



UNIVERSIDADE DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA
Centro Internacional de Estudos
de Doutoramento e Avanzados
(CIEDUS)

Marcos
Seoane
Souto

Tese de Doutoramento

La pérdida de Rb1 modula la
respuesta al daño en el ADN y la
senescencia inducida por estrés
oncogénico favoreciendo la
progresión tumoral

Santiago de Compostela, 2008

Escola de Doutoramento Internacional en Ciencias da Saúde

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOXÍA



**LA PÉRDIDA DE *Rb1* MODULA LA RESPUESTA AL DAÑO
EN EL ADN Y LA SENESCENCIA INDUCIDA POR ESTRÉS
ONCOGÉNICO FAVORECIENDO LA PROGRESIÓN
TUMORAL**

Marcos Seoane Souto

Marzo 2008

D. José Antonio Costoya Puente, Víctor Manuel Arce Vázquez y Rosa María Señarís Rodríguez profesores del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral titulada “LA PÉRDIDA DE *RBI* MODULA LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN Y LA SENESCENCIA INDUCIDA POR ESTRÉS ONCOGÉNICO FAVORECIENDO LA PROGRESIÓN TUMORAL” elaborada por el licenciado en ciencias biológicas D. Marcos Seoane Souto, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que conste, expiden y firman la presente certificación en Santiago de Compostela a 5 de marzo del 2009.

Fdo. **José Antonio Costoya Puente**

Fdo. **Víctor Manuel Arce Vázquez**

Fdo. **Rosa María Señarís Rodríguez**

Agradecimientos

A mis directores Víctor Arce, Rosa Señarís y especialmente a José A. Costoya por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y abrir ante mí el fascinante mundo de la investigación.

A todos los compañeros del departamento de Fisiología que he tenido el placer de conocer a lo largo de estos años. Juntos hemos compartido muchos momentos que me han enriquecido profesional y personalmente.

A Pablo y Marcos, dos compañeros que han sabido ganarse mi amistad más sincera.

A Isa que con su cariño y alma guerrera me da fuerzas cada día para superar cualquier escollo que pueda encontrar en el camino.

A mi familia que siempre me han apoyado en este viaje.

De manera muy especial a mis padres, de los que me siento tremendamente orgulloso, porque siempre han confiado en mí y me han demostrado su apoyo incondicional.

ABREVIATURAS

Abreviaturas:

AKT/PKB: *Protein Kinases B*
AP-1: *Activator Protein 1*
ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*
ATO: *Arsenic Trioxide*
ATR: *ATM-and Rad3-Related*
ATRIP: *ATR-Interacting Protein*
Chk1/2: *Checkpoint homolog kinase 1/2*
CKI: *CDK Inhibitors*
DDR: *DNA-Damage checkpoint Response*
DMEM: *Dulbecco Modified Eagle Medium*
EGF: *Epidermal Growth Factor*
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
ERK: *Extracellular mitogen-Regulated Kinase*
FGF: *Fibroblast Growth Factors*
GBM: *Glioblastoma Multiforme*
HGF: *Hepatocyte Growth Factor*
hTERT: *Human Telomerase Reverse Transcriptase*
IGF-1: *Insulin-like Growth Factors*
JNK: *Jun amino-terminal kinase*
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*
M-CSF: *Macrophage Colony-Stimulating Factor*
MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*
MEK: *MAPK/ERK Kinase*
NGF: *Nerve Growth Factor*
OIS: *Oncogene-Induced Senescent*
PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*
Ppm1d: *Protein phosphatase 1D magnesium-dependent*
PRAK: *p38-regulated/activated protein kinase*
ROS: *Reactive oxygen species*
RPA: *Relation protein A*
TKR: *Tirosin Kinase Receptor*
SAPK: *Stress-Activated Protein Kinase*
SDF: *Senescence-associated DNA-damage Foci*
STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*
TGF- α : *Transforming Growth Factor alfa*
TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*
TMA: *Tissue Microarrays*
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*
WIP1: *Wild-type p53-Induced Phosphatase 1*
WT: *Wild-type*

ÍNDICE

Índice

I. RESUMEN.....	17
II. INTRODUCCIÓN.....	21
1. Transducción de señales y cáncer.....	24
1.1. Factores de crecimiento.....	25
1.2. Receptores tirosina quinasa	26
1.3. Receptores asociados a tirosinas quinasa.....	28
1.4. Receptores asociados a proteínas G.....	29
1.5. Transducción de señales al núcleo	30
1.5.1. La vía de Ras.....	32
1.5.2. Cascada de las MAPKs.....	34
1.5.3. La vía de PI3K-Akt.....	35
2. Regulación del ciclo celular.....	37
2.1. Fases de ciclo celular.....	38
2.2. Los complejos Ciclina/Cdk.....	39
2.3. CKIs, Inhibidor de los complejos Ciclina/Cdk.....	42
2.4. El gen del retinoblastoma.....	43
2.4.1. La familia de retinoblastoma.....	44
2.4.2. E2F, diana de Rb.....	45
3. Barreras frente al Cáncer.....	47
3.1. Apoptosis o muerte celular programada.....	48
3.1.1. Factores nucleares que intervienen en la apoptosis	48
3.1.2. Apoptosis como mecanismo de supresión tumoral.....	49
3.2. Senescencia.....	50
3.2.1. Senescencia inducida por oncogénesis (OIS).....	51
3.2.2. OIS <i>in vivo</i>	51
3.2.3. Características de las células senescentes.....	52
3.2.4. Vías implicadas en la activación de Senescencia.....	53
3.2.4.1. Activación de DDR.....	53
3.2.4.2. ROS y p38MAPK.....	56
3.2.4.2.1. Rutas de activación de p38MAPK.....	59
3.2.4.2.2. Papel de WIP1 en la oncogénesis.....	63
3.2.5. El supresor de tumores p53.....	67
3.2.5.1. Presión selectiva sobre p53.....	67
4. Los gliomas.....	69
4.1. Gliomas: grados y pronóstico.....	70
4.2. Alteraciones genéticas en gliomas.....	71
4.3. Modelo de Glioblastoma.....	73
III. OBJETIVOS.....	77
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
1. Ratones knockout <i>Rb1</i>	81
2. Ratones knockout condicionales <i>Rb1</i>	81
3. Cultivo MEFs.....	81
4. Cultivo Astrocitos.....	82
5. Infección retroviral.....	84
6. Curvas de proliferación con cristal de violeta.....	85
7. Incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU).....	85
8. Ensayos de transformación.....	86
9. Senescencia y cuantificación de la apoptosis.....	86
10. Immunoblot.....	87
11. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	87
12. Preparación de cromosomas en metafase y FISH.....	88
13. Inmunohistoquímica.....	88
14. Tratamiento con inhibidores de Wip1.....	89
V. RESULTADOS.....	93
VI. DISCUSIÓN.....	117
VII. CONCLUSIONES.....	127
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	131

