

# “Conocimientos esenciales de biología molecular para médicos” “Nuevos blancos terapéuticos”

Dres. Silvia Benasayag, Carlos Ponzinibbio, Benjamín Koziner,  
Daniel Fassi y Marcelo Iastrebner

Fecha de recepción: 15/10/04  
Fecha de aceptación: 3/2/05



## REVISIÓN

Resumen de la Jornada  
llevada a cabo en el salón  
Auditorio Osecac  
el 1º de Septiembre de 2004.

HEMATOLOGIA, Vol. 9 N° 1: 17-27  
Enero-Abril, 2005

## INTRODUCCIÓN

### Marcelo Iastrebner

En los últimos años, experimentos utilizando la técnica de “DNA-microarrays”, han contribuido a incrementar conocimientos moleculares tan refinados que no sólo permiten realizar nuevas clasificaciones taxonómicas de las enfermedades hematológicas sino, también, disponer de un nuevo arsenal terapéutico basado en patrones de expresión genética y nuevos fenotipos oncológicos. Como consecuencia de tal aluvión informativo, se han publicado los primeros resultados clínicos de estas “nuevas terapias” que apuntan principalmente a las vías de señalización enzimáticas intracelulares (cellular pathways) y a los mecanismos de activación y desactivación de la expresión genética (gene expression profiling).

Históricamente, las enfermedades hematológicas fueron analizadas y clasificadas sobre la base de propiedades que incluían a la clínica, morfología, marcadores de superficie celular, inmunohistoquímica y anormalidades citogenéticas. En estos tiempos, los microarrays y otras técnicas, como por ejemplo la Amplificación de Sitios Intermetilados (AIMS, PCR modificada), agregan información sobre la expresión genética y la activación de vías de señalización intracelular. Es de esperar que las nuevas estrategias terapéuticas, basadas en recientes conocimientos de genética, permitan que los nuevos tratamientos sean más selectivos que los disponibles actualmente y corrijan con mayor exactitud el defecto molecular.

Entre las drogas que principalmente modifican la transcripción celular se encuentran: los agentes hipometilantes (ej. 5-Azacitidina y 5-Deoxicitidina), oligonucleótido antisentido (ej. anti BCL2) y los inhibidores de las histonas deacetilasas (ej. Butirato, SAHA, etc.), mientras que entre las drogas que modifican principalmente el mecanismo de trasducción se mencionan a los inhibidores de la tirosin kinasa

(Imatinib), inhibidores de los proteosomas (ej. Bortezomib), inhibidores de la farnesilación (R115777, Zarnestra® y SCH66336, Sarasar®) e inhibidores kinasa dependiente de ciclinas (flavopiridol, roscovitine, etc.). Todas estas drogas tienen un mecanismo de acción diferente y muchas de ellas son sinérgicas entre sí.

A continuación, los distintos expositores describirán conceptos esenciales del ciclo celular, apoptosis y regulación de la expresión genética y, ejemplificarán dichos conocimientos refiriéndose a algunas de las drogas de aparición reciente y/o de futura aplicación.

## REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

### Silvia Benasayag

Uno de los puntos más relevantes que trae aparejado el conocimiento de la regulación del ciclo celular, radica en el hecho de poder encontrar nuevos blancos y estrategias terapéuticas. El ciclo celular o ciclo vital de la célula, es un proceso genético que normalmente involucra un período de crecimiento y replicación del ADN (Interfase: con las etapas G1, S y G2), y otro de división o segregación de los cromosomas (Mitosis: en todas las células del organismo o Meiosis: en las células germinales) para la generación de nuevas células hijas<sup>1,2</sup>.

La regulación del ciclo celular es llevada a cabo por un grupo complejo de enzimas denominadas Ciclinas Dependientes de Kinasas (CDK), que responden a estímulos mitogénicos. Para graficar la importancia de estas enzimas, imaginemos y comparemos una célula con un automóvil y a la Ciclina con el “acelerador” de dicho vehículo. Cada fase del ciclo celular posee Ciclinas específicas y, hasta el momento, se han identificado 9 CDKs de las cuales 7, participan activamente en las distintas fases del ciclo ce-

lular. La Ciclina D juega un rol muy importante en el checkpoint entre las fases G1-S llamado punto R (Punto de Restricción)<sup>3</sup>. Pasado este punto de control, las células se vuelven independientes de los estímulos mitogénicos, continuando indefectiblemente con el ciclo celular y pasando a la fase S. Luego del punto R, ya no puede volver atrás, ni salir del ciclo para detenerse en G0 (Estado de quiescencia)<sup>4</sup>, aunque fuese necesario reparar los daños del ADN y evitar transmitir mutaciones a las células hijas.

Continuando con nuestra comparación entre una célula y un vehículo, encontramos los “frenos” del ciclo celular que modulan o inhiben los CDKs y son denominados Inhibidores de las Ciclinas Kinasas (Ckis). Existen dos familias de CKis: la familia Cip/Kip y la familia INK4. Algunas proteínas de estas familias como ser la P21 y la P16 están reguladas por p53 (Gen “Guardián del Genoma”). El p53 es uno de los encargados de evaluar el nivel de alteración que se ha producido en el ADN actuando como sensor. Al encontrar un error, activa su reparación y si la alteración es demasiado grande, el p53 modula la balanza hacia la apoptosis o muerte celular programada. Si la alteración es reparable, el p53 inhibe el pasaje a S (replicación del ADN) para permitir su reparación.

Otra de las principales proteínas encargada de regular el ciclo celular, es la proteína codificada por el gen del retinoblastoma (Rb), que es un gen supresor tumoral (que también controla el pasaje de G1 a S, silenciando genes que permiten el progreso del ciclo celular, frente a una alteración [su mutación permite la aparición de cánceres, entre ellos, el mismo Retinoblastoma, cuando la segunda mutación ocurre en la retina]).

Cuando las Ciclinas cumplieron con su función son degradadas por el Sistema de Proteasomas<sup>5</sup>.

Una sola mutación en general no alcanza para dar un tumor. En la actualidad se considera que deben ocurrir alrededor de 3 mutaciones para originar un cáncer hematológico y entre 7 a 10 mutaciones sucesivas para que se origine un tumor sólido<sup>6</sup>.

Algunas de las potenciales estrategias terapéuticas para tratar el cáncer, relacionadas con la regulación del ciclo, podrían ser: inhibir la actividad de CDK, bloquear la interacción CDK/Ciclinas, restaurar la función de CDKi, prevenir la degradación de Ckis, inhibir la síntesis de Ciclinas y/o activar la degradación de Ciclinas<sup>3</sup>.

