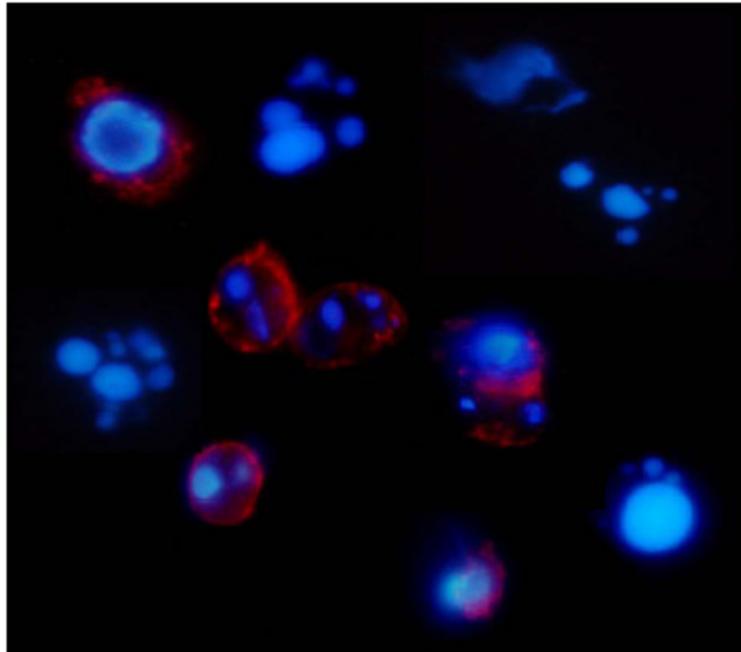


Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides



Silvia Marcé Torra

**Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los trabajos presentados en esta tesis nos han permitido conocer un poco más el linfoma de las células del manto y la leucemia linfática crónica de tipo B y interpretar algunas diferencias de comportamiento entre ambas entidades frente a distintos agentes citotóxicos. Al mismo tiempo, la interpretación de todos los resultados que explicaré a continuación sugiere la aplicación de nuevas herramientas terapéuticas a tener en consideración y su aplicación en unos u otros casos. El trabajo de esta tesis nos indica que es importante el estudio de cada caso concreto a la hora de aplicar una terapia y nos proporciona una serie de pautas a tener en cuenta. El LCM es un síndrome linfoproliferativo agresivo y altamente resistente a las terapias actuales. Son pocos los pacientes que alcanzan una remisión completa y en la mayoría de los casos el pronóstico es muy desfavorable (Argatoff LH et al, 1997; Bosch F et al, 1998). En este estudio hemos analizado el efecto citotóxico de tres fármacos utilizados en el tratamiento de otros síndromes linfoproliferativos crónicos, la fludarabina, la mitoxantrona y la mafosfamida (forma activa de la ciclofosfamida), sobre células primarias de LCM y sobre células de líneas celulares portadoras de la t(11;14)(q13;q32).

La mitoxantrona, un inhibidor de la topoisomerasa II, ejerció el mayor efecto en tres de las cuatro líneas de LCM analizadas, JVM-2 ($LD_{50} = 0.13 \pm 0.044 \mu\text{g/mL}$), REC-1 ($LD_{50} = 0.17 \pm 0.025 \mu\text{g/mL}$) y Granta 519 ($LD_{50} = 0.23 \pm 0.004 \mu\text{g/mL}$), igual que en las células primarias de los casos de LCM analizados ($LD_{50} = 0.37 \mu\text{g/mL}$, rangos 0.10-0.76 $\mu\text{g/mL}$). La LD_{50} para estos casos resultó inferior a la observada en células primarias de LLC-B (Bellosillo B et al, 1998). Los inhibidores de la enzima topoisomerasa II actúan inhibiendo la actividad de religación de la doble cadena de DNA de dicha enzima. Existen algunas líneas celulares que presentan resistencia a la mitoxantrona, independientemente del transporte y captación del fármaco (Bailly JD et al, 1997). Al mismo tiempo, bajos niveles de expresión de la topoisomerasa II también suponen un mecanismo de resistencia a los inhibidores de esta enzima (De IP et al, 1991; Rasheed ZA and Rubin EH, 2003). Según este mecanismo, la mitoxantrona induciría un efecto apoptótico en células sensibles mientras que produce una parada de ciclo en G_2/M en células resistentes. Este último fenómeno es el que observamos en el caso de la línea celular NCEB-1, que no presenta ningún efecto citotóxico cuando es incubada con los fármacos analizados, aunque se observa una parada en G_2/M (Figura 1).

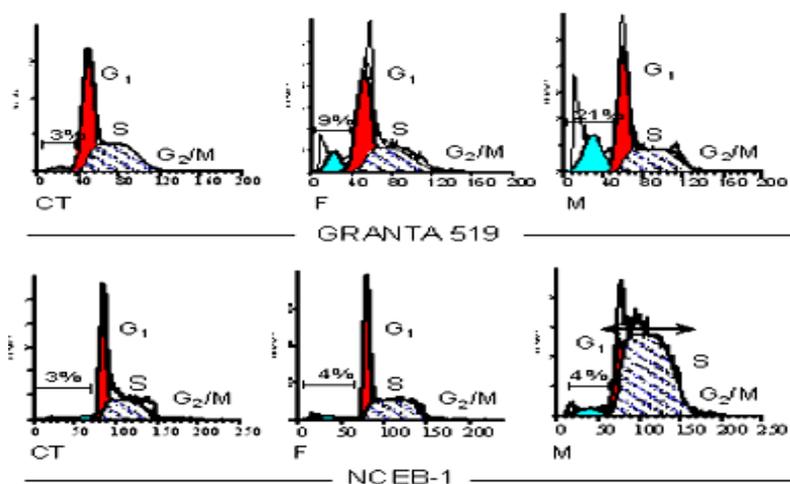


Figura 1. Efecto sobre el ciclo celular de las líneas ejercido por la fludarabina (F; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la mitoxantrona (M; 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sobre la línea celular NCEB-1, no se observó aparición del pico hipodiploide característico de la apoptosis, que sí aparecía en las otras tres líneas, pero se observó una parada en G₂/M.

Recientemente, Rosenwald *et al* (Rosenwald A et al, 2003) han descrito que la topoisomerasa II es uno de los genes relacionados con proliferación en células de LCM, y que la expresión de la topoisomerasa-II α es un factor pronóstico en el LCM (Schrader C et al, 2004). En relación a estos datos, nuestros resultados demuestran un mayor efecto citotóxico de la mitoxantrona en las líneas celulares y las células primarias de las formas blásticas, que podría estar de acuerdo con su elevado índice proliferativo respecto a las variantes típicas.