RESUMEN

Resumen

La estimulación de señales oncogénicas en células primarias provoca la activación de senescencia inducida por oncogénesis (OIS), uno de los principales mecanismos de supresión tumoral. Recientemente se ha descrito que la activación de OIS responde a la activación de *checkpoints* dependientes de daño en el DNA (DDR), salvaguardando la integridad del genoma. En este trabajo se ha demostrado como los mecanismos celulares implicados en el proceso de transformación de los gliomas son capaces de desacoplar ambos procesos, OIS y DDR. Los gliomas humanos se caracterizan por presentar alteraciones en vías de señalización intracelulares, así como alteraciones en la regulación del ciclo celular. En nuestro modelo de gliomagénesis, estas alteraciones han sido recreadas a través de la expresión de Ras oncogénico (HRas^{V12}) e inactivación del gen de *Rb1* respectivamente. Sorprendentemente, la expresión de HRas^{V12} en astrocitos, no es capaz de inducir senescencia celular, a pesar del aumento en los niveles de p53, p16^{INK4a} y p21^{CIP1}, como ha sido descrito en otros tipos celulares. Sin embargo, la activación de esta vía oncogénica es suficiente para incrementar la tasa de proliferación, estimular la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y generar inestabilidad genómica, llegando a inducir la formación de tumores con características similares a gliomas de bajo grado. Estos resultados difieren cuando la acción oncogénica de Ras va acompañada de la pérdida del supresor de tumores *Rb1*. En este escenario, la delección del gen *Rb1* confiere una ventaja proliferativa a los astrocitos, además de aumentar la activación de DDR de forma independiente de daño en el DNA. Al mismo tiempo, la pérdida de *Rb1* favorece el bloqueo de las rutas de estrés celular, aumentando los niveles de Wip1. Esta fosfatasa provoca la defosforilación de p38MAPK, una proteína quinasa activada por estrés que regula negativamente la transformación y malignización celular. De este modo, Ras oncogénico y la delección de *Rb1* cooperan aumentando el índice de transformación celular en este modelo de glioblastoma, provocando la formación de tumores que recapitulan los rasgos de los GBMs humanos. Por lo tanto, la pérdida de *Rb1* actúa como un interruptor mediando la transición entre lesiones premaligna y cáncer, a través de la modulación de DDR. Estos resultados tienen una importante implicación en la comprensión de la biología de los gliomas y apuntan a Wip1 como una nueva diana terapéutica en este tipo de tumores.

INTRODUCCIÓN

Introducción

En medicina, el término carcinoma (del griego *karkinos*: cangrejo y *-ō-ma*: tumor) dado por Hipócrates cuatro siglos antes de Cristo y su equivalente latino cáncer (cangrejo), son utilizados para designar a un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce células capaces de proliferar de forma aberrante. La acumulación de alteraciones en el material genético de dichas células da paso a alteraciones morfológicas y funcionales provocando la proliferación celular descontrolada, invasión de tejidos circundantes y, en ocasiones, metástasis, pudiendo finalmente causar la muerte del individuo.

Nuestro organismo esta formado por más de 30.000 millones de células que nacen, crecen, se dividen y mueren bajo la supervisión de numerosos sistemas de control, asegurándose de este modo que los órganos y tejidos crezcan en equilibrio y mantengan la arquitectura corporal. Para que una célula se divida en dos células hijas idénticas es necesaria la participación de una gran cantidad de moléculas como enzimas, factores de crecimiento y factores de transcripción que regulen con precisión la expresión de un gran número de genes. La correcta integración de las distintas señales reguladoras del crecimiento recibidas por la célula va a determinar si la célula debe o no continuar a través del ciclo celular. En ciertos casos el desajuste de los sistemas de control celulares puede provocar a la aparición de una célula cancerosa.

Actualmente existen suficientes evidencias científicas para afirmar que el cáncer es una enfermedad genética aunque generalmente no hereditaria. Las células de un tumor descienden de una célula ancestral común, que en algún momento, generalmente décadas antes de que el tumor se manifieste, inició un programa de división indebido. La transformación de una célula acontece por acumulación de mutaciones en unos genes específicos, los cuales son la clave molecular para entender las raíces del cáncer.

Es importante entender que la transmisión de las alteraciones de unas células cancerosas a sus células progeñe no implica que el desarrollo de un cáncer sea heredado por la

descendencia del individuo. De hecho, esto ocurre sólo en un porcentaje de casos reducido, cuando las mutaciones aparecen en las células de la línea germinal.

La teoría del multiescenario de la carcinogénesis (Armitage y Doll, 1954), comúnmente aceptada para explicar la patogenia de esta enfermedad, propone que son necesarias varias mutaciones celulares somáticas para producir cáncer, necesitándose según la especie y el tipo celular, entre dos y siete mutaciones para iniciar un proceso canceroso. El cáncer da comienzo cuando la acumulación de mutaciones induce a la célula a proliferar descontroladamente. La progenie de la célula transformada tiende a incrementar su malignidad aumentando progresivamente la tasa de crecimiento celular y las alteraciones cromosómicas. La aceleración de la proliferación permite que se acumulen nuevas mutaciones somáticas debido a fallos o falta de tiempo en el proceso de reparación. Esta cadena de acontecimientos agrava el fenotipo celular dando lugar a células más agresivas, proceso que suele ir asociado a la adquisición de resistencia a la terapia antitumoral.

Las mutaciones causantes de los procesos que conducen a la aparición de un cáncer pueden producirse en diversos genes que podemos agrupar en dos familias: La primera está integrada por genes que codifican proteínas que estimulan la proliferación celular. Son genes que codifican proteínas nucleares, citoplasmáticas o de membrana, que intervienen en la homeostasis celular, manteniendo el equilibrio de las funciones celulares, por lo que su nivel de expresión está estrictamente regulado. Cuando éstos genes mutan se transforman en oncogenes, siendo capaces de orquestar la multiplicación anárquica de las células. La segunda familia está integrada por los genes supresores de tumores. Estos genes son reguladores negativos del crecimiento e inhibidores del fenotipo canceroso. Cuando los genes supresores de tumores se encuentran inactivos a causa de mutaciones, las células son capaces de dividirse de forma descontrolada.