## APOPTOSIS

### Silvia Benasayag

La Apoptosis o Muerte Celular Programada es un proceso activo y altamente controlado de autodestrucción (suicidio celular). En el cuerpo humano,

aproximadamente 100.000 células son producidas cada segundo por mitosis, y un número similar de células mueren por apoptosis<sup>7</sup>. Este proceso puede darse en forma fisiológica: a) En la embriogénesis y morfogénesis (ejemplo: eliminación de membranas interdigitales, desarrollo de la retina y fusión del paladar, muerte celular masiva en estadios tempranos del desarrollo del sistema nervioso central, desarrollo del sistema reproductor, etc.). b) Durante la homeostasis de distintas poblaciones celulares como por ejemplo: el sistema inmune, donde sólo los linfocitos portadores de receptores antigénicos, con la apropiada especificidad y selectividad, son seleccionados para sobrevivir; mientras que el 75% de los precursores de las células B y el 95% de los precursores de las células T, morirán por apoptosis<sup>8,9</sup>. c) Eliminación de células superfluas, o que hayan cumplido con su función y que sean potencialmente peligrosas, por ejemplo: células con daño severo del ADN que no pueden ser reparadas apropiadamente, células autoreactivas del sistema inmune y células infectadas. En todos estos casos, las células son removidas por apoptosis.

En forma patológica se observa:

#### *Enfermedades Asociadas con la Inhibición de la Apoptosis*

- Cáncer: Linfoma folicular, carcinomas con P53 mutados, tumores hormono-dependientes (mama, próstata, ovario)
- Desórdenes Autoinmunes: Lupus, Glomerulonefritis, etc.
- Infecciones Virales: Herpes, Adenovirus, etc.

#### *Enfermedades Asociadas con un Aumento de la Apoptosis*

- HIV
- Desórdenes Neurodegenerativos: Alzheimer, Parkinson, Retinitis Pigmentosa.
- Síndromes Mielodisplásicos.
- Anemia Aplásica.
- Injurias Isquémicas crónicas.
- Toxinas hepáticas inducidas por el alcohol.
- Cirrosis.

Hay diferentes formas de inducir a una célula a morir. Por un lado, un camino es estimular los receptores de la muerte, como sucede por ejemplo, a través del Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ) o FAS L y su receptor el FAS R, en donde, el gen p53 regula la expresión de al menos dos tipos de este receptor de muerte: FAS/APO 1 y DR5 y, una vez activados estos receptores, se desencadena la cascada de las caspasas (Familia de Cisteína proteasas que hidrolizan a su sustrato, junto a un residuo de ácido aspártico) produciendo la apoptosis. Otro camino de inducción de la apoptosis se produce como conse-

cuencia de la alteración de la membrana mitocondrial, liberación de citocromo C, activación final de caspasas y formación del apoptosoma.

Las proteínas codificadas por los genes BAX y BCL2 se encuentran en la membrana mitocondrial reguladas también por el p53. Además, en la misma membrana, otras proteínas pertenecientes a la familia BCL-2: como BAX y BAK están involucradas en este proceso y serían potenciales blancos terapéuticos<sup>10,3</sup>.

Se estima que el 50% de los cánceres tienen el p53 mutado y el 80% de ellos poseen mutaciones en las ciclinas<sup>11</sup>. Suele observarse inhibición de la apoptosis, aumento de la expresión de bcl2 y una suma de alteraciones que se potencian y permiten que proliferen células malignas. Existen alrededor de 450 mutaciones con cambios de secuencias diferentes en el gen p53<sup>12</sup>. Las mismas, difieren en la naturaleza química y en la posición dentro del gen. Algunas de estas mutaciones son particulares de algún tipo de tumor y con un origen geográfico específico. El rol del p53 es integrar las señales que detecten un daño en el ADN durante G1 y G2; y, dicha función lo logra interactuando con más de 60 genes<sup>13</sup>. Si el daño del ADN es significativo, en condiciones normales, induce apoptosis removiendo a la célula dañada. La pérdida de p53 conduce a la acumulación de mutaciones que serán transmitidas a las nuevas células hijas permitiendo, de esta manera, la proliferación de una célula transformada en neoplásica. Además, es muy importante recalcar que si el p53 está mutado y no cumple con su función de supresor tumoral, muchas terapias oncológicas (quimio y/o radioterapia) se verían afectadas<sup>11</sup>. Observando el estudio citogenético molecular de una neoplasia, se puede inferir si existe compromiso en el gen supresor p53, sabiendo que éste se localiza en el cromosoma 17p13, en el oncogén bcl-2 situado en el cromosoma 18q21.3 y/o en el gen de la ciclina D1 (sinónimo de bcl-1) ubicado en el cromosoma 11q13<sup>14</sup>. Es de suma relevancia tener presente que, frente a una alteración citogenética inesperada, un nuevo desafío es reconocer los genes involucrados y su posible intervención en la leucemogénesis.

Otro tipo de muerte celular es la **necrosis**, proceso altamente descontrolado sin gasto energético que afecta al entorno celular y tiene marcadas diferencias con la apoptosis.

## MECANISMOS DE LA REGULACIÓN GÉNICA E IMPORTANCIA DE LA METILACIÓN

### Silvia Benasayag

La Genética es el estudio de los genes y sus efectos. El Genoma es la totalidad de los genes que po-

see un individuo. En la actualidad, se introdujo un nuevo concepto "Genómica" que es la interacción de esos genes entre sí. La información genética está codificada en el ADN. Esta información se replica con cada célula y es utilizada por ella para su funcionamiento. La información contenida en el ADN es transferida al ARN en un proceso llamado "Transcripción". Este es el proceso de síntesis de ARN utilizando ADN como molde. El "Splicing" implica el procesamiento del ARN, eliminación de los intrones y elaboración de ARN mensajero sólo con los exones. La "Traducción" es la transmisión de la información genética del ARN mensajero a proteína. La hipótesis "un gen, una enzima" de Beadle y Tatum ha sido modificada a "un gen, un polipéptido" dado que muchas proteínas (como por ejemplo la hemoglobina) están formadas por más de un polipéptido.

Los genes están distribuidos en los cromosomas, pero ciertos cromosomas poseen relativamente más genes que otros. Si bien todos los tejidos del cuerpo poseen la misma información genética, cada tejido se comporta de manera distinta. De los 35.000 genes que conforman el genoma están "prendidos" en cada célula aproximadamente 10.000<sup>15</sup>. La pregunta que cabe formularse es: ¿Cómo se prenden y apagan estos genes?. La respuesta la obtenemos a través de los **mecanismos de regulación de la expresión genética**: Metilación, Acetilación, Fosforilación y Splicing Alternativo, entre otros. Estos mecanismos consisten en procesos muy complejos en donde actúan cientos de genes y cuya finalidad, es darle a cada órgano su propia especificidad.