La fludarabina es un análogo de purinas que ha demostrado tener un importante efecto, sola o combinada con otros fármacos, sobre células de LLC-B y LF. Sin embargo, nuestros estudios han demostrado que son necesarias dosis muy elevadas de fludarabina (>10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para ejercer un mínimo efecto sobre células de LCM *in vitro*. Recientemente, se ha descrito un caso de LCM resistente a la fludarabina debido a un deficiente transporte de este fármaco al interior de la célula (Reiman T et al, 2002). Como ya he comentado en la introducción de esta tesis, la fludarabina, al igual que los demás análogos de purinas, debe ser transportada al interior de la célula donde será metabolizada a su forma activa para ejercer su función. En este sentido, también se ha descrito una relación directa entre la sensibilidad *in vitro* y el transporte de fludarabina en células de LLC-B (Molina-Arcas M et al, 2003).

En la actualidad, uno de los tratamientos utilizados en los síndromes linfoproliferativos se basa en la combinación de fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona (FCM). Se han observado muy buenos resultados tanto en la LLC (Bosch F et al, 2002) como en el LF. Nuestro trabajo ha demostrado que en células primarias de tres casos de LCM, la combinación de dosis farmacológicas de mitoxantrona (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y mafosfamida (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produjo un efecto aditivo, según pudimos determinar por el método de Chou and Talalay (Chou TC and Talalay P, 1984). Previamente, se había demostrado que en células de LLC-B la combinación

de fludarabina con mafosfamida producía un efecto sinérgico significativo, mientras que la adición de mitoxantrona a la combinación inducía un incremento del efecto citotóxico sólo en esos casos de LLC-B que habían sido tratados con anterioridad (Bellosillo B et al, 1999). El mecanismo del efecto aditivo entre la mitoxantrona y la mafosfamida en trastornos linfoproliferativos de tipo B puede estar relacionado con el daño al DNA producido por la mafosfamida y la imposibilidad de la maquinaria celular de reparar este daño debido a la inhibición de la topoisomerasa II, inducida por la mitoxantrona.

En el presente estudio, demostramos que estos fármacos genotóxicos inducen su efecto sobre las células de LCM mediante la activación de la vía apoptótica mitocondrial, demostrado por una disminución del potencial de membrana mitocondrial y cambios en la conformación de las proteínas de la familia de Bcl-2, Bax y Bak (Figura 2).

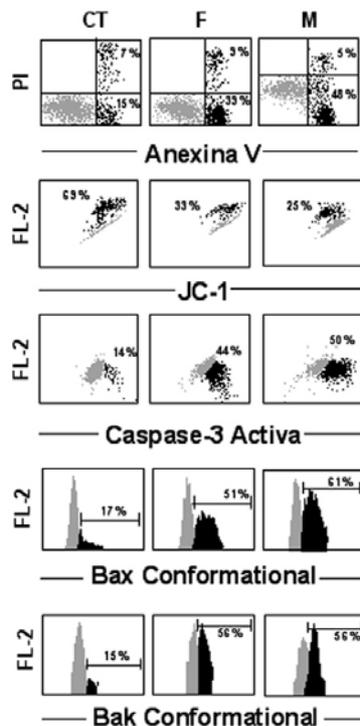
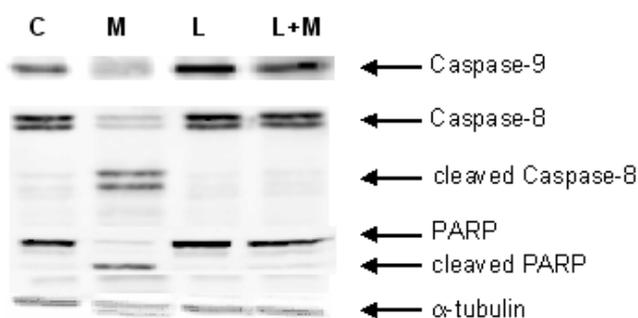


Figura 2. Activación de la maquinaria apoptótica mitocondrial. Células de LCM fueron incubadas en ausencia (CT) y presencia de fludarabina (F; 10 μ g/mL) y mitoxantrona (M; 0.25 μ g/mL) durante 24h. Pasado este tiempo se determinó la viabilidad celular, la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, la activación de la caspasa-3 y los cambios de conformación de las proteínas Bax y Bak mediante las técnicas descritas en el apartado de materiales y métodos de esta tesis. El porcentaje de células positivas para cada marcaje se indica en los paneles.

Todos estos eventos darán lugar a la salida de citocromo c de la mitocondria, la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9. También observamos activación de la caspasa-8, la cual se explica por la presencia de un *loop* de amplificación de la señal apoptótica que involucra las caspasas-9 y -3 y/o otras caspasas que actúan por encima de la mitocondria (Slee EA et al, 1999b). Este hecho se demostró incubando las células con un

inhibidor específico de la activación de la caspasa-9, Z-LEHD.fmk, observando que cuando no se producía una activación de caspasa-9, tampoco se observaba activación de la caspasa-8 (Figura 3).

Figura 3. La activación de la caspasa-9 indujo un *loop* de amplificación de la señal apoptótica que conllevaba la activación de la caspasa-8. El bloqueo de la activación de esta caspasa-9 también inhibía a la caspasa-8. La α -tubulina se usó como control de carga (C; control, M; mitoxantrona 0.25 μ g/mL), L; Z-LEHD.fmk 100 μ M).



La incubación de las células con el inhibidor general de caspasas Z-VAD.fmk, inhibía la activación de la caspasa-3 y restablecía la viabilidad celular indicando que la muerte celular inducida por estos fármacos en células de LCM es dependiente de la activación de caspasas. Tal como se había descrito anteriormente con células de LLC-B (Bellosillo B et al, 2002), el cambio de conformación de Bax y Bak era independiente de caspasas, ya que no era revertido por la incubación con Z-VAD.fmk.

Las proteínas de la familia de Bcl-2, tal y como se ha descrito, juegan un papel fundamental en el control de la apoptosis mitocondrial (Cory S et al, 2003; Cory S and Adams JM, 2002). Tanto en células primarias de LCM como en las células de las líneas celulares analizadas, cambios en las conformaciones de Bax y Bak se detectaron tras la incubación de estas con los fármacos analizados. Estos cambios de conformación se acompañaban de una disminución en los niveles de las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y Bcl-X_L. De acuerdo con esto, la disminución de Mcl-1 ya había sido descrita en células de LLC-B tras la incubación con diferentes fármacos (Bellosillo B et al, 1999), y recientemente se ha observado disminución de los niveles de Bcl-X_L tras el tratamiento de células de LCM con inhibidores de NF- κ B (Pham LV et al, 2003). La detección de altos niveles de las proteínas Bcl-2, Mcl-1 y Bcl-X_L en LNH está asociada a una mala respuesta y resistencia al tratamiento (Khoury JD et al, 2003; Zhao WL et al, 2004), lo que reafirma la disminución en los niveles de Bcl-X_L y Mcl-1 que observamos en nuestro estudio. De igual forma, también detectamos una disminución en los niveles de la proteína XIAP, un miembro de las proteínas inhibidoras de caspasas (IAP's).

