KIP1</sup>.

La segunda vía, dependiente de la fosforilación en la Tre187 de la p27<sup>KIP1</sup> mediada por la CDK2, opera en G1 tardía, S y G2, permitiendo que los niveles de p27<sup>KIP1</sup> se mantengan bajos durante estas fases. Una vez iniciada, esta segunda vía puede ser amplificada por un rizo de retroalimentación positivo, y de esta forma puede continuar incluso si los estímulos mitogénicos han desaparecido. Así, la inactivación de la p27<sup>KIP1</sup> iniciada en G1 pasa de ser dependiente de mitógenos a ser independiente de mitógenos, análogamente a las vías consecutivas dependientes de mitógenos e independientes de mitógenos que inactivan a la pRb durante el mismo intervalo del ciclo celular.

Estas vías que actúan secuencialmente inactivando inhibidores clave del ciclo celular pueden ser los pilares bioquímicos que limitan la transición de la dependencia a la independencia de mitógenos del ciclo celular, también denominado punto de transición G1/S. Asimismo, esto conlleva la irreversibilidad y el compromiso de las células que han entrado en la fase S de finalizar el ciclo celular.

El recambio de la p27<sup>KIP1</sup> dependiente de Tre187 es quizás el más importante para la regulación de la p27<sup>KIP1</sup> y el control normal de la división celular. No obstante, la inactivación de esta vía no produce un efecto severo o universal en la proliferación, ya que

la existencia de una vía independiente de la Tre187 que se activa durante cada fase G1 del ciclo celular permite, aunque en menor grado, la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>.

Como hemos visto en los apartados previos, la infrarregulación patológica de la p27<sup>KIP1</sup> puede ser debida a trastornos en cualquiera de las moléculas que toman parte en su proceso degradativo. El nivel más afectado hasta la fecha es la fosforilación o marcaje de la molécula de p27<sup>KIP1</sup> para su degradación, función enteramente responsable de las CDK. Sobreexpresiones de las ciclinas involucradas en este proceso por mutaciones o translocaciones pueden tener como consecuencia una eliminación patológica de la p27<sup>KIP1</sup>, favoreciendo una proliferación celular incontrolada y un incremento el riesgo de desarrollar tumoraciones.

A este respecto, la ciclina k codificada por el VHH-8 es un buen ejemplo. En las células infectadas con el VHH-8, el complejo ciclina k-CDK6 puede iniciar la degradación de la p27<sup>KIP1</sup> en la fase G1, ya que la CDK6, gracias a su unión a la ciclina k, muestra un incremento del rango de sustratos que le permite fosforilar a la p27<sup>KIP1</sup> sin necesidad de esperar a la síntesis de ciclina E, ni a su ensamblaje con la CDK2. Esto facilita la entrada en fase S y, en último término, la progresión y finalización del ciclo celular, posibilitando la replicación del genoma viral.

Aunque son menos conocidas, las disfunciones en los diferentes niveles de la vía ubiquitin-proteasoma pueden ser también responsables de una disregulación de la expresión de la p27<sup>KIP1</sup>. En este sentido, alteraciones en la actividad de la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>, ya

sean intrínsecas (variante p45<sup>SKP2</sup>-CTV inactiva) o por hiperactivación secundaria (activación del gen Myc, Nedd8, Rbx2), deben tenerse en cuenta.

Por último, debe considerarse que alteraciones en la activación de cinasas pertenecientes a diversas vías de señalización pueden producir la inactivación de la p27<sup>KIP1</sup>, como por ejemplo los miembros de la familia de las cinasas ERK activadas por mitógenos a través de la vía del *Ras*. La activación rápida de la ciclina E-CDK2 secundaria a la inducción patológica del *c-myc* puede generar también la fosforilación de la p27<sup>KIP1</sup> y su degradación. Además debe tenerse en cuenta la existencia de vías paralelas de degradación rápida no dependientes de ubiquitinación.

De todas formas, son necesarios estudios adicionales para poder determinar la presencia de alteraciones en otros niveles del proceso degradativo que puedan tener como resultado una infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup> y, en último término, el desarrollo de tumores.