La Metilación es un mecanismo de silenciamiento de genes y, desde el punto de vista molecular, consiste en la adición de un grupo metilo en las "islas CpG" en el promotor del gen a ser "apagado" (silenciado). Las funciones fisiológicas de la metilación son: a) Regulación de genes tejido específicos (Ejemplo: los genes de la Insulina que en el corazón están "apagado" y en el páncreas "prendidos"). b) Compensación de dosis de genes como sucede en las mujeres (Hipótesis de Lyon), de los 2 cromosomas X (46,XX) en situación normal, sólo 1 de ellos está "prendido", y el X restante, inactivado por metilación (Heterocromatinización del X). c) "Imprinting", éste es la expresión diferencial de genes según provengan de un progenitor u otro y conlleva a un patrón distinto de metilación.

La Acetilación, otro mecanismo de regulación de la expresión génica, permite remodelar la cromatina. Las Histonas junto con la doble hebra de ADN forman el Nucleosoma, ellas son proteínas con alta carga positiva mientras que, el ADN es fuertemente negativo. La Acetilación decrece la carga positiva de las Histonas reemplazando el NH<sub>3</sub><sup>+</sup> terminal de las

lisinas H3 y H4. La neutralización de cargas positivas reduce las fuerzas de unión entre las mismas y el ADN, permitiendo que este último se desenrolle y sea más accesible a la entrada de proteínas responsables de la maquinaria de transcripción (ARN polimerasa II + aproximadamente 100 proteínas más)<sup>16</sup>. La proteína principal responsable de la acetilación es la HAT (Histona Acetil Transferasa) y la proteína que compacta el ADN impidiendo su transcripción es la HDAC (Histona Deacetilasa). En especial, en las leucemias, el estudio y mejor comprensión de la interacción HAT y HDAC, ha permitido diseñar nuevas estrategias terapéuticas, como por ejemplo en la LMA M3, en donde los blastos se diferencian y maduran en respuesta al ATRA. Recientemente, se ha descrito que el ATRA sólo actúa si los genes implicados en la translocación son PML/RAR alfa, cuya típica translocación es la t(15;17)(q21;q12)<sup>17</sup>. Si la alteración ocurre a nivel del híbrido PLZF/RAR, t(11;17)(q23;q12) o en el gen NPM descrito en 5q31, el ATRA no va a tener efecto en remodelar la cromatina y producir un cambio conformacional que permita que ingrese HAT. Cuando el rearreglo hallado es PLZF/RAR, la manera de desbloquear y permitir su expresión es sumando al ATRA un inhibidor de HDAC<sup>18</sup>. En síntesis, Acetilación y Metilación juegan un rol **sinérgico** en la transcripción.

Las islas "CpG" metiladas, reclutan la proteína MECP2 y ésta a su vez hace lo mismo con el complejo HDAC, manteniendo la cromatina compactada (Heterocromatina) y a los genes "apagados". En cáncer, muchos genes supresores tumorales contienen islas CpG en sus promotores, estas islas son pasibles de ser metiladas y reprimidas para evitar tumorigénesis.

Los inhibidores de HDAC pueden ser utilizados para reactivar genes supresores tumorales y factores de transcripción. Existen muchas vías de traducción de señales, una de las más importantes es la vía RAS/MAP kinasa. Uno de los blancos terapéuticos es inhibir la farnesilación (el agregado post-traduccional de un grupo farnesilo al RAS) e impedir su unión a la membrana<sup>19</sup>. Se evita de esta manera, la posterior cascada de eventos.

Por último, al haber alrededor de 100.000 proteínas y solo 30.000 genes, el splicing alternativo, juega un rol importante en eucariotas, así como se demostró en virus y otros organismos inferiores. Los ejemplos típicos son el Síndrome de Distrofia Muscular de Duchenne y el Síndrome de Becker, ambas patologías son producidas por una delección del gen de la Distrofina y como consecuencia de tal situación, se genera una proteína anómala que, según los exones que se pierdan, tendrá una expresión fenotípica diferente.

**Silvia Benasayag**  
benasayag@ceg.com.ar

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ford HL, Pardee ABCancer and the Cell Cycle. 1999. *J Cell Biochem Suppl* 32-33: 166-72.
2. Bock et al. 2001. The Cell Cycle and Development. *New York: Wiley*. 259p.
3. T. Sandal. Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist* (2002) ,7: 73-81
4. Malumbres, M.; Baebacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer* (2001);1,222-231
5. Cayrol C, Ducommun B. Interaction with cyclin-dependent kinases and PCNA modulates proteasome-dependent degradation of p21. *Oncogene*. 1998 Nov 12;17(19):2437-44.
6. Paolo Vineis. Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective. *Carcinogenesis*, (January 2003) Vol 24 Nº 1.: 1-6
7. Vaux & Kosmeyer. Cell death in development (1999). *Cell*; 96: 245-254
8. Osmond D. G., N. Kim, R. Manoukjan, R. A. Philips, S. A. Rico-Vargas, and K. Jacobsen. (1992). Dynamics and localization of early B-lymphocyte precursor cells (pro-B cells) in the bone marrow of scid mice. *Blood* 79, 1695-1703.
9. Surh C. D. and J. Sprent. In situ detection of T-cell apoptosis during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, (1994) pp 100-103.
10. www.celldeath-apoptosis.org (consulta , agosto 2004)
11. The Role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. A.V. Gudkov and E. Komarova. *Nature Review/Cancer*. Volume 3(Feb.2003),117-129
12. <http://www-p53.iarc.fr> Mutation Database, July 2004 (consulta agosto 2004)
13. Apoptosis like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. W.C. Burhans; M. Weinberger; M.A. Marchetti; L. Ramachandran; G D 'Urso; J.A. Huberman. *Review. Mutation Research* 532 (2003) 227-243
14. Sverre Heim, Felix Mitelman. *Cancer Cytogenetics* 2nd Edition. Wiley-Liss, 1995.
15. www.rett.es/docweb/rettprep/slides (consulta julio 2004)
16. www. hhami. Ucla.edu. Eddy De Robertis, 201, February, 2003
17. Francesco Lo Coco, Daniela Diverio, Brunangelo Falini, Andrea Biondi, Clara Nervi, and Pier Giuseppe Pelicci Genetic Diagnosis and Molecular Monitoring in the Management of Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood*, Vol 94, Nº 1, July 1, 1999, pp12-22
18. Redner, Wang, and Liu. Chromatin Remodeling and Leukemia: New Therapeutic Paradigms. *Blood*, (Jul 1999), 94:417-428.
19. Owen Goldring. Therapeutics: a glimpse of the future, (March 1998) *Naturejobs* 392, 420

## INHIBIDORES DE PROTEASOMAS

**Carlos Ponzinibbio**

### 1. Introducción

El tráfico y actividad intracelular de proteínas constituye uno de los mecanismos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular y en definitiva, del individuo en su totalidad.