NCEB-1 fue la única línea celular en la que no se observó ninguno de los efectos citotóxicos descritos, incluso cuando fue incubada con elevadas concentraciones de los fármacos genotóxicos utilizados, combinaciones de estos y períodos largos de incubación. Sin embargo, el tratamiento de las células de esta línea celular con estaurosporina (STS; 5 μ M), un inductor de apoptosis universal, indujo las características típicas del proceso apoptótico descritas a lo largo de este trabajo, lo que demostró que las células de la línea celular NCEB-1 tenían una maquinaria de apoptosis mitocondrial funcional y, por lo tanto, la no respuesta a estos fármacos genotóxicos podía explicarse por la alteración de algún miembro regulador de la familia de Bcl-2 y/o por la alteración de genes de reparación del DNA. En este último sentido, la línea celular NCEB-1 es la única línea celular que presenta un cariotipo complejo que incluye alteraciones en los genes *p53* y *ATM*, genes responsables de la detección y reparación de daños en el DNA. Estas alteraciones también han sido detectadas y descritas en algunos casos de LLC-B y LCM y se han asociado a una no respuesta al tratamiento y una corta supervivencia (Camacho E et al, 2002; Dohner H et al, 1995; Hernandez L et al, 1996). La apoptosis inducida por agentes genotóxicos va acompañada de una estabilización de la proteína p53 a través de una fosforilación vía ATM (Banin S et al, 1998; Stankovic T et al, 2004). Debido a que se cree que la citotoxicidad inducida por la mayoría de fármacos genotóxicos se trata de una apoptosis mediada por p53 y que las mutaciones de ATM suponen otro posible mecanismo de resistencia a fármacos independiente de p53, la alteración simultánea de *p53* y *ATM* explicaría la imposibilidad de las células de la línea celular NCEB-1 para entrar en apoptosis tras ser incubadas con estos agentes. De acuerdo con esta hipótesis se ha observado que fibroblastos de embriones de ratón deficientes en p53 y un ATM no funcional no entraban en apoptosis tras ser incubados con agentes contra las topoisomerasas I y II (Fedier A et al, 2003). Recientemente, y confirmando nuestros resultados, se ha descrito una línea celular derivada de un LCM con alteraciones tanto en p53 como en ATM, la cuál es completamente resistente a la muerte celular por apoptosis pero, sin embargo, es altamente sensible a la radiación *in vitro*. Contrariamente a esto, otra línea celular de LCM que presenta, únicamente, alteraciones en *p53* entra en apoptosis cuando es tratada con fármacos genotóxicos (M'kacher R et al, 2003).

Así, todos estos resultados demuestran que las células del LCM tienen una maquinaria apoptótica mitocondrial funcional y que la activación de esta maquinaria está sujeta al correcto funcionamiento de una de las dos proteínas implicadas en la detección de daño a DNA, p53 y/o ATM. Sin embargo, la alteración conjunta de estos dos genes implica la no respuesta al estímulo apoptótico genotóxico. Finalmente, estos estudios *in vitro* suponen un soporte experimental a la inclusión de la mitoxantrona en ensayos clínicos sobre el LCM.

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta que durante el desarrollo de este estudio, se demostró una relación significativa entre la sensibilidad *in vitro* a la fludarabina y los transportadores de nucleósidos de tipo equilibrativo en células de LLC-B, decidimos determinar

cuál de los transportadores de nucleósidos equilibrativos descritos participaban en la biodisponibilidad de fludarabina en células de LLC-B y LCM. Como ya he comentado anteriormente, existen cuatro tipos de transportadores equilibrativos de los cuáles, hENT1 y hENT2 son los más estudiados. Los transportadores equilibrativos realizan un transporte independiente de sodio a favor de un gradiente de concentración y presentan una amplia especificidad de sustratos aceptando tanto purinas como pirimidinas. Constituyen dos sistemas de transporte, uno sensible (*es*) a NBTI representado por hENT1 y uno insensible (*ei*) representado por hENT2. La expresión de estas proteínas es muy variable entre las diferentes células tumorales, lo que afecta a la biodisponibilidad y actividad de los fármacos sobre los diferentes tipos celulares (Damaraju VL et al, 2003; Pastor-Anglada M et al, 2004). Se ha descrito que muchas células neoplásicas humanas expresan mayoritariamente una actividad *es* (Belt JA et al, 1993) y que esta actividad está más relacionada a células con elevados índices de proliferación (Cass CE et al, 1979; Pressaco J et al, 1995). Muchos de los fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer son análogos de nucleósidos que deben ser transportados al interior de las células donde serán metabolizados para ejercer su función. El transporte de tipo equilibrativo se ha relacionado con dos de estos fármacos que son objeto de estudio en esta tesis, la fludarabina y la gemcitabina. Aunque los transportadores de nucleósidos de tipo equilibrativo, supuestamente, facilitan un transporte en ambas direcciones dependiendo del gradiente transmembrana relativo del sustrato, se ha publicado que el bloqueo de hENT1 supone una retención y aumento de la citotoxicidad inducida por cladribina en células de LLC-B (Alessi-Severini S et al, 1995) y en cultivos de linfoblastos procedentes de una leucemia humana (Wright AM et al, 2000) o, de forma alternativa, a una inhibición de la apoptosis inducida por acadesina debida a un bloqueo de la entrada de acadesina en células de LLC-B (Campas C et al, 2003). De forma similar, la unión de NBTI a los transportadores se usó para determinar los sitios de unión de tipo hENT1 en las membranas celulares y se observó una correlación con la sensibilidad a citarabina (Gati WP et al, 1997).

A pesar de la existencia de todos estos estudios, se tenían pocos datos acerca del papel que ejercía cada transportador equilibrativo en el transporte de nucleósidos debido a que no se disponía, hasta ahora, de las herramientas moleculares necesarias para ello, ni de ligandos específicos. Sin embargo, la evidencia de que el transporte de fludarabina reflejaba la citotoxicidad *ex vivo* del fármaco ($p= 0.029$) (Figura 4), nos llevó a analizar los niveles de los transportadores de tipo hENT a nivel proteico mediante la utilización de anticuerpos específicos contra las proteínas hENT1 y hENT2. En este estudio hemos observado que no existe una correlación directa entre los niveles de mRNA y los niveles de proteína de los transportadores de tipo equilibrativo (hENT), tanto para hENT1 como para hENT2 (Figura 4). Estos resultados confirman observaciones hechas previamente, en las que el acúmulo de fludarabina mediado por hENT en células de LLC-B no correlacionaba con los niveles de mRNA (Molina-Arcas M et al, 2003).