#### **3.6.4. Importancia de la p27<sup>KIP1</sup> y la p45<sup>SKP2</sup> en la carcinogénesis**

La alteración de la progresión de la fase G1 a la fase S genera una entrada desenfrenada al ciclo celular, y secundariamente una proliferación incontrolada de las células, incrementando la probabilidad de desarrollar neoplasias. Por ello, perturbaciones en la transición G1/S y en cualquiera de las moléculas que la controlan son características frecuentes en las células cancerígenas. La interrupción de la función de la pRb o de la p16<sup>INK4a</sup> y la sobreexpresión de la ciclina D, ciclina E o de la CDK4, son eventos comunes en el cáncer humano.

La actividad de las CKI también se afecta en muchos tumores, indicando que estas proteínas son críticas para el control de la proliferación celular. La pérdida de los inhibidores INK4 por mutación o silenciación transcripcional es un acontecimiento frecuente durante la oncogénesis. No obstante, raramente se ha observado la pérdida completa de la función de las CIP/KIP por mutaciones. Las alteraciones en esta familia de CKI suelen ser secundarias a trastornos en sus reguladores. La inducción de la p21<sup>CIP1</sup> generalmente es secundaria a mutaciones en el gen supresor de tumores p53, mientras que la desestabilización de la p27<sup>KIP1</sup> se ha descrito recientemente y con frecuencia en muchos tipos de tumores humanos.

Teniendo esto en cuenta y partiendo de la observación de que las proteínas CIP/KIP regulan positivamente y negativamente a las cinasas dependientes de la ciclina D y E respectivamente, es lógico pensar que los niveles anormalmente bajos de p27<sup>KIP1</sup> puedan estar relacionados causalmente con proliferaciones celulares patológicas, ya que su ausencia impide la correcta formación del complejo ciclina D-CDK y el arresto de la célula cancerígena que prolifera. Debido al punto crítico del ciclo que controla (transición G1/S), la infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup> puede ser considerada como otro de los múltiples factores responsables del desarrollo y/o progresión tumoral, reflejando así la importancia de esta molécula en la carcinogénesis.

De hecho, un gran número de estudios han corroborado estas observaciones. Experimentos en ratones han demostrado que la pérdida de un alelo del gen de la p27<sup>KIP1</sup> incrementa en estos animales la sensibilidad a agentes cancerígenos, sugiriendo que la reducción de la p27<sup>KIP1</sup> predispone a la oncogénesis (Fero 1998). Asimismo se ha constatado una

disminución de la p27<sup>KIP1</sup> en varios cánceres humanos (carcinoma de mama, colon, estómago, próstata, ovario y cavidad oral, y en carcinomas no-célula pequeña de pulmón y endocrinos). Se ha demostrado que esta disminución de los niveles de la p27<sup>KIP1</sup> se correlaciona con la progresión de la enfermedad e índices de supervivencia bajos y, en definitiva, con un peor pronóstico, cualificando así a la p27<sup>KIP1</sup> como un factor pronóstico independiente en este tipo de tumores (Tan 1997).

Asimismo, parece ser que la reducción en los niveles de la p27<sup>KIP1</sup> se correlaciona fuertemente con una mayor agresividad tumoral de forma que los carcinomas más agresivos muestran generalmente una mayor infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup> (Catzavelos 1997; Loda 1997; Tsihlias 1999). Estudios comparativos de la expresión de p27<sup>KIP1</sup> en los carcinomas colorrectales primarios y en sus metástasis han mostrado una importante reducción de los niveles de expresión de p27<sup>KIP1</sup> en los focos de metástasis en comparación con sus tumores primarios. Esto sugiere que el desarrollo de metástasis podría estar facilitado por la subregulación de la expresión de la p27<sup>KIP1</sup> en las células tumorales circulantes, ya sea porque a partir de entonces adquieren propiedades de adhesión intercelular anormales, características que las capacitan para crecer en una matriz extracelular alterada, etc (Thomas 1998).