Los oncogenes pueden encontrarse en la célula en un número de copias elevado, pero también pueden presentar alteraciones en sus secuencias nucleotídicas de modo que codifiquen proteínas alteradas y constitutivamente activas. En ambos casos, la célula interpreta la señal activando la cascada de señalización correspondiente, lo que dará

lugar a la expresión de nuevos genes o a la modificación de los niveles de expresión de genes ya activados, aumentando la proliferación celular. Además de los factores de crecimiento y sus receptores, los oncogenes pueden codificar otros tipos de proteínas que actúan a diferentes niveles como: proteínas asociadas a la membrana que actúan como transductores de señales para receptores de factores de crecimiento o proteínas citoplasmáticas que participan en diversas vías de señalización intracelular, entre otras.

Como ya hemos mencionado, la activación de oncogenes no constituye la única vía hacia el cáncer. En la gran mayoría de los tumores, la transformación celular es resultado de la combinación de la activación de oncogenes y la anormal inactivación de genes supresores de tumores, apareciendo en casi todos los tipos de cáncer humano la pérdida o mutación de uno o más genes supresores de tumores.

A diferencia de los oncogenes, la alteración de los genes supresores se suelen manifestar con carácter recesivo. Se necesita la alteración de ambos alelos del gen en cuestión para provocar una alteración fenotípica que comprometa la fisiología de la célula. Sin embargo existen excepciones, como es el caso del supresor de tumores *PTEN*. Este gen aparece mutado en gran cantidad de tumores entre los que destacan el cáncer de mama, próstata, ovario, colon y glioma entre otros. El estudio del cáncer en modelos animales ha demostrado que la pérdida de un solo alelo de *PTEN* es suficiente para comenzar un proceso de crecimiento celular anormal colaborando con otras mutaciones en el desarrollo de tumores (Kwon *et al.*, 2008).

En general los genes supresores de tumores se pueden definir como secuencias genómicas cuyos productos son necesarios para el funcionamiento normal de la célula y cuya pérdida de función causa tumores (Marx, 1994; Vogelstein y Kinzler, 1993). En la actualidad se conocen más de una docena de genes supresores de tumores cuyas funciones biológicas normales incluyen: factores de transcripción, enzimas de la maquinaria de reparación del ADN, proteínas que participan en el control de la progresión del ciclo celular y proteínas que participan en la regulación de la apoptosis y senescencia. Por lo tanto, la ruptura del equilibrio entre oncogenes y genes supresores de tumores es una de las claves para llegar a entender el proceso de carcinogénesis (**Figura 1**).

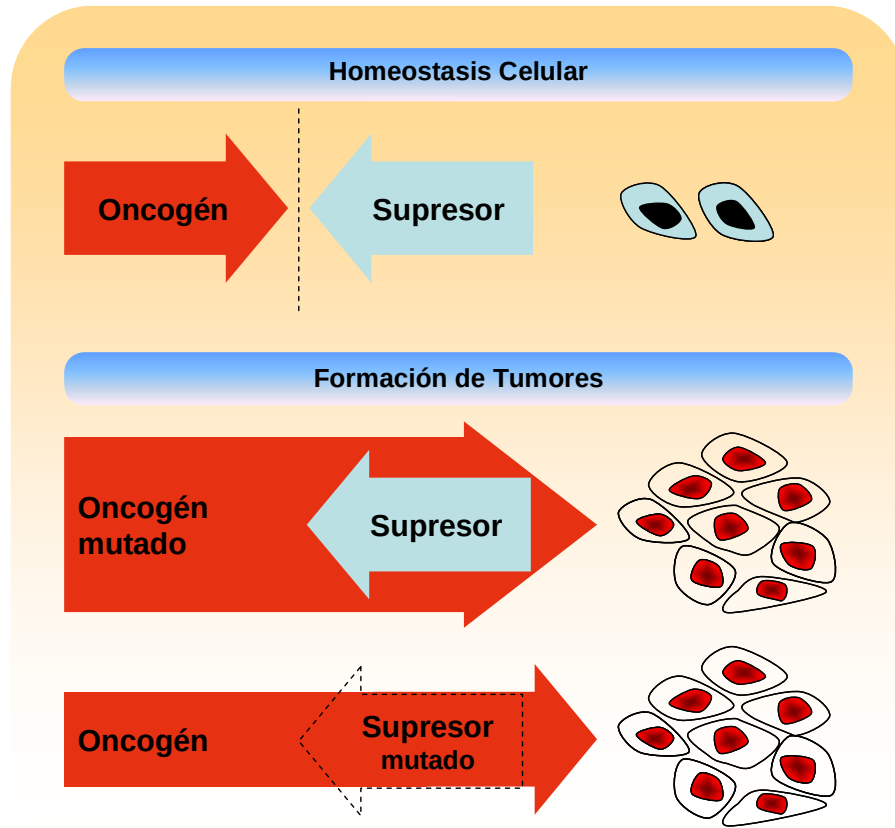


Figura 1. Modelo de la actuación de los oncogenes y genes supresores de tumores sobre la proliferación celular. Las mutaciones en uno u otro tipo de genes producen un desequilibrio que puede desencadenar la aparición de tumores.

1. Transducción de señales y cáncer

El descubrimiento de que RSV (*Rous Sarcoma Virus*) portase en su genoma el gen *v-src*, capaz de transformar células normales en cancerosas, abrió la posibilidad de que las propias células animales contuviesen genes capaces de causar cáncer (Varmus *et al.*, 1972). Junto a este descubrimiento, la existencia de cánceres hereditarios, la aparición de alteraciones cromosómicas en las células cancerosas y la relación entre potencial mutagénico y la capacidad carcinogénica de diversos agentes, permitieron deducir la existencia de los oncogenes.

Es evidente que si los virus son responsables tan solo de un mínimo porcentaje de los cánceres en el hombre, la hipótesis de que el cáncer es consecuencia de la alteración de genes celulares normales, implica la existencia de otros mecanismos de activación.