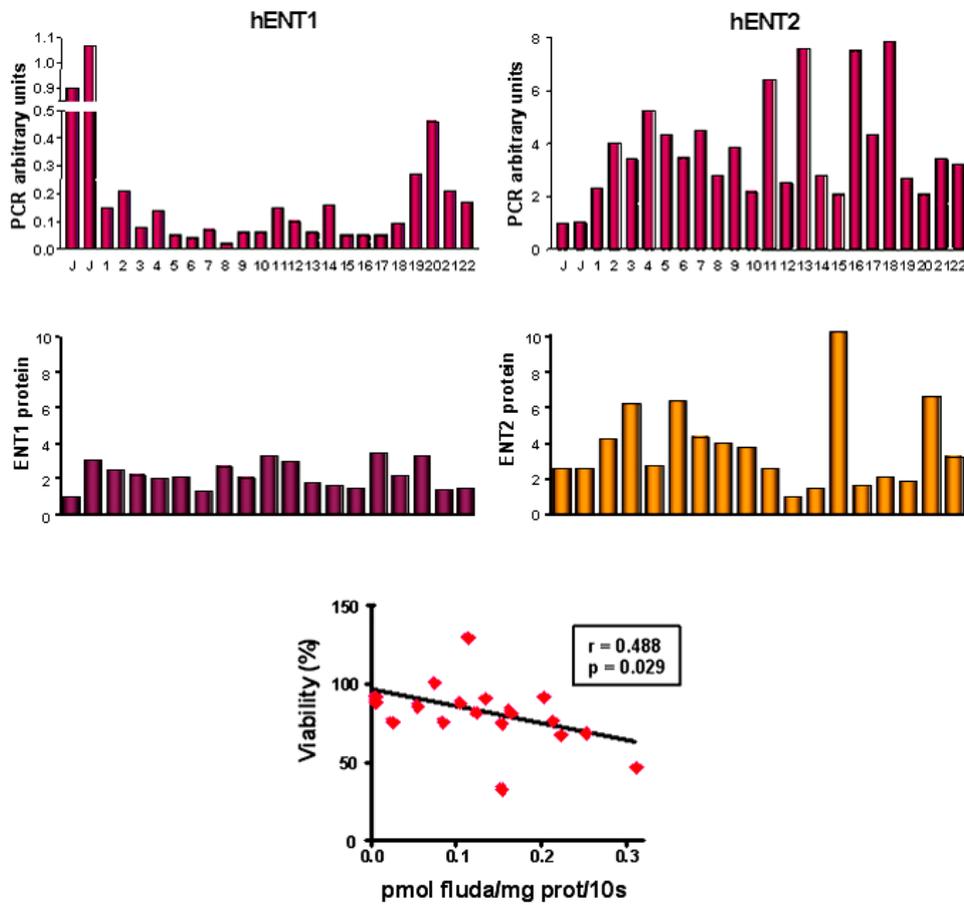


Figura 4. Representación gráfica de los niveles de mRNA y proteína de los transportadores equilibrativos de los 22 pacientes analizados, mediante RT-PCR y Western blot, respectivamente. Correlación entre el transporte de fludarabina y la citotoxicidad *ex vivo* del fármaco. El coeficiente de correlación y el valor de la p se indican en el gráfico.

Nuestros resultados nos permitieron observar que los niveles de hENT2 a nivel proteico predecían la sensibilidad *ex vivo* al fármaco, debido a que el transporte de fludarabina correlaciona de forma significativa con los niveles de proteína hENT2 ($p = 0,047$) y estos niveles de proteína, al mismo tiempo, correlacionan con la sensibilidad a distintas dosis de fludarabina testadas (3-15 μM) ($p = 0.006$) (Figura 5).

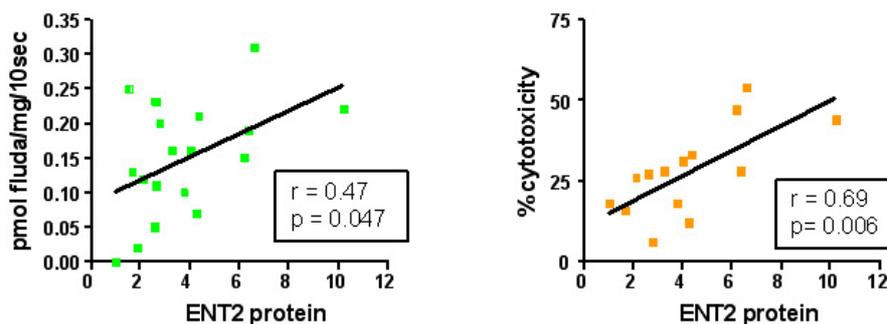


Figura 5. Estudio representativo de la correlación entre el transporte de fludarabina, su citotoxicidad ex vivo y los niveles de proteína hNET2 de los casos de células primarias de LLC-B analizados.

El efecto de la fludarabina sobre células de LLC-B viene determinado, en primera instancia, por el transporte vía hENT2, atribuyéndole importancia, por primera vez, en el efecto terapéutico de un análogo de nucleósidos. Estos resultados pueden ser útiles para predecir la respuesta de pacientes de LLC-B al tratamiento con fludarabina. Se ha descrito que el transportador hENT2 está más relacionado con células con bajas tasas de replicación, lo que confirma los niveles más altos de hENT2 en células de LLC-B que de hENT1, transportador implicado en el transporte de nucleósidos en células altamente replicativas (Cass CE et al, 1979; Pressacco J et al, 1995). En este sentido nos propusimos determinar qué tipo de transportador equilibrativo se expresaba en células primarias de LCM y en líneas celulares derivadas de LCM, las cuáles, como ya he descrito en el primer trabajo de esta tesis, responden muy poco a fludarabina y se caracterizan, a diferencia de la LLC-B, por ser células con una desregulación en la fase G_1-S del ciclo celular y presentar alteraciones en los reguladores del ciclo, sobretodo las formas blásticas, formas con elevados índices de proliferación y un comportamiento clínico agresivo (Campo E, 2003). Al mismo tiempo, hemos analizado la respuesta de estas células a la gemcitabina (2,2'-difluorodeoxicidina), otro análogo de nucleósidos que parece ser mejor sustrato para hENT1 que la fludarabina.