En general, todos estos antecedentes sugieren que la inactivación de la p27<sup>KIP1</sup> está asociada con una mayor agresividad y un peor pronóstico de una gran variedad de cánceres y, por lo tanto, debe considerarse un importante factor de progresión tumoral. De acuerdo con esto, los mecanismos celulares que regulan los niveles de esta CKI deben ser controlados rigurosamente.

Como ya hemos comentado previamente (ver apartado 3.6.3.), la disminución en la expresión de la p27<sup>KIP1</sup> es mayormente secundaria a una degradación post-transcripcional excesiva a través de la vía ubiquitin-proteasoma, uno de los mecanismos proteolíticos que parecen ser más trascendentes y frecuentemente identificados en el desarrollo de tumores (Pagano 1995; Carrano 1999). Consecuentemente, la disminución de los niveles de la p27<sup>KIP1</sup> pueden estar justificados, al menos en parte, por una aceleración de su degradación post-transcripcional mediada por la vía ubiquitin-proteasoma, de la que el complejo ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> es subunidad específica y limitante (Hershko 2001).

Algunos estudios enfatizan el papel central de las ubiquitin-ligasas, particularmente de la proteína F-box p45<sup>SKP2</sup>, como promotora de fase S en las células quiescentes, favoreciendo la transición de la quiescencia a la proliferación mediante la degradación de algunas de las moléculas que participan en este proceso (Sutterluty 1999; Gstaiger 2001). La progresión de las células de la quiescencia a la proliferación requiere la inducción de la activación de complejos ciclina-CDK, la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>, la inactivación de la pRb y la liberación de los E2F.

En condiciones normales, las células quiescentes muestran una elevada concentración de proteína p27<sup>KIP1</sup> estable que, junto con la pRb, parecen ser las responsables del mantenimiento de los estados de diferenciación, quiescencia y, en general, de reposo replicativo celular. Por ello, la disminución en la concentración de la p27<sup>KIP1</sup> es fundamental para abandonar este estado, y probablemente se realiza a través de un aumento en su recambio. Indirectamente, esto incrementará la concentración de la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> para posibilitar la ubiquitinación y degradación de la p27<sup>KIP1</sup>.

También hay que tener en cuenta que alteraciones en la expresión de algunos de los componentes que participan la transición quiescencia-proliferación, ya sea por activación de componentes estimuladores (p.e., ciclina D1, CDK4), o por inactivación de componentes inhibidores (p.e., p27<sup>KIP1</sup>, pRb, p16<sup>INK4a</sup>) pueden estar relacionados con una pérdida del control del crecimiento participando en el desarrollo de varias formas de cánceres humanos.

Además de en la degradación de la p27<sup>KIP1</sup>, la p45<sup>SKP2</sup> ha sido implicada en la proteólisis mediada por la vía ubiquitin-proteasoma de otras proteína reguladoras del ciclo celular, entre ellas la ciclina E y algunos E2F (Marti 1999; Nakayama 2001). Aunque la p45<sup>SKP2</sup> media el recambio tanto de reguladores positivos como negativos de la progresión del ciclo celular, su sobreexpresión parece originar siempre progresión del ciclo celular. De hecho, la p45<sup>SKP2</sup> se ha encontrado frecuentemente sobreexpresada en células transformadas de múltiples tipos tumorales (Zhang 1995). Esto podría indicar que el gen que codifica a la p45<sup>SKP2</sup> actuaría como un protooncogén transformado en tumores humanos, convirtiéndose en un nuevo factor a considerar en el intrincado proceso oncógeno (Gstaiger 2001).

El gen de la p45<sup>SKP2</sup> se ha localizado en los humanos en el cromosoma 5p13, cerca de un punto que frecuentemente se delecciona en los carcinomas de pulmón (Demetrick 1996). Esta observación sugiere que las mutaciones del gen humano de la p45<sup>SKP2</sup> son posibles y podrían contribuir a la carcinogénesis, posiblemente iniciando una sobreexpresión de la ciclina E y/o una infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup>, dos de sus principales proteína sustrato. Sin embargo, estudios realizados con ratones doble nulos para el gen de la p45<sup>SKP2</sup> no muestran una mayor predisposición al desarrollo de tumores, y la pérdida de la p45<sup>SKP2</sup> no

parece desembocar *per se* en la carcinogénesis, al contrario de lo que ocurre con la p27<sup>KIP1</sup> (Nakayama 2000).