En las células eucariotas la proteólisis dirigida es un mecanismo de control de la actividad de proteínas intracelulares. Este papel central es desempeñado por el sistema ubiquitina-proteasoma. En condiciones normales las proteínas incorporadas por receptores son degradadas por los lisosomas, mientras que las proteínas intracelulares utilizan la vía ubiquitina-proteasoma<sup>1</sup>.

Normalmente, el proceso comienza con el reconocimiento de la proteína a degradar por una pequeña proteína conocida como ubiquitina (Ub). La Ub se une a la proteína blanco haciéndola así reconocible por el proteasoma para su degradación<sup>2</sup>. Sin embargo, es preciso señalar en este punto, que actualmente se describen actividades para la ubiquitina que son independientes de la vía del proteasoma<sup>3</sup>.

## 2. Los Proteasomas

Los proteasomas son complejos constituidos por múltiples subunidades y que están presentes en la célula en gran cantidad, tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. El núcleo central de estas organelas lo constituye el proteasoma 20S, que posee la actividad catalítica, y tiene la forma de una estructura cilíndrica armada por 4 anillos heptaméricos que contienen las subunidades  $\alpha$  y las subunidades  $\beta$ . Las subunidades  $\alpha$  se encuentran en posición central mientras que las subunidades  $\beta$  comprenden los extremos del conjunto. Sobre estas subunidades se acoplan, en un proceso dependiente de ATP, las subunidades 19 S, encargadas de reconocer las proteínas ubiquitinadas. La unión de dos subunidades 19 S a cada extremo del proteasoma 20S, resulta en la conformación del proteasoma 26 S<sup>4</sup>. El proteasoma actúa como una proteasa sobre treonina: la treonina N terminal de la subunidad  $\beta$  provee el nucleófilo que ataca el grupo carbonilo de la unión peptídica en la proteína blanco.

La unión de los monómeros de Ub comienza por la estimulación por una enzima activadora de ubiquitina (E1). Esta es luego transferida a una nueva enzima conjugadora (E2) y finalmente se une a la proteína blanco por unión isopeptídica entre su glicina carboxiterminal y las lisinas epsilon de la proteína blanco. El paso final requiere una ligasa (E3) que selecciona la proteína para su degradación<sup>(2)</sup>.

## 3. Funciones del sistema Ub-proteasoma

Es tan elevada la especificidad del sistema Ub-proteasoma que, permitiendo la degradación específica de unos sustratos sin afectación de otros, se constituye en un destacado regulador metabólico celular de varios procesos vitales para la células<sup>5</sup>.

- Los proteasomas regulan la proliferación celular a través de la proteólisis sincronizada de ciclinas e inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (KDC) del ciclo celular
- Los proteasomas regulan la expresión génica mediante la degradación de factores de transcripción nuclear, tales como NFkB, p53, c-Jun, c-Myc, c-fos, HIF $\alpha$ .

El factor de transcripción nuclear NFkB es un factor heterodimérico compuesto por dos subunidades, p 50 y p 65. Se requiere la degradación proteasómica para la activación de las subunidades a partir de sus precursores<sup>6</sup>. Una vez conformado el NFkB, éste es secuestrado en el citoplasma por unión a su inhibidor Ikb. Cuando, por ejemplo, se estimula a la célula por medio de IL-1 o TNF, se fosforila el Ikb y se degrada en el proteasoma, liberando entonces al NFkB que se trasloca al núcleo e inicia la transcripción. El NFkB regula la proliferación celular, la apoptosis, la respuesta inmune e inflamatoria, la expresión de genes de citoquinas y moléculas de adhesión y receptores celulares.

La proteína p 53 es un factor de transcripción capaz de inhibir el crecimiento tumoral y es regulado normalmente en forma post-transcripcional por el sistema Ub-proteasoma<sup>7</sup>. Naturalmente se encuentra asociada a su inhibidor MDM2 que la conduce a la degradación a través del proteasoma.

Cuando la célula se somete a una agresión, se fosforila la p53 y se libera de su inhibidor, de ese modo no se puede degradar por el proteasoma, y se une a sitios específicos en el ADN iniciando la transcripción de genes que inducen la detención de la proliferación, la reparación del ADN o si el insulto es mayor, la apoptosis.

Otros factores de transcripción nuclear que son activados o degradados por el sistema Ub-proteasoma intervienen en la oncogénesis. La inhibición de la apoptosis es un mecanismo patogénico destacado en el desarrollo de algunas neoplasias. Las proteínas de la familia bcl-2. BCL-2, BAX, regulan la apoptosis celular dependiendo del modo en que realizan su dimerización, y es conocido que la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, participa en la etiopatogenia de algunas neoplasias, *vbgr*, los linfomas foliculares.

## 4. Inhibidores de proteasomas

En vistas de la importancia de los proteasomas para la regulación celular varias drogas con capacidad de inhibir los proteasomas (IP) se ha ensayado, inicialmente in vitro y luego in vivo, explorando este potencial<sup>5</sup>.

TABLA 1

Clase	Inhibidor	Especificidad	Mecanismo
Péptidos aldehídicos	MG 132, LLnV PSI ALLN, ALLnM CEP 1612	Inhiben calpaína y cathepsina B	Interacción reversible con componente catalítico
Metabolitos de estreptomicas	Lactacistina	Inhibe proteasoma	Forma esteres irreversibles con el residuo treonina y la subunidad catalítica
Acidos borónicos	PS 341	Inhibición selectiva del proteasoma	Interacción reversible con el residuo treonina catalítico
Tripéptidos vinilsulfonas	NLVS	Inhibe cathepsina	Forma aductos irreversibles en la subunidad catalítica
Productos naturales	Eponomicina Epoxomicina	Inhibición selectiva del proteasoma	Unión covalente a la subunidad catalítica

En general, los IP actúan en forma diferente dependiendo del estado proliferativo de las células. En células proliferantes, predomina la acción proapoptótica, mientras que en células quiescentes, predomina la actividad de protección celular.