El análisis de los transportadores equilibrativos en células primarias y de líneas celulares de LCM demuestra que estas células expresan los dos tipos de transportadores equilibrativos analizados pero tanto los niveles de mRNA como de proteína de hENT1 son mayores en estas células (hENT1 mRNA: 0.76 ± 0.48 y hENT1 proteína: 0.15 ± 0.14 , respectivamente) que los que presentaban las células de LLC-B ($n = 22$; hENT1 mRNA: 0.13 ± 0.10 y hENT1 proteína: 0.08 ± 0.02 , respectivamente) ($p < 0.001$), mientras que estas últimas

expresaban mayores niveles de hENT2 (0.46 ± 0.01) en comparación con los niveles detectados en las células de LCM (0.26 ± 0.20) ($p < 0.001$).

Estos resultados confirman la hipótesis de que hENT1 desempeña un papel en la proliferación celular (Cass CE et al, 1979; Pressacco J et al, 1995). Del mismo modo, ya anteriormente se describió un caso de LCM con elevados niveles de mRNA de hENT1 (Reiman T et al, 2002).

A diferencia de lo que observábamos en células de LLC-B, en las que no existía correlación alguna entre la expresión de proteína y la de mRNA de los hENT's, sí observamos una correlación significativa entre los niveles de proteína hENT1 y el correspondiente mRNA en líneas celulares ($p = 0.041$) y células primarias ($p = 0.013$) de LCM (Figura 6). Este resultado favorece la visión de que hENT1 está regulado transcripcionalmente en este síndrome linfoproliferativo.

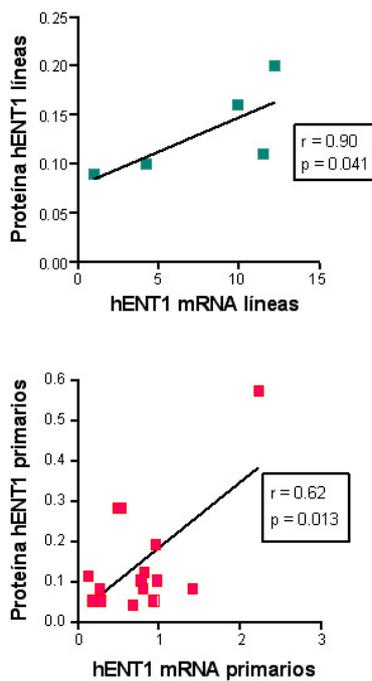


Figura 6. Valores y correlación entre los niveles de mRNA y de proteína de hENT1 tanto en líneas celulares, como en los 20 casos de células primarias analizadas. Los coeficientes de correlación y los valores de la p se representan en cada imagen.

Al mismo tiempo, la expresión de hENT1 también correlaciona con el transporte de nucleósidos cuando se ha utilizado uridina y gemcitabina como sustratos en células de LCM (Figura 7). Esta correlación, sin embargo, no se detecta cuando el sustrato analizado es fludarabina. Con todo esto, demostramos que el transporte de gemcitabina está,

exclusivamente, mediado por hENT1 lo que confiere un papel distinto a hENT1 y hENT2 en el transporte e inducción de citotoxicidad de gemcitabina y fludarabina, respectivamente.

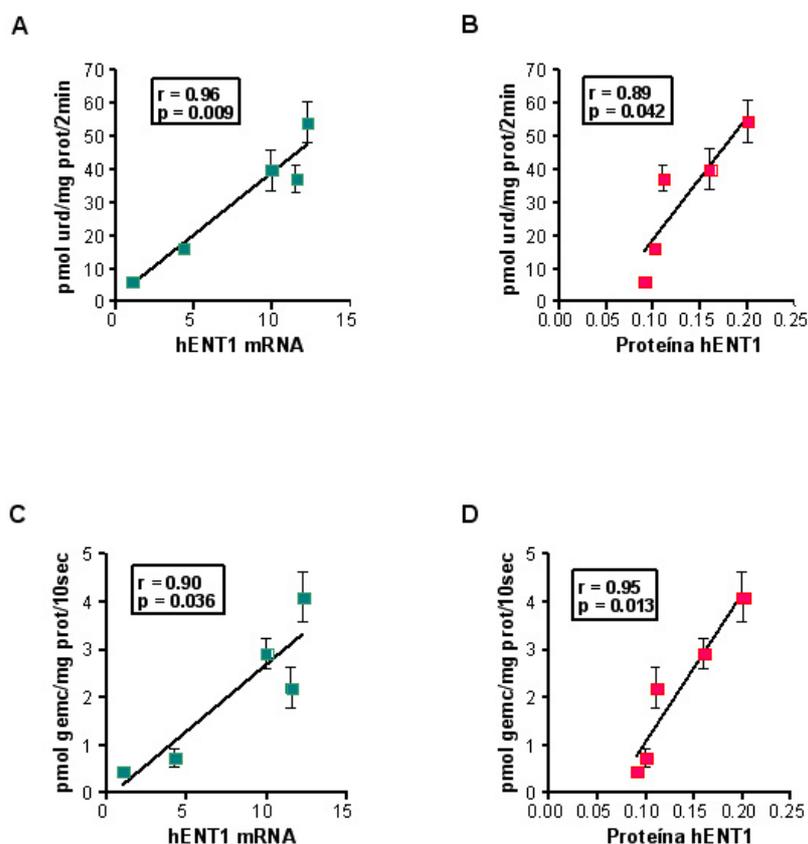


Figura 7. Correlación entre el transporte de uridina y los niveles de expresión de mRNA (A) y proteína (B) de hENT1 y los de transporte de gemcitabina (C y D). Los coeficientes de correlación y los valores de la p se expresan en las cajas.

Trabajos que demostraban que la gemcitabina actuaba como un agente genotóxico en tumores proliferativos (Gridelli C et al, 2005; Reiman T et al, 2002; Yardley DA, 2004) y que es transportada, preferentemente, por el transportador hENT1 (Mackey JR et al, 1998), junto con resultados *in vitro* e *in vivo* demostrando la falta de respuesta de células de LCM a la fludarabina nos han llevado a analizar el efecto que ejerce la gemcitabina sobre estas células. La gemcitabina es un análogo de deoxicitidina con una cinética celular más efectiva, lo que incluye una mejor incorporación intracelular, fosforilación y retención (Plunkett W et al, 1995),

es decir que la gemcitabina es metabolizada más rápida pero eliminada más lentamente que otros análogos de nucleósidos. La gemcitabina se utiliza, corrientemente, en el tratamiento de pacientes con tumores sólidos. Su mecanismo de acción va dirigido contra la síntesis de DNA (Huang P et al, 1991). En este estudio demostramos que la incubación de células de LCM con dosis farmacológicas de gemcitabina induce un efecto citotóxico en la mayoría de las células primarias y de líneas celulares analizadas, pudiendo detectar una correlación significativa entre la sensibilidad *ex vivo* a la gemcitabina, el transporte de gemcitabina mediado por hENT1 ($p=0.005$) y los niveles de expresión de hENT1 ($p=0.04$) en las líneas de LCM estudiadas (Figura 8). Sin embargo, no se observó ninguna correlación entre este transportador y la citotoxicidad ejercida por fármacos no análogos de nucleósidos como la mitoxantrona, lo que nos sugería que hENT1 era un transportador específico de estos análogos de nucleósidos.