En la mayoría de líneas celulares del cáncer humano estudiadas recientemente en las que se ha identificado una sobreexpresión de la p45<sup>SKP2</sup>, esta suele coexistir con una infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup>, describiendo la existencia de una fuerte correlación inversa y significativa entre los niveles de p45<sup>SKP2</sup> y p27<sup>KIP1</sup> (Hershko 2001; Kudo 2001). De esto se deduce que el incremento de la expresión de la p45<sup>SKP2</sup> puede ser tanto causa como consecuencia de la disminución de los niveles de la p27<sup>KIP1</sup>. Teóricamente esta situación puede producirse por diferentes mecanismos:

- Una sobreexpresión de los complejos que contienen CDK2 o CDK6, cinasas con capacidad de fosforilar a la p27<sup>KIP1</sup>, serían las responsables de una inducción excesiva de la señalización degradativa de la p27<sup>KIP1</sup> y de su posterior proteólisis vía ubiquitin-proteasoma. Consecuentemente, esto produciría un incremento secundario de los niveles de la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> (Quelle 1993; Filmus 1994; Hui 2000; Musgrove 2001).
- Una alteración intrínseca de la p45<sup>SKP2</sup> secundarias a amplificación genética o a síntesis de variantes estructurales inactivas; o bien, una activación masiva incontrolada por otras moléculas relacionadas (Nedd8, gen *Myc*, Rbx2, etc), podrían aumentar el nivel de actividad del complejo SCF/p45<sup>SKP2</sup>, produciendo una ubiquitinación masiva de proteínas específicas, entre ellas la p27<sup>KIP1</sup> (Morimoto 2000; O'Hagan 2000; Wirbelauer 2000; Duan 2001; Morimoto 2003).

El resultado de ambos mecanismos sería el mismo: una pérdida de la inhibición de los complejos ciclin-cinasa de la fase G1 y la entrada sin control en la fase S, induciendo una proliferación celular que puede ser el inicio de una tumoración.

A favor de la primera opción estaría el hecho de que la p45<sup>SKP2</sup> sólo actúa con proteínas específicas, como la p27<sup>KIP1</sup>, y únicamente si éstas se encuentran fosforiladas. Por otro lado, la sobreexpresión primaria de la SCF/p45<sup>SKP2</sup> produciría también la degradación de otras moléculas implicadas en el ciclo celular, cuyas alteraciones específicas podrían detectarse. Consecuentemente la degradación p27<sup>KIP1</sup>, mediada pero no causada por la p45<sup>SKP2</sup>, sería la propiamente relacionada con la carcinogénesis.

Igualmente, es pausable que una sobreexpresión patológica de los complejos ciclin-cinasa de las fases G1 y S sea la responsable de la entrada sin control en el ciclo celular, ya que éstas podrían encontrarse en unas concentraciones patológicas lo suficientemente elevadas y constantes como para poder acelerar el paso de la transición G1/S (Latham 1996) y, por otro lado, fosforilar moléculas -como la p27<sup>KIP1</sup>- encargadas de frenar o inhibir esa transición induciendo su degradación. Asimismo, la sobreexpresión de ciclinas es un proceso frecuentemente descrito en relación al desarrollo de cáncer.

En conclusión, una sobreexpresión de los complejos que contienen a las cinasas CDK2 o CDK6 que fosforilan a la p27<sup>KIP1</sup> podría ser la causa de la degradación excesiva vía ubiquitin-proteasoma de la p27<sup>KIP1</sup> y del consiguiente aumento de la expresión y actividad de la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>. Por tanto, y teniendo en cuenta la relación de la expresión de ambos marcadores con el desarrollo de cáncer, debe considerarse, sobre todo

a la p27<sup>KIP1</sup>, y también a la p45<sup>SKP2</sup>, como factores pronósticos tumorales en un principio relacionados.