Finalmente, la identificación de formas mutadas de genes en tumores humanos ha verificado esta hipótesis, existiendo diversos mecanismos a través de los cuales un gen humano puede ser activado adquiriendo capacidad oncogénica. La activación constitutiva de la proteína que codifica un determinado gen por mutaciones puntuales, las deleciones de fragmentos del gen que ocasionen la síntesis de una proteína con función alterada, el aumento del número de copias del gen o la translocación de un determinado gen ocasionando la síntesis de proteínas anormales, truncadas o fusionadas o bien la expresión aberrante de un gen por haberse situado bajo el control de un promotor que no le corresponde, son algunas de las alteraciones que pueden transformar a un gen en oncogén.

1.1. Factores de crecimiento

La proliferación celular esta regulada por diferentes factores, generalmente proteínas presentes en el suero que son activas a concentraciones muy reducidas (del orden de nanomolar) y que reciben el nombre genérico de factores de crecimiento. Estos factores son en su mayoría activadores de la división celular, aunque existen factores que regulan la diferenciación y toda una serie de respuestas celulares como la movilidad, adhesividad, transmisión del impulso nervioso, etc.

En ocasiones las células tumorales pueden sintetizar de forma aberrante factores de crecimiento, produciendo de este modo una estimulación permanente de su crecimiento o el de células vecinas.

El gen *sis* fue el primer gen cuyo producto fue caracterizado como un factor de crecimiento. La forma oncogénica *v-sis* fue identificada en el genoma del virus del sarcoma de mono (Wong-Staal *et al.*, 1981). La comparación, entre la secuencia de *v-sis* y la del gen del factor de crecimiento derivado de las plaquetas o PDGF, reveló una elevada homología, lo que permitió predecir que *v-sis* provenía del gen que codifica la cadena B del PDGF (Dalla-Favera *et al.*, 1981; Robbins *et al.*, 1983). Experimentos de sobreexpresión del gen *PDGF B* o *c-sis* descubrieron su potencial oncogénico al ser capaz de inducir transformación celular (Gazit *et al.*, 1984). Existen muchos otros datos que refuerzan el rol de *PDGF B* como oncogén, de esta forma, se ha encontrado

aumenta su expresión, así como la de sus receptores, en células aisladas de distintos tipos de tumores como: sarcomas, gliomas y algunos carcinomas. Además, se ha observado una inhibición del crecimiento de células tumorales al introducir las versiones mutadas del gen del receptor de PDGF B, y lo que es más significativo, se ha descrito una correlación entre la secreción de PDGF B y el grado tumoral de gliomas humanos. Así, *c-sis* se sobreexpresa en un alto porcentaje de glioblastomas humanos. Por su parte, el gen *PDGF A* es expresado por células de osteosarcoma, melanoma y glioblastoma. Además de la acción mitogénica directa sobre las propias células tumorales, el factor PDGF B induce la aparición de cáncer por un efecto angiogénico, es decir, favorece la vascularización de los tumores por la inducción de crecimiento de las células endoteliales que forman las paredes de los vasos sanguíneos.

Existen otros muchos factores de crecimiento que cuando se sobreexpresan, actúan también como factores oncogénicos. Entre ellos destacan EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- α (*Transforming Growth Factor alfa*), NGF (*Nerve Growth Factor*) o factor de diferenciación de *neu*. Otros genes que codifican factores de crecimiento son: *FGF-3*, *FGF-4* y *FGF-5* (*Fibroblast Growth Factors 3, 4 y 5*), descubiertos como resultado de su activación en carcinomas de mama de ratón, debida a una mutación por inserción del virus MMTV (*Mouse Mammary Tumor Virus*). A pesar de su nombre, estos factores estimulan el crecimiento de numerosos tipos celulares como fibroblastos, células nerviosas y endoteliales, y además inducen la supervivencia neuronal y estimulan la angiogénesis.

1.2. Receptores tirosina quinasa

Los receptores tirosina quinasa (TKRs) se clasifican en más de 16 subfamilias, cada una de las cuales está relacionada con su familia complementaria de proteínas ligando. En ausencia de ligando, los receptores están distribuidos por la superficie celular en estado de reposo, sin enviar ninguna señal. Tras la unión del ligando específico, los receptores se agrupan formando dímeros o oligómeros, de forma que la reorganización inducida en las fracciones citosólicas de los receptores inicia el proceso de señalización ya que permite a los dominios quinasa de las cadenas de receptores vecinas fosforilarse mutuamente en varios residuos tirosina en lo que se denomina autofosforilación. Una

vez activado, el dominio quinasa del receptor transfiere un grupo fosfato del ATP a residuos de tirosina del dominio intracelular de la otra molécula de receptor a la que está asociada. La autofosforilación de la fracción citosólica de los TKRs contribuye de dos maneras a la activación del proceso. Primero, la fosforilación de residuos tirosina en el dominio quinasa incrementa la actividad de la enzima. Segundo, la fosforilación de residuos tirosina fuera del dominio quinasa genera lugares de unión para proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares. Cada una de estas proteínas se une a diferentes lugares fosforilados del receptor activado, reconociendo, además de la fosfotirosina, determinadas características del entorno de la cadena polipeptídica. Cuando se han unido al receptor, muchas de estas proteínas son fosforiladas en tirosinas y son activadas; alternatively, la sola unión puede ser suficiente para activar a la proteína señalizadora. De esta manera, la autofosforilación actúa como un interruptor que desencadena el ensamblaje transitorio de un complejo señalizador intracelular, que permite la transducción de señales a través de varias rutas hacia destinos diversos en el interior de la célula. Como diferentes receptores tirosina quinasa se unen a distintas combinaciones de proteínas señalizadoras, los receptores pueden activar diferentes respuestas.

El primer oncogén identificado como un receptor con actividad tirosina quinasa fue *v-erbB* presente en el virus de la eritroblastosis aviar (Downward *et al.* 1984). Posteriormente, se comprobó que su secuencia era casi idéntica a la del receptor del EGF (Merlino *et al.*, 1984). Por este motivo, al gen que codifica al EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) se le denominó *c-erbB*. El producto de *v-erbB* es una forma truncada del EGFR a la que le falta el dominio extracelular y el extremo carboxiterminal del dominio citoplásmico, ello causa una activación permanente de la proteína, que es capaz de fosforilar residuos de tirosina sin necesidad de unirse a EGF. De esta forma, el EGFR envía de forma constitutiva señales mitogénicas hacia el interior de la célula y en consecuencia, ocasiona el crecimiento descontrolado lo que lleva a la transformación celular.