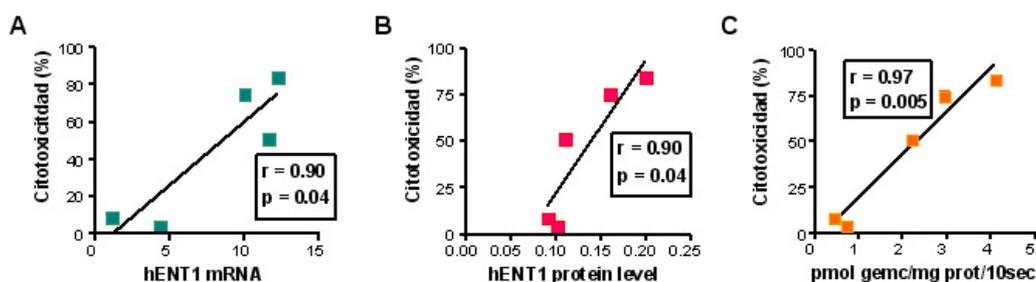


Figura 8. Correlaciones entre la citotoxicidad inducida por gemcitabina en células de las líneas celulares y los niveles de mRNA (A) y proteína (B) de hENT1 y las tasas de transporte de gemcitabina (C). En las células primarias de los 8 pacientes analizados se obtuvieron también correlaciones significativas. Los coeficientes de correlación y los valores de la p se representan en los gráficos.

Estudios previos demostraban que los elevados niveles de hENT1 era un determinante de la eficacia del acúmulo celular de varios análogos de nucleósidos. En relación a esto, se observó que la expresión de mRNA de hENT1 correlacionaba de forma inversa con la resistencia *in vitro* a ara-C en la leucemia aguda linfoblástica (LAL) (Stam RW et al, 2003) mientras que en pacientes diagnosticados de leucemia aguda mieloide (LAM), los cuales no expresan hENT1, se observaba una corta supervivencia libre de enfermedad tras tratamiento con citarabina (Galmarini CM et al, 2002b). Recientemente, también se ha observado correlación entre la expresión de hENT1 y la respuesta al tratamiento con gemcitabina como

único agente en pacientes afectos de adenocarcinoma pancreático (Spratlin J et al, 2004). La gemcitabina también induce un efecto citotóxico en la mayoría de células primarias de LCM, sin embargo también detectamos algunos casos resistentes a pesar de expresar la proteína hENT1, lo que nos sugiere que la resistencia a la gemcitabina puede involucrar otros mecanismos distintos al transporte, relacionados con la acumulación intracelular, el metabolismo del fármaco o sus dianas (Bergman AM, 2002; Clarke ML, 2002; Obata T, 2003). En relación a esto, también se ha descrito un caso de LCM que presentaba resistencia a fludarabina con deficiencia tanto en el transporte como en el acúmulo de nucleósidos, pero sin cambios en la expresión de los niveles de mRNA de los genes implicados en el transporte de análogos de nucleósidos y metabolismo, indicando que esta resistencia se daba por debajo de la transcripción de estos genes o involucraba a otros genes (Reiman T et al, 2002). Los LCM suelen presentar alteraciones en genes implicados en la reparación del DNA, como *p53* y *ATM* que, como he definido en el primer estudio de esta tesis, explicarían esta resistencia a fármacos genotóxicos. A pesar de la existencia de estos posibles mecanismos de resistencia, en este trabajo demostramos un papel importante de hENT1 en el efecto citotóxico inducido por dosis farmacológicas de gemcitabina en células primarias de LCM.

Con todo, este estudio demuestra que las células de LCM expresan elevados niveles de hENT1 en comparación con las células de LLC-B y, por lo tanto, estas células pueden ser más sensibles y beneficiarse de análogos de nucleósidos cuyo transporte se dé, principalmente, vía hENT1 como la gemcitabina en el LCM, apoyando la idea de que los transportadores de nucleósidos están implicados en la respuesta terapéutica a análogos de nucleósidos. Así, entender como funciona el transporte de análogos de nucleósidos puede mejorar las estrategias terapéuticas y el pronóstico de los pacientes de LCM.

Como ya he comentado anteriormente, el LCM responde poco a los tratamientos convencionales, por lo que se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas basadas en estas alteraciones biológicas, como son los inhibidores de proteasoma que han demostrado tener un importante efecto citotóxico *in vitro* sobre casos de LCM refractarios al tratamiento o inhibidores de mTOR entre otras (Perez-Galan P et al, 2006; Hipp S et al, 2005).

Dentro de las formas blásticas de LCM se ha descrito, en aproximadamente un 30% de los casos, la delección de 9p21 que involucra el gen *INK4a-ARF* que codifica para los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, p16 y p15, y el regulador de MDM-2, p14. Las alteraciones de p16 en el LCM se ha asociado, como ya he comentado en la introducción de esta tesis, con formas más agresivas y de mal pronóstico (Pinyol M et al, 1997). Las alteraciones de p16 promueven el paso de la fase G₁ a fase S del ciclo celular.

La metiltioadenosina fosforilasa (MTAP) es una enzima que participa en el metabolismo de las purinas y es esencial para la síntesis de recuperación de adenina y metionina. MTAP convierte la 5'-metiltioadenosina (MTA) en adenina y 5-metiltio-D-ribosa-1-fosfato (MTR-1-P). La adenina formada está condicionada a generar adenosín-monofosfato (AMP), mientras que

MTR-1-P formará metionina. La enzima MTAP se expresa en todas las células y tejidos sanos, lo que nos sugiere que esta vía de recuperación está presente en todas las células. De forma contraria, varias células malignas presentan delección de MTAP y pasan a depender, entonces, de la vía de síntesis *de novo* de AMP y el suministro exógeno de metionina, pudiendo hacer que estas células sean más sensibles a una quimioterapia con agentes bloqueantes de la vía *de novo* (Figura 9).