De todas formas, es necesaria una profundización más amplia en los componentes moleculares relacionadas con la vía ubiquitin-proteasoma, y en particular con la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>. No debe descartarse la existencia de oncoproteínas o proteínas derivadas de genes supresores de tumores aún no descritas que participen en la regulación de esta u otras vías degradativas y posean también importantes consecuencias en la infrarregulación de la p27<sup>KIP1</sup> y en la carcinogénesis en general.

### **3.6.5. La p27<sup>KIP1</sup> y la p45<sup>SKP2</sup> en el SK**

Como se ha comentado previamente, el VHH-8 posee secuencias genómicas capaces de codificar moléculas similares a algunas proteínas reguladoras del ciclo celular, entre ellas la v-ciclina, un homólogo de la ciclina D de fase G1. Al igual que la ciclina D, la v-ciclina es capaz de formar complejo activo con la cinasa CDK6 humana. Este complejo, además de ejercer una acción similar a las ciclinas de tipo D y de estimular la proliferación celular a través de la fosforilación de diversas proteínas del ciclo, se caracteriza por una ampliación del rango de sustratos sobre los que puede actuar, entre los que incluye a la p27<sup>KIP1</sup>, y por la adquisición de resistencia a las actividades inhibitorias de las CKI.

La fosforilación de la CKI p27<sup>KIP1</sup> en la Tre187 por el complejo ciclina k-CDK6 conlleva el inicio de una secuencia de acontecimientos que finalizarán con la degradación de esta CKI a través de la vía ubiquitin-proteasoma. Como consecuencia de la disminución de su

concentración, la p27<sup>KIP1</sup> reducirá su actividad inhibitoria y permitirá la progresión del ciclo celular. Mediante la inactivación de la p27<sup>KIP1</sup> por fosforilación directa, la sobreexpresión del complejo vírico ciclina k-CDK6 puede desviar el bloqueo del ciclo celular inducido por la p27<sup>KIP1</sup> sobre la ciclina E-CDK2, permitiendo la transición G1/S y el avance del ciclo celular. Evidentemente, esta pérdida de inhibición del ciclo celular es patológica, puesto que está producida por una activación vírica de la CDK6. Por lo tanto, el virus del sarcoma del Kaposi (VHSK o VHH-8) ejemplifica una estrategia para desviar la inhibición del ciclo celular mediada por las CKI, a través de la codificación de una ciclina vírica homóloga a las ciclinas de tipo D (ver apartado 3.6.3.2.).

Basándonos en las observaciones anteriores, es lógico pensar que los tumores relacionados con la infección por el VHH-8 en los que consecuentemente habrá síntesis de v-ciclina estarán asociados a una disminución de la expresión de p27<sup>KIP1</sup>. La clara asociación de la infección por el VHH-8 con el SK, indica que la disminución de la expresión de p27<sup>KIP1</sup> puede ser un mecanismo oncógeno presente en el desarrollo del SK. En el sarcoma de Kaposi la disminución de la concentración de la p27<sup>KIP1</sup> sería claramente debida a un incremento de la degradación post-transcripcional secundaria a una fosforilación excesiva por parte de la CDK6 activada por la v-ciclina.

De este modo, la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup> estructural y funcionalmente normal, actuaría simplemente permitiendo la ubiquitinación de proteínas específicamente marcadas para su degradación mediante fosforilación, en este caso la p27<sup>KIP1</sup>. Como consecuencia, sería de esperar que en el SK, además de la disminución de los niveles de expresión del p27<sup>KIP1</sup>, encontráramos unos niveles de expresión aumentados de la p45<sup>SKP2</sup>, puesto que

debe hacer frente a un grado de degradación de proteínas mayor al habitual. De todas formas, son necesarios más estudios que permitan descartar trastornos en otros niveles de las vías degradativas de la p27<sup>KIP1</sup> que puedan justificar su infrarregulación.