Los IP inducen la apoptosis de varias células de líneas tumorales, mientras que protegen a timocitos de la apoptosis inducida por algunos estímulos, posiblemente, mediante la inhibición de la liberación de Citocromo c por las mitocondrias, evitando la activación de caspasas. Esta acción diferencial sobre las células le otorgaría una ventaja aparente de aplicación, pues el efecto de la administración de IP se vería sobre las células neoplásicas manteniendo una toxicidad reducida sobre las células normales. Es de señalar que el efecto sobre las células se encuentra también en dependencia del tiempo de administración: la administración prolongada puede inducir la apoptosis celular.

Entre los IP se destaca el ácido dipeptidil borónico (PS 341): bortezomib, por su capacidad de inhibir específicamente los proteasomas. Este producto ha demostrado hasta la fecha una importante actividad proapoptótica en varias líneas celulares humanas: Cáncer de próstata, colon, mama, carcinomas escamosos, mieloma, y en vivo particularmente en mieloma y LLC

##### 5. Mecanismos de inducción de apoptosis de los IP

La aplicación de IP promovería la apoptosis de las células neoplásicas por varios mecanismos, que incluyen: aumento de actividad de p53, la acumulación de moléculas inhibitorias del ciclo celular p 27 y p 21, la acumulación de proteínas proapoptóticas de la familia bcl-2, la activación de kinasa activada por stress, la activación directa de caspasas y finalmente, la inhibición del efecto antiapoptótico del NfκB.

##### 6. Efecto del bortezomib

La aplicación en vivo del bortezomib ha demostrado efectos beneficiosos en varios modelos tumorales, más aún, ha demostrado la capacidad de restaurar el efecto antitumoral de otras drogas citotóxicas<sup>8</sup>.

Particularmente en mieloma, la aplicación del bortezomib es efectiva, si bien, los mecanismos moleculares que operan en tal efecto no están aún completamente aclarados. En un estudio reciente<sup>9</sup>, se ha visto que el Bortezomib induce la expresión de la proteína p 53 y su inhibidor MDM 2, induce la fosforilación de la p 53, la activación de JNK que a su vez activa la caspasa 8. En conjunto, estos mecanismos inducirían la apoptosis de las células mielomatosas.

Otro estudio pone en evidencia la posible participación de intermediarios reactivos del oxígeno como elementos indispensables para iniciar la estimulación de la vía JAK<sup>10</sup>.

La aplicación clínica del Bortezomib se ha demostrado eficiente en pacientes refractarios o recaídos a múltiples agentes<sup>11</sup>, y se ha comenzado a ensayar en combinación para el tratamiento de pacientes con enfermedad de-novo<sup>12</sup>.

También resulta particularmente interesante la combinación del Bortezomib con otras drogas. Por ejemplo, la combinación Bortezomib flavopiridol es capaz de inducir la apoptosis en células de LMC resistentes al imatinib, a través de mecanismos dependientes e independientes del bcr-abl<sup>13</sup>.

En síntesis, cabe expresar que la posible acción terapéutica de estas drogas, permite albergar la expectativa de un tratamiento dirigido a blancos moleculares específicos<sup>14</sup>, con mayor beneficio y menor riesgo para el paciente.

**Carlos Ponzinibbio**  
cponzin@attglobal.net

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ciechanover A. The ubiquitin proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994, 79:13-21.
2. Hochsattler M. Ubiquitin, proteasomes and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1995, 7:215-223.
3. Sun L., Chen Z. The novel function of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004, 15: 119-126.
4. Baumeister W., Walz J., Zuhl F., Seemuller E. The proteasome: paradigm of self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998, 92: 367-380.
5. Almond J.B., Cohen G.M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002, 16: 433-443.
6. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *An Rev Immunol* 2000, 18:621-663.
7. Maki C.G., Huijbregt J.M., Howley P.M. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res* 1996, 56:2649-2654.
8. Richardson P., Barlogie B., Berenson J., et al A phase 2 study of Bortezomib in relapsed refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003, 348: 2609-2617.
9. Hideshima T., Mitsiades C., Akiyama M., et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS 341. *Blood* 2003, 101: 1530-1534
10. Yu., Rahmani., Dent P et al. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. *Exp Cell Res* 2004, 295: 555-566.
11. Jagannath S., Richardson P., Barlogie B et al. Bortezomib in combination with dexamethasone for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *The Jematol J* 2004, 5: s130: 369.
12. Cavanagh J., Curry N., Stec J et al. PAD combination therapy (PS 341/Bortezomib, adriamycin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. *The Hematol J* 2004, 5: s128: 366.
13. Dai Y., Rahmani M., Yan Pei X., et al. Blood Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl- dependent and independent mechanisms. *Blood* 2004, 104: 509-518.
14. Hideshima T., Bergsagel P., Kuehl M., Anderson K. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004, 104:607-618.

## OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO DIRIGIDOS A LA MOLÉCULA DE BCL-2 PARA TRATAMIENTO DE CÁNCER

### Benjamín Koziner

BCL-2 es una proteína normal cuya expresión está significativamente aumentada en varios tipos de cáncer. Mientras que ciertas histologías de linfomas no Hodgkin (LNH) sobreexpresan constitutivamente BCL-2 debido a una traslocación cromosómica específica que afecta el brazo largo del cromosoma 18, el mecanismo por el cual BCL-2 está expresado en otras malignidades permanece poco claro.

Esta proteína aparenta ser la principal causa de la resistencia intrínseca de muchos tipos de cáncer a las

formas convencionales de tratamiento (quimio y radioterapia). La expresión de BCL-2 está aumentada en la leucemia linfocítica crónica (LLC) y en varios tipos histológicos de LNH y la sola expresión de BCL-2 (en relación directa con niveles disminuidos de la proteína BAX) está asociada con un pronóstico significativamente más desfavorable en pacientes con LLC.

BCL-2 se ubica en la capa interna de mitocondrias permitiendo normalmente la salida a través de poros del citocromo C, lo que resulta en la activación de la cascada enzimática de las caspasas que culmina en la destrucción masiva de cromatina y proteínas. La expresión aumentada de BCL-2 previene o sustancialmente retarda la salida del citocromo C, a pesar de la presencia de señales apropiadas de "muerte celular" que ordinariamente desencadenan la apoptosis.