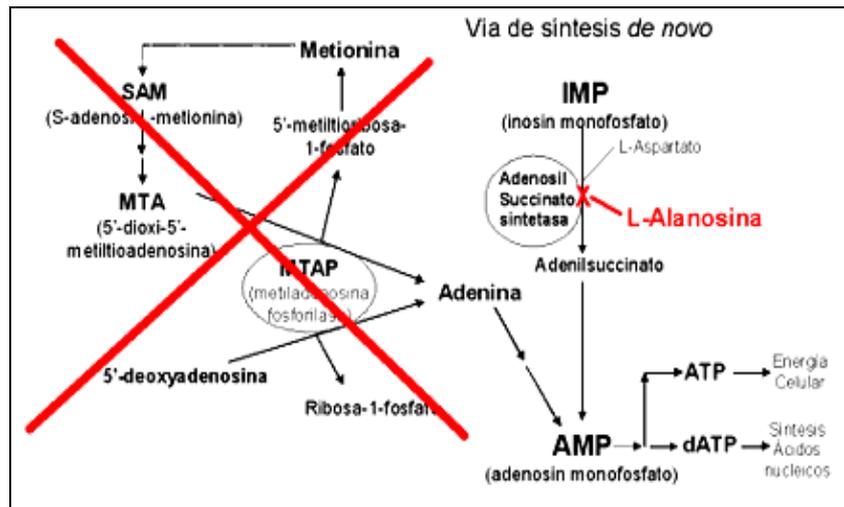


Figura 9. Esquema de las dos vías de síntesis de adenina y metionina en las células. El bloqueo de la vía *de novo* en células deficientes para MTAP puede suponer una buena estrategia terapéutica.

El gen codificante para la proteína MTAP reside en la región 9p21, a 100kb telomérico del gen $p16^{INK4}$. La codelección de $MTAP$ y $p16$ ha sido descrita en tumores sólidos, en LAL y en linfomas de bajo grado transformados a tumores de alto grado (Efferth T et al, 2002; Garcia-Castellano JM et al, 2002; Illei PB et al, 2003). Sin embargo, el estado de este gen en el LCM no había sido descrito anteriormente.

En nuestro estudio hemos demostrado que la delección de $MTAP$ es un fenómeno frecuente que se da en aproximadamente un 14% de los casos de LCM, 11% en las formas típicas y 25% en las blásticas. También observamos una muy buena correlación entre la delección de $p16$ y $MTAP$ ($p < 0.001$), con tan sólo un caso discordante que presenta delección de $MTAP$ con $p16$ no deleccionado (Tabla 1). En este caso tampoco se observa expresión de la proteína MTAP por inmunohistoquímica mientras sí detectamos expresión de $p16$ por PCR, lo que confirma la pérdida alélica del gen $MTAP$.

Resultados y discusión

Tabla 1. Detección de deleciones de los genes *p16* y *MTAP* por PCR cuantitativa en 64 casos de LCM estudiados y por inmunohistoquímica (IHQ) en 52 casos (wt: wild type; del: deleción).

Variante	PCR <i>p16</i> (n = 64)		PCR <i>MTAP</i> (n = 64)		MTAP IHQ (n = 52)	
	WT	DEL	WT	DEL	+	-
Típica	43/48 (89%)	5/48 (11%)	43/48 (89%)	5/48 (11%)	34/38 (89%)	4/38 (11%)
Blástica	13/16 (81%)	3/16 (19%)	12/16 (75%)	4/16 (25%)	10/14 (71%)	4/14 (29%)
TOTAL	56/64	8/64	55/64	9/64	44/52	8/52

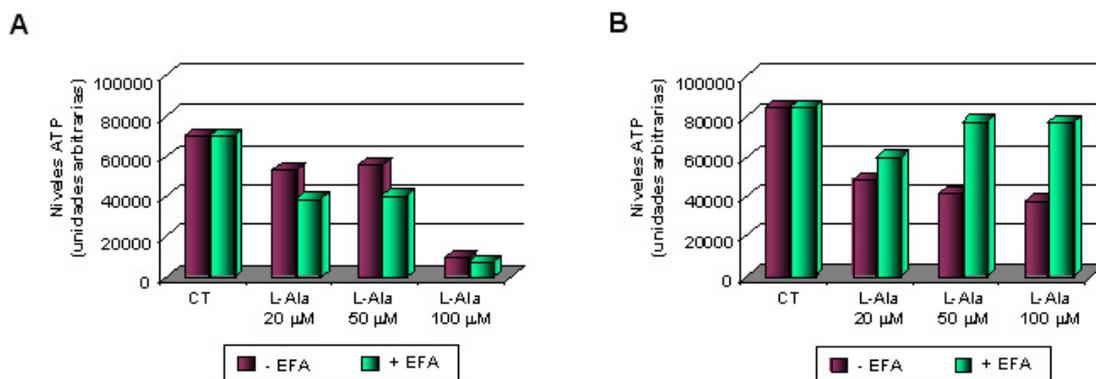
El análisis inmunohistoquímico de la expresión de la proteína MTAP demuestra una buena concordancia con el estado del gen, sugiriendo que la determinación de la expresión de *MTAP* por inmunohistoquímica puede ser una buena herramienta para el análisis de las deleciones de *MTAP* a utilizar. Tumores de casos con deleción del gen *MTAP* mostraban una pérdida de la expresión de la proteína por inmunohistoquímica en comparación con los casos positivos para *MTAP* en los que sí se detectaba marcaje. Tan sólo en un caso, el análisis genómico no demostró deleción de *MTAP*, mientras que no se detectó expresión de MTAP a nivel proteico, sugiriendo que posiblemente existen otros mecanismos de silenciamiento post-translacional de la expresión del gen *MTAP*. En este sentido, se ha hablado de posibles mecanismos de hipermetilación del promotor de *MTAP* (Hellerbrand C et al, 2005; Ishii M et al, 2005), aunque no hemos detectado hipermetilaciones en el gen *MTAP* en ninguno de nuestros casos analizados. La elevada correlación entre la deleción del gen y la proteína MTAP nos indican que esta podría ser la principal causa de pérdida de expresión de MTAP en el LCM, correlacionando con resultados previos en los que la inactivación del locus *INK4a-ARF* se da principalmente por deleciones homocigotas, mientras que las hipermetilaciones de esta región, a pesar de ser frecuentes en otros linfomas, son raras en el LCM (Hutter G et al, 2005).

Las deleciones del gen *MTAP* y las pérdidas de expresión de la proteína en esta serie de tumores de LCM se vieron asociadas a elevados índices de proliferación (Ki67 > 35%) ($p < 0.005$) y corta supervivencia de los pacientes (media de 16.1 meses) en comparación con esos tumores que sí expresaban MTAP (media de 63.6 meses). Este fenómeno probablemente se deba a la estrecha relación entre la deleción de *MTAP* y el locus *INK4a-ARF* en estos tumores, y sugiere que la detección de MTAP por inmunohistoquímica es un buen marcador para

determinar la inactivación del locus. Recientemente, diversos estudios han postulado que *MTAP* puede actuar como un gen supresor de tumores por sí mismo y que su inactivación puede contribuir a la progresión del tumor. En este sentido, la reintroducción de *MTAP* en una línea celular derivada de cáncer de mama, que presentaba delección para *MTAP*, inhibió el crecimiento celular independiente de anclaje y la tumorigénesis de la línea celular (Christopher SA et al, 2002). De forma similar, la expresión forzada de *MTAP* indujo una fuerte reducción en el potencial de invasión de una línea celular de melanoma (Behrmann I et al, 2003). Además, se había visto que la pérdida de expresión de *MTAP* está implicada en una inactivación indirecta de la vía de *STAT1* (Mowen KA et al, 2001). Todas estas observaciones nos indican que las delecciones de *MTAP* podrían participar en la progresión tumoral.