La intensidad de expresión inmunohistoquímica de anticuerpos específicos contra la p27<sup>KIP1</sup> y la p45<sup>SKP2</sup> parece estar estrechamente correlacionada con sus niveles celulares evaluados mediante “western blotting”. Hasta donde hemos podido determinar, la expresión inmunohistoquímica de la p27<sup>KIP1</sup> y de la p45<sup>SKP2</sup> en las biopsias del SK y sus posibles alteraciones en relación con la localización, diseminación de la enfermedad (afectación cutánea y extracutánea), y con el estatus serológico del VIH-1, no han sido previamente estudiados, al menos de forma sistemática.

### 3.7. MODELO ETIOPATOGENICO DEL SK

Todos los estudios realizados *in vivo* e *in vitro* indican que el SK es un proceso iniciado y dirigido por citocinas y factores de crecimiento sintetizados por las propias células del SK y por los leucocitos acompañantes, manteniendo el crecimiento y la proliferación celular a través de una estimulación autocrina y paracrina. Evidentemente la acción concertada en la inducción, producción y secreción de estas moléculas está aparentemente mediada y controlada por el genoma del VHH-8/HVSK y en los casos asociados a SIDA también por el VIH-1.

El VHH-8 posee genes virales homólogos a los humanos que codifican varias proteínas funcionales con capacidad para transformar a la célula huésped. Estos genes virales están claramente involucrados en la patogénesis del SK. No obstante, su expresión es muy baja y casi indetectable en las lesiones iniciales del SK, cuando teóricamente deberían ser expresados en grandes cantidades en las células transformadas. Esto indica que estas moléculas oncogénicas producidas por el VHH-8 no parecen ser las detonantes iniciales en la transformación de las células endoteliales precursoras del SK. Es decir, a pesar de su enorme potencial transformante, el VHH-8 debe actuar mediante mecanismos diferentes en los distintos momentos de la evolución patogénica del SK. Asimismo, experimentos *in vitro* confirman que la adición del VHH-8 no transforma directamente a las células endoteliales humanas en células del SK, lo que apoya esta hipótesis.

Diferentes estudios han observado que la reactivación de la infección lítica del VHH-8 en líneas celulares derivadas del PEL incrementa los niveles de los genes homólogos virales.

Sin embargo, esta reactivación del VHH-8 suele ser posterior a la expresión de las citocinas y los factores de crecimiento por las células inflamatorias del huésped. En las lesiones iniciales sólo un pequeño porcentaje de las células de origen monocítico-macrofágico infectadas con el VHH-8 sufren infección lítica en los tejidos del SK, por lo que es lógico que los niveles de expresión de estos genes virales homólogos sean bajos. Estos hallazgos concuerdan con los datos clínicos y experimentales que indican que, al menos en los estadios iniciales, el SK no se comporta como un verdadero cáncer sino como una lesión proliferativa angiogénica e inflamatoria mediada por citocinas que incluso puede en ocasiones regresar.

Basándonos en estos datos se puede postular que el VHH-8/VHVK es el responsable de iniciar los sucesos que culminan en el desarrollo de las lesiones del SK (**Esquema 12**). Probablemente, en los estadios iniciales del SK el VHH-8 actúa indirectamente infectando a las células inflamatorias monocíticas circulantes y/o a las células precursoras del SK, entrando en una fase latente de infección. Aunque a bajos niveles, existe cierto grado de infección lítica en estas células infectadas con el VHH-8 presentes en los tejidos, lo que probablemente origina una respuesta inmune contra este agente infeccioso por parte de las células inflamatorias del huésped. Esto justificaría la típica presencia de un infiltrado inflamatorio mononuclear básicamente compuesto por linfocitos T CD8+, monocitos CD14+ y macrófagos CD68+, asociado a las lesiones iniciales del SK.

La activación de estas células inflamatorias genera la producción y liberación de una amplia variedad de citocinas celulares (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF, etc), factores angiogénicos y de crecimiento (VEGF, HGF, FGF- $\beta$  y PDGF). Estas moléculas

proporcionan los estímulos proliferativos necesarios para que las células endoteliales indiferenciadas precursoras se transformen en células del SK y, en último término, originen la formación de las lesiones iniciales del SK. De todas formas, aún debe determinarse cómo la infección por el VHH-8 puede producir una activación de las células T CD8+, ya que este proceso probablemente representa una de las principales vías por las que este virus puede inducir el desarrollo del SK y del resto de patologías a las que se asocia.