Dado su rol central en los mecanismos de muerte de células cancerosas, la proteína BCL2 ha sido considerada un blanco principal para la modulación por moléculas pequeñas y oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos antisentido son moléculas de ADN de cadena única, químicamente modificadas, que típicamente promedian de 13 a 25 nucleótidos. El esqueleto hidrocarbonado puede ser estabilizado (retardando la degradación de nucleasa) por varias modificaciones químicas.

Oblimersen sódico es un oligonucleótido antisentido de 18 bases de longitud y ha sido diseñado para hibridarse con los primeros 6 codones del "open reading frame" del BCL-2 ARN mensajero. Esta droga sensibiliza a las células para desarrollar apoptosis ya sea sola o combinada con otras señales de "muerte celular" como quimioterapia citotóxica, anticuerpos monoclonales y radioterapia. Estudios preclínicos han demostrado la actividad de oblimersen sódico como agente único en varias neoplasias linfocíticas y la droga ha demostrado amplio sinergismo con una variedad de drogas quimioterapéuticas en una variedad de tumores sólidos y malignidades hematológicas.

Los primeros estudios clínicos han reportado que oblimersen sódico disminuye los niveles de la proteína BCL-2 en células tumorales de pacientes que recibieron esta droga en forma sistémica. Estos estudios comenzaron en 1995 y hasta el presente más de 1.000 pacientes han recibido la droga en Fases I, II y III.

En neoplasias hematológicas, estudios de fase III se están desarrollando actualmente en LLC (en combinación con fludarabina y ciclofosfamida, y también con fludarabina y rituximab) y en mieloma (en combinación con dexametasona y otras drogas). Además existe experiencia en linfoma del manto, LNH recaídos y leucemia mieloide aguda. Oblimersen sódico se administra por lo general en forma de una infusión EV continua por 5 - 7 días en forma ambulatoria.

**Dr. Benjamin Koziner**  
bkoziner@cellprep.com

## REFERENCIAS RECOMENDADAS

- Agular-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer*. 1996;69:114-119.
- Aviram A, Rabizadeh E, Zimra Y et al. Expression of Bcl-2 and bax in cells isolated from B-CLL patients at different stages of the disease. *Eur J Haematol*. 2000 Feb;64(2):80-4. 2000;64:80-84.
- Korz C, Pscherer A, Benner A et al. Evidence of distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood*. 2002;99:4554-4561.
- Faderl S, Keating MJ, Do KA et al. Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia*. 2002;16:1045-1052.
- Kitada S, Takayama S, De Riel K, Tanaka S, Reed JC. Reversal of chemoresistance of lymphoma cells by antisense-mediated reduction of Bcl-2 gene expression. *Antisense Res Dev*. 1994;4:71-79.
- Pepper C, Thomas A, Hoy T, Cotter F, Bentley P. Antisense-mediated suppression of Bcl-2 highlights its pivotal role in failed apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;107:611-615.
- Auer R, Corbo M, Fegan C, Frankel S, Cotter F. Bcl-2 antisense (Genasense<sup>®</sup>) induces apoptosis and potentiates activity of both cytotoxic chemotherapy and rituximab in primary CLL cells. *Blood*. 2001;98:808a [Abstract 3358].
- Cotter F, Auer R, Corbo M, McElwaine S and Frankel S. Oblimersen Sodium (G3139) sensitizes malignant B-cells to alemtuzumab (AB) induced apoptosis [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2003;22:227.
- Rai KR, O'Brien S, Cunningham C et al. Genasense (Bcl-2 antisense) monotherapy in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: Phase 1 and 2 results. *Blood*. 2002;100:384a.
- Koziner, B. Potential therapeutic applications of oblimersen in CLL. *Oncology (Huntingt)* Nov 2004;18 (13 suppl 10) 32-38

## AGENTES HIPOMETILANTES Y MODIFICADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN

### Marcelo Iastrebner

Los Agentes Hipometilantes son drogas que se caracterizan por neutralizar una de las enzimas más importantes de la transcripción celular, la DNA Metil Transferasa (DNMT), enzima que actúa como factor transcripcional permitiendo ingresar metilos a un sector del DNA denominado "promotor" y, por consiguiente, silencia genes. En condiciones normales, la Metilación es un proceso reversible en donde la DNMT obtiene metilos de la 5' Adenosil Metionina y los incorpora en el anillo 5' citosina del DNA para formar Metil Citosina<sup>1</sup>. Este proceso es esencial para

el desarrollo y crecimiento celular y, además, para responder a modificaciones del medio ambiente. Cabe mencionar que más del 70% de todos los genes de una célula están apagados (estado "switch off") o no expresados, esto es un proceso necesario para que la célula pueda llevar a cabo su función principal. Un ejemplo sencillo de ello, lo grafica el eritroblasto (hasta policromatófilo) cuyo gen para la síntesis de globina se encuentra muy activado. Para que un gen se exprese, la cromatina debe estar "desplegada o abierta" y esto depende de la activación por acetilación ó fosforilación de histonas en los nucleosomas (estado "switch on"). Los nucleosomas son sectores de cromatina constituido por ADN y proteínas histonas y no histonas que se ordenan espacialmente y permiten el desplegamiento o la compactación de la cromatina hasta unas 10.000 veces. Las histonas están cargadas positivamente y al adquirir fuerzas negativas pierden su poder de atracción al DNA y se despliegan.

Una manera de estudiar la metilación es a través de cromatografía líquida de alta performance o por técnicas basadas en PCR modificada denominadas "AIMS" (amplificación de sitios intermetilados). Ambos métodos, permitirán conocer un "Perfil de Metilación" que será típico para un determinado gen o sector promotor y constante para una patología específica<sup>2</sup>. Una célula aberrante o neoplásica, se encontrará en general hipermetilada en las regiones promotoras denominadas "Islas CpG" y si dichas islas CpG corresponden a genes supresores tumorales (p15, p53, etc.), las células adquirirán ventajas proliferativas y antiapoptóticas que le permitirán evolucionar y transformarse, si aún no lo estaban, en células neoplásicas. Como ejemplo, se menciona: el ER alfa, BRCA1 o p16 en cáncer de mama. Si se produjera una hipometilación global, es decir de sectores amplios del genoma, se activarían oncogenes y se inestabilizarían los cromosomas (acúmulo de desalineamiento, rupturas, deleciones, y duplicaciones del DNA). Por ejemplo: agentes mutagénicos del medio ambiente como el benzopireno del cigarrillo que, entre otras cosas, inhibe a la DNMT.