La pérdida selectiva de *MTAP* en células tumorales se puede utilizar para estrategias terapéuticas en las que se usen inhibidores de la vía de síntesis *de novo* de AMP. En este sentido se ha desarrollado la L-alanosina, un análogo de aminoácidos derivado de *Streptomyces alosinicus* que inhibe la síntesis *de novo* de AMP a partir de inosín-monofosfato (IMP). Las células deficientes en *MTAP* sólo pueden sintetizar AMP por la vía de síntesis *de novo*. La inhibición de esta vía mediante L-alanosina induce citotoxicidad de estas células por la falta de síntesis de AMP.

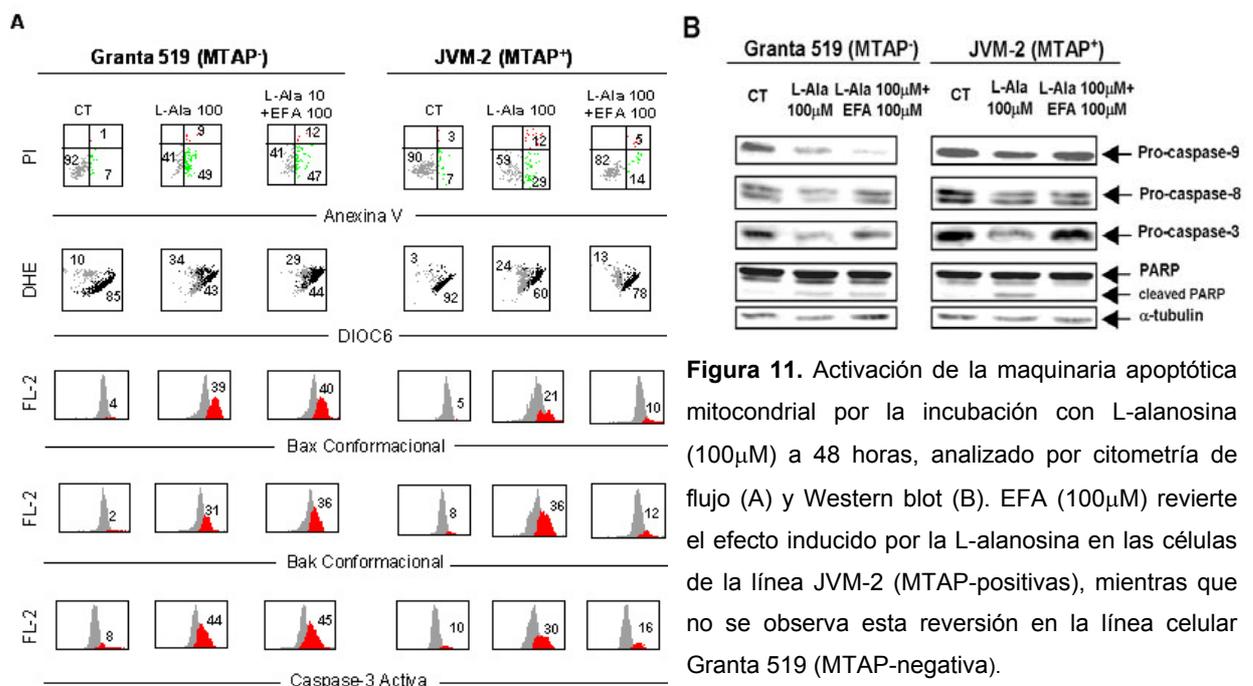
La incubación de células de LCM con o sin delección de *MTAP* con distintas dosis de L-alanosina (20-100 μ M) a tiempos relativamente cortos (24h) provoca una disminución en los niveles de ATP de la célula. Sin embargo, cuando células *MTAP*-positivas (JVM-2) son tratadas simultáneamente con el análogo de MTA, 9- β -D-eritrofuranosiladenina (EFA) a las mismas dosis, la pérdida de ATP es revertida, efecto que no se observa en células que no expresan la proteína *MTAP* (Granta 519) (Figura 10).



Resultados y discusión

Figura 10. Niveles de ATP intracelulares en células MTAP-negativas (A) y MTAP-positivas (B) tras la incubación con distintas dosis de L-alanosina (20-100 μ M) \pm EFA, durante un período de 24 horas.

Cuando la exposición a L-alanosina se estudia a tiempos más largos (48-72h), se observa una pérdida de viabilidad celular con exposición de los residuos de fosfatidilserina al exterior de la membrana plasmática de las células, acompañada de las características propias de activación de la maquinaria apoptótica mitocondrial como son pérdida del potencial de membrana mitocondrial, activación de la caspasa-3 y cambios en la conformación de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak. Por Western blot también se observa activación de las caspasas-9, -8 y -3 y proteólisis de la PARP. Todas estas activaciones y la pérdida de viabilidad celular, también son revertidas en células de la línea JVM-2 (MTAP-positiva) cuando se pre-incuban con EFA, sin embargo esta reversión no se da en células de la línea Granta 519 (MTAP-negativa) (Figura 11).



Todo ello, nos lleva a concluir que la L-alanosina es tóxica para las células de LCM pero que la administración de un sustrato de MTAP, como EFA, en combinación con la L-alanosina aumenta la selectividad del tumor al fármaco ya que EFA supone una fuente de adenina para las células MTAP-positivas y, consecuentemente, rescata estas células del efecto citotóxico de la L-alanosina (Batova A et al, 2005). Estos datos sugieren que será necesaria la coadministración del fármaco y el sustrato de MTAP (EFA) en una posible terapia *in vivo*. Resumiendo, los casos de LCM que presentan delección del gen *MTAP* y pérdida de la expresión de proteína están asociados a peor pronóstico, de modo que la determinación del estado de MTAP por inmunohistoquímica puede ser un buen marcador para detectar esos casos candidatos a una quimioterapia dirigida contra la vía de síntesis *de novo* de AMP. Nuestros resultados *in vitro* en líneas celulares de LCM sugieren que células con pérdida de MTAP pueden beneficiarse de una terapia con L-alanosina en combinación con EFA.