El oncogén *c-erbB* está amplificado en diversos tumores humanos, como los carcinomas de mama, vejiga, riñón, ovarios y los gliomas. Así por ejemplo, se identificó que ciertos gliomas expresaban un número anormalmente elevado de receptores (Libermann *et al.*,

1985) provocando proliferación celular en presencia de concentraciones muy pequeñas de su ligando. Además, en glioblastomas y carcinomas no microcíticos de pulmón, también se han identificado reordenamientos génicos que originan receptores truncados capaces de inducir transformación.

En la actualidad se han identificado múltiples oncogenes que codifican receptores mutados de factores de crecimiento. Para algunos de estos receptores se conocen sus ligandos, mientras que para otros aún no. La mutación más común de todos estos oncogenes es, como en el caso de *v-erbB*, la delección del dominio extracelular. Es también relativamente frecuente que la causa de la transformación celular sea la sobreexpresión de receptores no mutados, aunque con menor frecuencia, se han encontrado mutaciones activadoras en los dominios extracelulares y transmembrana del receptor.

1.3. Receptores asociados a tirosinas quinasa

Estos receptores no poseen actividad tirosina quinasa propia, pero actúan a través de tirosinas quinasa citoplasmáticas, que están asociadas a ellos. Dentro de las quinasas asociadas a estos receptores se encuentra la familia Src, formada por 8 miembros (Src, Yes, Fgr, Fyn, Lck, Lyn, Hck y Blk). Todos ellos contienen dominios SH2 y SH3 y se hallan localizados en la cara citoplasmática de la membrana plasmática, unidos a ella en parte a través de su interacción con los receptores y en parte por su unión covalente a cadenas lipídicas. Su activación se produce cuando un ligando se une al receptor, lo que provoca un cambio conformacional del dominio citoplasmático del receptor.

Un segundo grupo de receptores asociados a tirosinas quinasa son las integrinas que reconocen componentes de la matriz extracelular. La unión de componentes de la matriz a las integrinas puede activar cascadas de señalización intracelular entre las que se encuentra la tirosina quinasa citosólica FAK (quinasa de adhesión focal). Una vez unida la cola citoplasmática de una de las subunidades de integrina, las moléculas de FAK se fosforilan generando lugares de unión para la quinasa Src. De esta forma Src y FAK se fosforilan mutuamente, y fosforilan a otras proteínas indicando a la célula que se ha adherido a un sustrato apropiado.

Un último grupo de receptores asociados a tirosinas quinasa son los receptores de las citoquinas. Estos receptores constituyen la familia de receptores más heterogénea y amplia. En esta familia se incluyen no solo los receptores de citoquinas, sino también receptores de algunas hormonas como la hormona de crecimiento y la prolactina. Estos receptores están asociados en su dominio citoplásmico a moléculas tirosina quinasa, como JAK, que activan proteínas reguladoras de la expresión génica en estado latente llamadas STAT. Normalmente las proteínas STAT están inactivas y se localizan cerca de la membrana celular; la unión de una hormona o citoquina a su receptor provoca que migren hacia el núcleo, donde activan la transcripción génica.

1.4. Receptores asociados a proteínas G

Los receptores asociados a proteínas G median las respuestas celulares de una enorme diversidad de moléculas de estructura y función muy variada, dentro de las que se incluyen proteínas, pequeños péptidos y derivados de aminoácidos y ácidos grasos. Sin embargo, a pesar de la diversidad química y funcional de las moléculas señal que se unen a los receptores asociados a proteína G, todos ellos comparten una estructura similar. Estos receptores están formados por una sola cadena polipeptídica que atraviesa siete veces la bicapa lipídica y están asociados a proteínas G (proteínas triméricas de unión a GTP), las cuales son las encargadas transmitir la señal hacia el interior de la célula.

Cuando se produce la unión receptor-ligando, estos receptores sufren un cambio conformacional que les permite activar a las proteínas G que se encuentran unidas a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Las proteínas G están compuestas por tres subunidades (α , β y γ). En su estado no estimulado, la subunidad α se encuentra unida a GDP y la proteína G permanece inactiva. Cuando el receptor es estimulado por un ligando, la subunidad α libera su GDP, permitiendo que en su lugar se una GTP. Este intercambio hace que el trímero se disocie en dos componentes activados, la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$. Este cambio permite que la subunidad α cambie su conformación tridimensional e interaccione con su proteína diana. Por otra parte, el complejo $\beta\gamma$ no cambia su conformación, pero la superficie que estaba antes enmascarada por la subunidad α ahora puede interactuar con un segundo conjunto de proteínas diana. Las

proteínas diana de los componentes disociados de la proteína G son enzimas o canales iónicos de la membrana plasmática, activando las vías de señalización intracelular. Una vez que la subunidad α hidroliza el GTP que lleva unido, se reasocia con el complejo $\beta\gamma$ para constituir una proteína G inactiva, revirtiendo así el proceso.

Algunas proteínas G señalizan regulando la producción de AMP cíclico. El AMP cíclico es un pequeño mediador intracelular que puede variar más de veinte veces sus niveles en cuestión de segundos a causa de una señal extracelular. Esta capacidad de respuesta requiere que la rápida síntesis de la molécula esté compensada por una rápida degradación. El AMP cíclico se sintetiza a partir de ATP mediante una enzima unida a la membrana plasmática, la adenilato ciclasa, y es continuamente destruido mediante una o varias fosfodiesterasas de AMP cíclico, que lo hidrolizan. Muchas moléculas señal extracelulares actúan controlando los niveles de AMP cíclico, y lo hacen aumentando la actividad de la adenilato ciclasa y no disminuyendo la actividad de la fosfodiesterasa.

Existen oncogenes que codifican receptores asociados a proteínas G. Muchos de estos oncogenes son capaces de transformar células en cultivo una vez activados por sus ligandos. Este es el caso del receptor de la hormona tirotrópica o TSHR que se expresa en el epitelio de la tiroides asociado a una proteína G que eleva los niveles intracelulares de AMP cíclico mediante la estimulación de la adenilato ciclasa situada en la membrana. En varios carcinomas tiroideos se han encontrado versiones mutadas permanentemente activas de este receptor, que causan la actividad continua de la adenilato ciclasa y la estimulación anormal del crecimiento celular.