Antes de describir a los agentes hipometilantes más utilizados, es importante mencionar un concepto de aplicación futura muy relevante: "los cambios epigenéticos", entendiéndose por tal, aquellas modificaciones de la información del ADN que no dependen exclusivamente de la secuencia de las bases nucleotídicas y que pueden ser transmitidas a la herencia. Estos cambios epigenéticos están relacionadas principalmente con la metilación o la acetilación aberrante. Los linfomas, leucemias o tumores sólidos tienen un patrón de metilación específico denominado "Methylotype", mientras que una célula normal con-

serva un patrón de metilación a lo largo de las divisiones celulares y éste, es acorde a la función que desempeña: "Methylotype de Célula Normal"<sup>3</sup>. Sin duda, conociendo los patrones de metilación, se vislumbran beneficios clínicos como por ejemplo: 1.- detección precoz de enfermedades (el patrón de metilación del gen supresor p151NK4b, p73 o CDH1 típico para un subtipo de LMA o LLA) 2.- Utilización como factor de predicción de respuesta a la quimioterapia y 3.- como blanco terapéutico.

En este último punto, se observa que hipometilando genes supresores tumorales como el p15, p53 y de la familia ras, en especial en los síndromes mielodisplásicos no transformados a leucemia aguda, se retrasaba la transformación leucémica y se mejoraba el curso natural de la enfermedad.

Dos drogas son las más utilizadas como agentes hipometilantes, la 5-azacitidina o 5-aza (Vidaza ®)<sup>4</sup> y la 2 deoxicidina o Decitabine (Dacogen ®)<sup>5</sup>. Ambas presentan estructuras químicas semejantes al Ara-C y son análogos de las pirimidinas.

El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la DNMT. La 5-aza puede ser utilizada por vía subcutánea y esto le brinda mayor confort al paciente, permitiendo que el mismo sea tratado en forma ambulatoria. La droga fue aprobada en Junio de 2004 por la Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizada en los síndromes mielodisplásicos no transformados en LMA. La tasa de respuesta global fue del 63% pero, hay que tener en cuenta que esta cifra incluye a las mejorías hematimétricas (47%), remisiones parciales y totales. Como efectos adversos principales se mencionan: la mielosupresión, los gastrointestinales, pirexia y mialgia; además, la droga es teratogénica (concepto en revisión) y requiere durante su uso un monitoreo estricto de la función renal y hepática.

La segunda droga, el Decitabine, es administrada por vía endovenosa, tiene una tasa de respuesta similar a la Azacitidina y, aparentemente, en dosis más bajas que las utilizadas en los ensayos clínicos, mantiene la misma eficacia pero, con menos efectos colaterales. La respuesta citogenética es del 31% y las plaquetas se recuperan particularmente rápido<sup>6</sup>.

Los agentes Hipometilantes junto con las drogas inhibidoras de histonas deacetilasas (HDAIs) tienen acción sinérgica en el tratamiento de la Leucemia Promielocítica Aguda, en donde, como nuevo blanco terapéutico, se busca restaurar la sensibilidad al ATRA. Sin duda, el tratamiento será de mayor eficacia y menor toxicidad cuanto más exacta sea la corrección molecular apuntada<sup>7</sup>.

**Marcelo Iastrebnner**  
miastrebnner@ciudad.com.ar

## BIBLIOGRAFÍA

1. Esteller M. "Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg". *Clin Immunology* 109 (Oct. 2003):80-88.
2. Lehman U et al. "Real time PCR based assay for quantitative determination of methylation status". *Methods Mol Biol.* 2004;287:207-18.
3. R. Villa, et Al. "Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia". *Biochemical Pharmacology* 68 (2004) 1247-1254
4. Azacitidine, 5 Aza. *J Cl O* 2002 May 15, 244-51.
5. Decitabine: 2'-deoxy-5-azacytidine, Aza dC, DAC, (Dacogen ®). *Drugs R D.* 2003;4(6):352-8.
6. 5 aza 2 deoxicidina or decitabine. *BrJH* 2001 Aug 114, 349-57.
7. Santini, V., Kantarjian, and J-P Issa. Changes in DNA Methylation in neoplasia: pathophysiology and Therapeutic Implications. *Ann Intern Med* Vol 134, N°7, 2001, pp573-86.

## MECANISMOS DE TRASDUCCIÓN DE SEÑALES INTRACELULARES

### Daniel Fassi

Todas las células del organismo tienen la capacidad de responder ante estímulos de su microambiente. Dichos estímulos son capaces de modificar el comportamiento celular dependiendo del tejido, la función para la que las células están determinadas, su estadio de diferenciación y su material genético. El estímulo suele ser una molécula que toma contacto con las células a través de estructuras de membrana y citoplasmáticas especializadas llamadas receptores. Debemos entender entonces que los receptores informan a la célula del estado del microambiente que las rodea, indicándoles cómo deben comportarse y responder ante estímulos del mismo, para mantener un funcionamiento normal del tejido del que son parte. Todos los receptores independientemente de su localización y tipo, están acoplados a señales intracelulares de comunicación llamadas señales de trasducción.

La trasducción de señales en el interior de una célula en respuesta a factores activadores e inhibidores del crecimiento, comprende cascadas de modulación covalente por interacciones proteína-proteína.

Estas cascadas de modulación incluyen:

*Fosforilaciones mediadas por quinasas de serina, treonina y tirosina* de sustratos llamados proteínas de anclaje como el sistema Raf/MEK, MAPK con efectos mitogénicos

*Fosforilaciones mediadas por quinasas que responden a citoquinas* como las Janus quinasas (JAK) y las MAP quinasas acopladas a factores transcripcionales como los STATs (signal transducers and activators of transcription) que son señales de trasducción citoplasmáticas y activadores de genes a nivel nuclear.

### Defosforilaciones mediadas por fosfatasa:

**Hidrólisis del GTP:** mediadas por GTPasas como las producidas por los genes RAS (muchas acopladas a las proteínas G como G<sub>i</sub> y G<sub>s</sub> asociadas a adenilato ciclasa, G<sub>q</sub> que activa la fosfolipasa C y la G<sub>o</sub> que activa canales de K<sup>+</sup>)

Estas cascadas de reacciones intracelulares pueden estar alteradas en algunos de sus componentes, como así también la conexión con los factores transcripcionales y nucleares. Las mutaciones o defectos genéticos conducen a vías anormales amplificadas y no reguladas, por lo que la célula puede modificar su comportamiento proliferativo y madurativo. Las células tumorales modifican las señales de trasducción para obtener ventaja proliferativa y antiapoptótica.