Asimismo las células del SK pueden *per se* producir mediadores angiogénicos (IL-8 y HGF), quemocinas y citocinas proinflamatorias (IL-6, MIP-1 $\alpha$ , ICAM-1, etc) que no sólo apoyan su propia renovación de una forma autocrina, sino que también inician fenómenos de neoangiogénesis y atracción de leucocitos, estimulando de forma paracrina la proliferación de las células vecinas.

Una serie de estímulos que incluyen los factores endocrinos, inmunológicos, microbiológicos (VIH-1 o virus adicionales desconocidos), farmacológicos y genéticos, median la activación de la infección lítica tisular del VHH-8, induciendo así la transcripción de sus genes virales. Igualmente se ha demostrado que las citocinas, secretadas por las células inflamatorias y por las propias células del SK, y también la proteína tat del VIH-1, son capaces de activar la replicación del VHH-8.

En los estadios avanzados del SK, cuando la infección se ha extendido tras la replicación del virus, el VHH-8 comienza a actuar directamente a través de la activación de su genoma. La activación del programa génico del virus está asociado con la liberación por parte de las células infectadas de varias moléculas víricas homólogas a receptores,

quemocinas, citocinas (v-IL-6, V-MIP-1 $\alpha$ , v-receptor G), y a proteínas que estimulan la proliferación celular (v-ciclina) e inhiben la apoptosis (v-bcl-2), con cierto potencial oncogénico y que son las responsables de la evolución de las lesiones del SK.

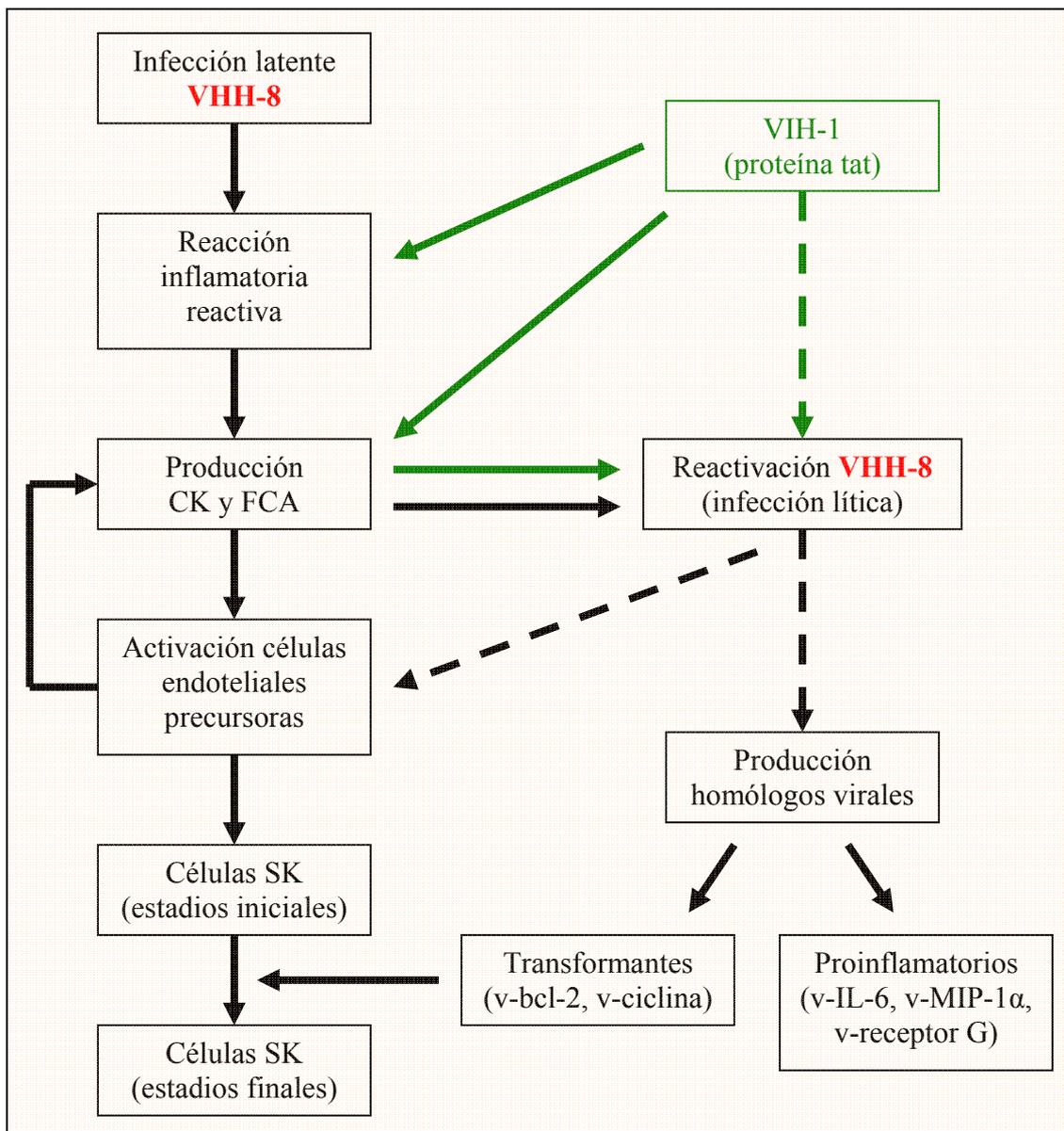
La v-ciclina o ciclina k, homóloga de la ciclina D humana, incrementa la división celular asociándose a la CDK6 endógena mediante tres mecanismos principales: estimulación de la transición del punto de restricción G1/S del ciclo celular; resistencia a la acción inhibitoria de las CKI; y eliminación de proteínas que regulan negativamente esta transición, entre ellas la p27<sup>KIP1</sup>. Y esto último conlleva a su vez el incremento de las enzimas que participan en la degradación de estas moléculas; en el caso de la p27<sup>KIP1</sup>, se produce un incremento de los componentes de la vía ubiquitin-proteasoma como la ubiquitin-ligasa SCF/p45<sup>SKP2</sup>.