1.5. Transducción de señales al núcleo

Como hemos visto anteriormente, un importante grupo de proteínas con actividad tirosina quinasas no son receptores integrados en la membrana celular, sino que están localizadas en el citoplasma asociadas al lado interno de la membrana. La activación de estas proteínas depende precisamente de su unión a la membrana, que tiene lugar mediante un lípido, el ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) que se une al segundo aminoácido de la cadena tras la eliminación de la metionina inicial. En algunos

casos, la falta de regulación de su actividad causa la transformación oncogénica, siendo el gen *src* el prototipo de este grupo de oncogenes. Tras el descubrimiento del gen *src* en células animales (Varmus *et al.*, 1972), se describió la actividad quinasa de la proteína que codificaba (Purchio *et al.*, 1978). Hoy se conocen otros genes cuyos productos son tirosina quinasas homólogos a *src*, como *v-yes* y *v-fgr* y otros genes con igual actividad pero sin capacidad oncogénica conocida (*Ick*, *fyn*, *lyn*, *hck*, *blk*, *yrk*) que intervienen en la transmisión de distintas señales desde la membrana al interior celular.

La activación de Src está regulada por la fosforilación de dos residuos tirosina. Cuando el residuo Tyr⁵²⁷ se encuentra fosforilado, Src permanece inactiva ya que el dominio SH2 de Src permanece unido a Tyr⁵²⁷, provocando una conformación incompatible con la actividad quinasa. La activación de la proteína Src tiene lugar cuando los receptores de factores de crecimiento son auto- o transfosforilados. Entonces, el dominio SH2 cambia su unión a la Tyr⁵²⁷ por su unión a residuos específicos de Tyr fosforilados en dichos receptores, lo que conlleva un cambio conformacional y la desrepresión de su actividad tirosina quinasa. Una vez activada, Src se autofosforila en el residuo Tyr⁴¹⁶, lo que la capacita para fosforilar otros sustratos.

La proteína oncogénica v-Src del virus del sarcoma de Rous está activa permanentemente debido a una delección de 19 aminoácidos en su extremo carboxiterminal que incluye la Tyr⁵²⁷, lo que hace que no necesite la presencia en su entorno de residuos de fosfotirosina en receptores de factores de crecimiento. El gen *csk* (*c-terminal src kinase*), que codifica la quinasa que regula negativamente la actividad de Src es también otro oncogén, ya que sus mutación provoca la activación permanente de la proteína Src.

Src también capaz de activar al producto del oncogén *ras*, formando parte de la transducción de la señal mitogénica. Aunque no se han identificado reordenamientos ni mutaciones activadoras en el gen *src* en tumores humanos, si se han encontrado niveles elevados de actividad de Src en diversos sarcomas y tumores de mama respecto al tejido normal, generalmente asociados a la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento.

1.5.1. La vía de Ras

Las proteínas Ras son proteínas G monoméricas encargadas de regular las respuestas celulares a diversos estímulos extracelulares mediante la transmisión de señales desde receptores de la membrana celular al núcleo (Bourne *et al.*, 1990; Vetter y Wittinghofer, 2001). Los genes que codifican a los distintos miembros de la familia Ras están muy conservados evolutivamente, lo que sugiere que estas proteínas desempeñan un papel de gran importancia en los procesos celulares. En mamíferos hay tres genes cuya estructura y función es muy parecida: *H-ras*, *K-ras* y *N-ras* que codifican sendas proteínas (HRas, KRas y NRas). Están compuestos por cinco exones codificantes y un exón 5' no codificante, y difieren estrechamente en el tamaño y en la secuencia de intrones (Barbacid, 1987).

Las proteínas Ras se encuentran unidas a través de residuos Cys¹⁸⁶ a la cara interna de la membrana donde su activación está regulada por la unión e hidrólisis de nucleótidos de guanina. Una vez localizadas en la membrana, estas proteínas alternan entre la forma inactiva, unida al nucleótido difosfato GDP, y la forma activa, unida al nucleótido trifosfato GTP, que le permite interaccionar con moléculas efectoras (Donovan *et al.*, 2002). Dado que las actividades GTPasa e intercambiadora de GDP/GTP intrínsecas de Ras resultan demasiado lentas para que Ras sea efectivo, se requiere la interacción directa con proteínas reguladoras. Estas proteínas reguladoras incluyen factores intercambiadores de nucleótidos (GEFs) y proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs). Los GEFs promueven el reemplazo del GDP unido a Ras y la posterior captación de GTP del citosol (Downward, 1996). Sos es uno de los GEFs que juega un papel clave en la estimulación de Ras a través de TKRs y receptores acoplados a proteínas G (Downward, 1997 **Figura 2**). Tras este proceso de activación de Ras, el GTP es hidrolizado a GDP y Ras vuelve a su estado inactivo. Esta reacción es llevada a cabo por la actividad GTPasa intrínseca de Ras pero es potenciada por GAPs aumentando la velocidad de hidrólisis del GTP (Ahmadian *et al.*, 1997).

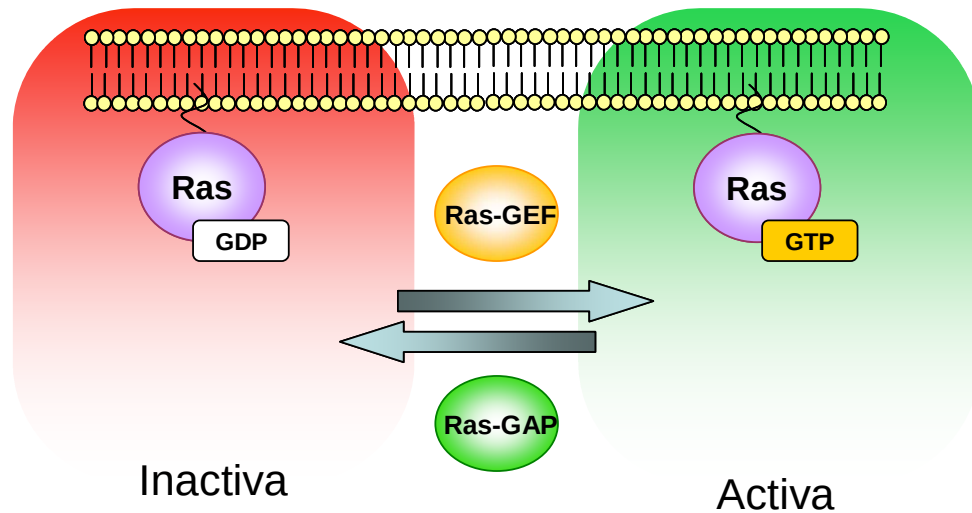


Figura 2. Regulación de la actividad de la proteína Ras por la GTPasa (Ras-GAP) y la Ras-GEF (Sos).