Es ahora conocido que la leucemia mieloide crónica (LMC) fue la primera neoplasia en donde se encontró una alteración citogenética específica, el cromosoma Filadelfia que representa la traslocación balanceada entre los brazos largos del cromosoma 9 y el 22. El intercambio de material genético permite la amplificación y desregulación del proto-oncogen ABL del cromosoma 9 y la generación de un gen híbrido el BCR-ABL<sup>1</sup>.

Este oncogen se expresa en todas las etapas clínicas de la LMC, la proteína resultante (tirocin-quinasa bcr-abl) interviene en cascadas de trasducción intracelulares que otorgan al clon Filadelfia ventaja proliferativa, antiapoptótica y de no regulación ya que su adherencia al microambiente medular está disminuida.

Existen distintas quinasas de diferente PM, la más frecuente es la p210, presente en la mayoría de los casos típicos de LMC, habiendo otras menos frecuentes como la p190 (en LLA Phi (+)) y la p230, presente en formas con leucocitosis menos conspicua, neutrofilia y monocitosis y a veces sin esplenomegalia.

## DROGAS QUE ACTUAN SOBRE LA TRASDUCCIÓN DE SEÑALES: IMATINIB

### Daniel Fassi

La proteína quimérica bcr-abl y las señales de trasducción que genera, representan un blanco ideal para el desarrollo de nuevas drogas en LMC.

El mesilato de imatinib es una 2-fenilaminopirimidina que induce remisión hematológica en el 95% y molecular en el 60% de los pacientes con LMC en fase crónica, así como también ocurren en pocos casos, en las fases acelerada y blástica<sup>2, 3</sup>.

En las células que expresan el oncogén BCR-ABL ocurren tres mecanismos por los cuales el imatinib ejerce su efecto:

Inhibición de la auto-fosforilación de Bcr-Abl y la de sus sustratos moleculares: observada al minuto de la exposición al imatinib.

Inhibición de la proliferación celular.

Inducción de la apoptosis: más evidente en las formas blásticas y leucemia aguda.

Los últimos dos efectos del imatinib son de aparición más tardía (16 a 20 hs).

**Mecanismo de acción:** ocupación de parte del sitio de unión al ATP inhibiendo a la proteína por unión y estabilización de la molécula inactiva<sup>4</sup>.

La efectividad varía de acuerdo a la etapa de diferenciación de la célula blanco de modo que el Bcr-Abl se inhibe más rápido en células ontogénicamente más maduras; células quiescentes pueden ser relativamente insensibles al imatinib y adquirir una ventaja proliferativa y de autorrenovación.

El imatinib no limita su acción a la proteína bcr-abl, sino que también puede inhibir al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) y al receptor de stem cell factor (c-kit ó SCF-R)

## MECANISMOS DE RESISTENCIA AL IMATINIB

### Daniel Fassi

La resistencia al imatinib es una problemática clínica relevante en pacientes que reciben la droga.

Existen dos formas de resistencia:

**Resistencia primaria:** es la falta de respuesta a la droga sin haber evolución clonal que la justifique.

**Resistencia adquirida:** es la pérdida de la respuesta obtenida previamente.

Los mecanismos de resistencia pueden ser:

Mediados por el huésped: disminución de la biodisponibilidad e inactivación de la droga por fenómenos biológicos y farmacológicos. (en el citocromo p450, unión a  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida<sup>5</sup> que reduce su concentración plasmática).

Intrínseco a la célula: por amplificación génica, mutaciones en el dominio de la quinasa y exportación de la droga al exterior de la célula (gen MDR-1).

El 50% de los pacientes en recaída y el 90% de los pacientes con resistencia al imatinib, presentan mutaciones puntuales en Bcr-Abl<sup>6</sup>. Cabe destacar que estas mutaciones sólo adquieren relevancia en presencia de imatinib, ya que fueron seleccionadas negativamente debido a la especificidad ejercida por el medicamento. El imatinib presenta una rigidez molecular que lo hace no reconocer sus blancos si se encuentran modificados (aunque sea mínimamente) en su estructura y, por eso, en el futuro debieran usarse drogas con menor rigidez asociadas al imatinib para salvar la resistencia de las proteínas mutadas.

Otros pacientes presentan expresión exagerada de BCR-ABL a nivel genómico ó de transcripción, la llamada amplificación génica. Las células con la amplificación tienen mayores niveles de proteína bcr-abl y mantienen la cantidad mínima de trasducción de señales necesaria para la supervivencia de la clona, aún en presencia de imatinib. Otros blancos moleculares potenciales en LMC son:

- a) Inhibición de otros dominios de la quinasa Bcr-Abl como la oligomerización de la porción Bcr, SH y los dominios de unión a la actina.
- b) Disminución de los niveles de p210 con drogas como el trióxido de arsénico y la geldanamicina.
- c) Inhibición de las señales RAS por los inhibidores de la farnesil transferasa (FTIs).<sup>7</sup>
- d) Inhibición de otras quinasas como las abl/src por drogas en experimentación como el compuesto BMS354825, la cascada RAF/MEK/ERK PI-3 quinasa y otras.<sup>8</sup>

La proteína quinasa de bcr-abl continúa siendo un blanco terapéutico útil. En la actualidad, se encuentra en investigación el uso de inhibidores de la quinasa con especificidad diferente al imatinib. En el futuro, posiblemente se requerirá un cóctel de inhibidores con especificidades diferentes que se seleccionen en base al perfil individual molecular de cada paciente.

**Daniel Fassi**

DanielFassi@yahoo.com.ar

## BIBLIOGRAFÍA

1. Druker BJ, O'Brien SG, Cortés J, Radich J. Chronic myelogenous leukemia. **Hematology** (Am Soc Hematol Educ Program). 2002;111-35.
2. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **N Engl J Med** 2002;346:645-52
3. Sawyers C. Molecular studies in chronic myeloid leucemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors. **Semin Hematol** 2001;38 (suppl 8):15-21
4. Hurtado-Monroy R, Cervera-Ceballos E, Aspectos moleculares de la Leucemia Mieloide Crónica. **Gac Méd Méx** Vol 139, Suplemento N°2, 2003; 119-121
5. Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, et al. Alpha 1 acid glycoprotein (AGP) binds to STI571 and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. **Clin Cancer Res** 2003;9
6. Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia chromosome positive leukemias. **The Lancet Oncol** 2003;4:75-85
7. Hoover RR, Mahon FX, Melo JV, Daley GQ. Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. **Blood** 2002;100:1068-71
8. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, et al. Structural mechanism for STI571 inhibition of abelson tyrosine kinase. **Science** 2000;289:1938-42