En resumen, tanto las células del SK como el infiltrado inflamatorio acompañante estimulan mutuamente el crecimiento tumoral de una manera paracrina y autocrina, perpetuando en el medio los factores necesarios para que la estimulación del crecimiento se mantenga. Sin embargo, si algunos de estos factores son eliminados (p.e., reconstitución de la inmunocompetencia por la retirada de una inmunosupresión yatrogénica), la cascada de sucesos patológicos puede ser influenciada adversamente o incluso interrumpida, produciendo un retraso en el desarrollo de la enfermedad o incluso una regresión de las lesiones.

Cómo las células endoteliales infectadas adquieren un fenotipo tumoral es actualmente desconocido, pero puede ser secundario a posteriores interacciones entre las proteínas

codificadas por el VHH-8 (oncogenes virales), las citocinas y los factores de crecimiento sintetizados por el huésped y el virus. El resultado final de esta interacción virus-huésped no es únicamente la diferenciación de las células endoteliales precursoras en células del SK, sino el origen de una proliferación celular independiente.

En los pacientes con SIDA, todos estos efectos descritos se encuentran incrementados sinérgicamente en el contexto de una marcada inmunosupresión. La estimulación tumoral se encuentra aún más potenciada y amplificada por productos inductores de la proliferación y del crecimiento propios del VIH-1, como la proteína tat o la oncostatina M; y también por las citocinas y factores derivados de las células inflamatorias infectadas por el VIH-1. Estos factores podrían ser los responsables del aumento de la frecuencia y la agresividad del SK en individuos infectados con el SIDA. Por otro lado, debemos recordar que el SK también afecta a individuos VIH-1 negativos, lo que significa que el VIH-1 y sus productos no son obligatoriamente necesarios para el desarrollo del SK, como se observa en el resto de variantes clínico-epidemiológicas.



**Esquema 12:** Ilustración hipotética de la etiopatogenia del SK. (CK: citocinas; FCA: factores de crecimiento angiogénicos).