Como ya hemos mencionado, las proteínas Ras regulan la respuesta de muchos estímulos extracelulares. Ras funciona como un interruptor biológico transmitiendo señales mitogénicas procedentes del exterior de la célula mediante la activación de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), entre otras cascadas de señalización (**Figura 3**).

La importancia de las rutas de Ras en el control de la proliferación se hace patente al observar que en una gran cantidad de tumores humanos presentan mutaciones activadoras de Ras, que tienen como consecuencia la hiperactivación de esta ruta estimuladora de la proliferación. Dentro de los principales mecanismos de activación de oncogenes (amplificación, translocación y mutación puntual), el oncogén *Ras* es el prototipo de activación de oncogenes por mutación puntual. La mutación puntual implica el cambio de un nucleótido por otro en la secuencia de DNA. En el caso de *Ras*, las mutaciones puntuales en 3 de los 189 codones que lo forman (codones 12, 13 o 66) dan lugar a una proteína constitutivamente activa que no requiere de señales externas para estimular proliferación celular, ya que se mantiene activada al no liberar GTP. *Ras* es el oncogén activado con mayor frecuencia en tumores humanos y también en lesiones preneoplásicas. Se han encontrado mutados algunos de los tres genes de la familia de Ras entre un 20% y un 30% del total de tumores humanos, aunque la incidencia varía según el tipo de tumor. La mayor incidencia de la mutación en Ras ha sido detectada en

adenocarcinoma de páncreas (90%), en carcinoma colorectal (50%) y en adenocarcinoma de pulmón (30%). La gran incidencia de mutaciones de Ras en tumores humanos revela la importancia de la familia de Ras y la correcta activación de la vía en la regulación de la proliferación celular.

1.5.2. Cascada de las MAPKs

Como hemos visto, las fosforilaciones en tirosina y la activación de Ras, estimuladas por receptores de membrana activados, tienen una vida muy corta. Para poder estimular la proliferación o la diferenciación celular, estos cortos eventos han de convertirse en eventos más duraderos para mantener la señal y transmitirla hacia el núcleo para regular la expresión génica. Esta conversión desencadena la activación de Ras, al iniciar varias cascadas de fosforilación en serinas/treoninas, las cuales son procesos más duraderos. En estas cascadas participan muchas serinas/treoninas quinasa, pero tres de ellas forman el módulo central de la cascada de MAPKs, también conocida como cascada Raf-MEK-ERK en mamíferos, la ruta efectora dependiente de Ras mejor caracterizada (**Figura 3**). Una característica extraordinaria de las MAPK es que su total activación requiere la fosforilación conjunta de una treonina y de una tirosina, que en la proteína se encuentran separadas por un solo aminoácido (Payne *et al.*, 1991).

Las proteínas quinasas de la familia Raf, son los primeros efectores de Ras identificados en células de mamíferos. Se conocen tres Raf serina/treonina quinasa (A-Raf, B-Raf y Raf1 o c-Raf) que activan la cascada de MAPKs. La proteína Ras activada se une a Raf (Vojtek, 1993), y lo transloca a la membrana plasmática donde Raf es activada y fosforila las MAPKKs MEK1 y MEK2, que a su vez fosforilan las MAPKs ERK1 y ERK2 (*extracellular mitogen-regulated kinase*). El requerimiento de fosforilación doble en tirosina y treonina asegura que la ERK se mantenga en estado inactivo a no ser que su MAPKK la active específicamente. La fosforilación de ERK1/2 promueve su homodimerización y su translocación al núcleo, donde activan por fosforilación directa la transcripción de factores como Elk-1, Jun, Fos y ATF entre otros. Quizás la mayor diana de la señalización por la ruta de las MAPKs es el factor de transcripción proteína activadora-1 (AP-1).

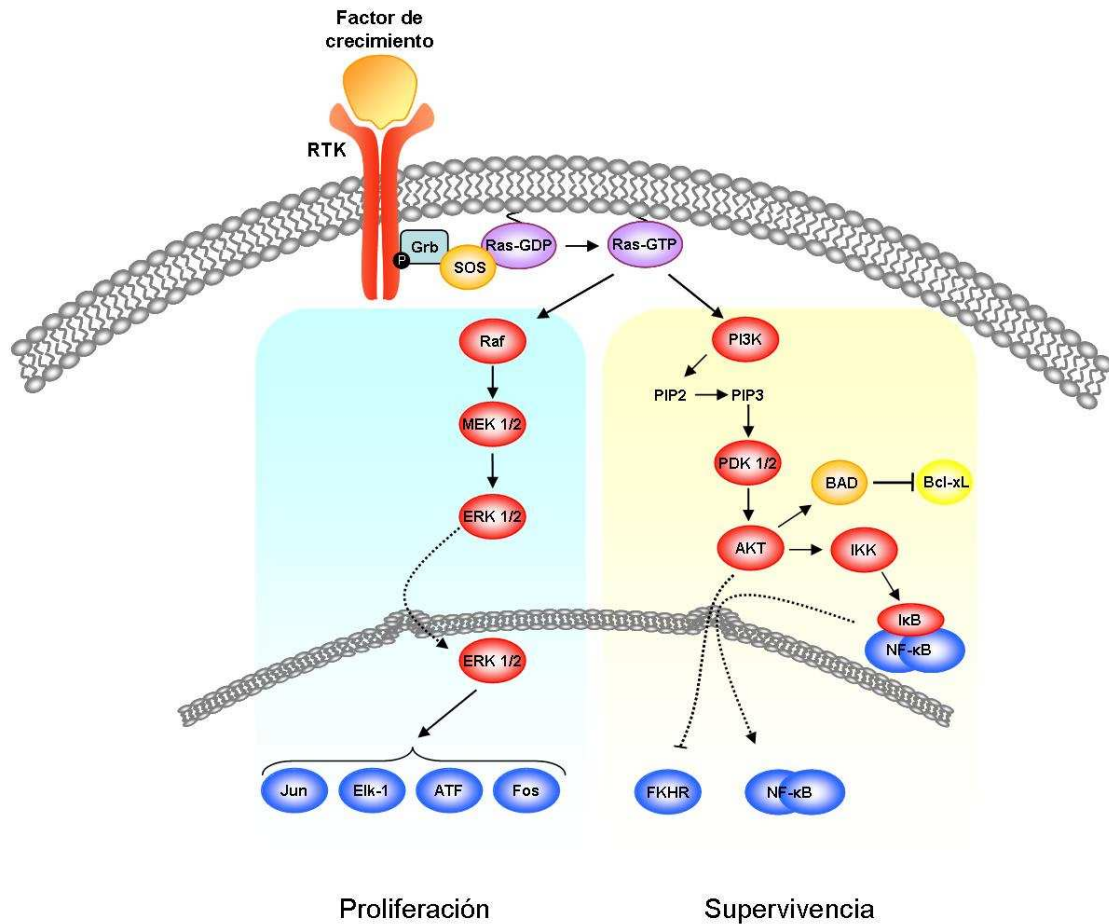


Figura 3. Vías de señalización de MAPKs y PI3K. La señalización a través de receptores de membrana como los TKRs induce proliferación celular mediante la activación de la vía de las MAPKs (MEK/ERK). La activación de la vía PI3K/AKT induce supervivencia.

AP-1 es un factor de transcripción formado por el dímero Jun/Fos o Jun/ATF. La activación de la cascada de las MAPKs por parte de Ras regula la actividad transcripcional, estabilidad y los niveles ARNm de los diferentes componentes de AP-1 y de otros factores de transcripción, favoreciendo la transcripción de proteínas que controlan la progresión del ciclo celular, constituyendo una de las vías clave de señalización a través de la cual Ras ejerce su efecto proliferativo (**Figura 3**).

1.5.3. La vía PI3K-Akt

Para poder proliferar, la mayoría de las células necesitan ser estimuladas tanto para aumentar su tamaño, como para dividirse. En algunos casos, una misma proteína señal

realiza ambas funciones. En otros, unas proteínas mayoritariamente estimula la división celular, mientras que otras estimulan el crecimiento celular. Una de las principales vías de señalización intracelular que conducen al crecimiento celular implica a la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Esta quinasa no fosforila proteínas sino fosfolípidos de inositol. Se activa por receptores tirosina quinasa, receptores asociados a tirosina quinas y algunos asociados a proteínas G. El fosfatidilinositol (PI) es el único de los lípidos de membrana que puede ser fosforilado reversiblemente en varios lugares, lo que genera una gran variedad de fosfolípidos de inositol. Cuando se activa, la PI3K cataliza la fosforilación de fosfolípidos de inositol en la posición 3 del anillo de inositol, lo que genera los fosfoinosítidos PIP2 o PIP3 (Malumbres y Pellicer, 1998). Tanto PIP2 como PIP3 actúan como sitios de unión para proteínas señalizadoras intracelulares, juntando dichas proteínas en complejos de señalización, que transmiten la señal desde la cara citosólica de la membrana plasmática hacia el interior de las células.

Una de las maneras a través de las cuales los factores de crecimiento pueden estimular el crecimiento celular es incrementando la velocidad de síntesis proteica mediante el incremento de la eficiencia de traducción por los ribosomas de ciertos ARNm. La quinasa p70 S6 fosforila y activa la proteína S6 de los ribosomas, lo que incrementa la traducción de un subgrupo de ARNm que codifican proteínas ribosómicas y otros componentes del aparato traduccional. La activación de la quinasa p70 S6 es un proceso complejo que depende de PDK1. Por otra parte, PI3K también es capaz de activar Rac, un miembro de la familia de GTPasas Rho, de la cual parece tener cierta importancia en los procesos de transformación provocados por Ras oncogénico en ciertos contextos celulares (Malliri *et al.*, 2002).

Una de las vías por las que la PI-3K estimula la supervivencia celular es a través de la fosforilación de las proteínas quinasas PDKs y Akt (Vivanco y Sawyers, 2002). Las quinasas PDK1 y 2 son las encargadas de fosforilar a Akt, que una vez activada promueve supervivencia celular a través de dos vías distintas: la primera, por medio de fosforilación y consiguiente inactivación de varias proteínas pro-apoptóticas que incluyen a BAD (*Bcl2 antagonist of cell death*) y FKHR (*forkhead in rhabdomyosarcoma*). La segunda, es mediante la activación de IKK- α que en última instancia provoca la activación de NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer*

of activated B cells) estimulando la supervivencia celular (Vivanco y Sawyers, 2002). Además de la inhibición de la apoptosis, la vía PI3K/Akt controla otros procesos celulares incluyendo el aumento de la actividad metabólica por inhibición de GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), la translocación de GLUT4 (*Glucose Transporter 4*) a la membrana plasmática dependiente de insulina, la síntesis de proteínas regulada por la activación de mTOR, promoviendo la supervivencia celular a través de la regulación de BAD o NF- κ B y activando factores de transcripción de la familia Foxo que a su vez permite la transcripción de múltiples genes implicados en supervivencia, reparación del ADN, metabolismo, etc (**Figura 3**).

La vía de AKT se encuentra modulada por el supresor de tumores PTEN (*Phosphatase and Tensin Homology*). La proteína PTEN actúa como una fosfatasa defosforilando a PIP3. PTEN cataliza específicamente la defosforilación de PIP3 a PIP2 inhibiendo la ruta de señalización de AKT. Este supresor de tumores se encuentra mutado en una gran cantidad de tumores humanos, destacando entre ellos a los glioblastomas multiformes (GBMs) de los cuales el 75-90% presentan pérdida de heterocigosidad de PTEN (Lang *et al.*, 1994). Durante el desarrollo del tumor la delección o mutación de PTEN provoca la activación descontrolada de AKT incrementando la proliferación y la supervivencia celular.

2. Regulación del ciclo celular

La proliferación celular es un proceso regulado. Las células proliferan, aumentando por un lado su contenido de moléculas y orgánulos, es decir, produciéndose un crecimiento en masa o tamaño, y por otro, duplicando y segregando sus cromosomas. Ambos procesos permiten a la célula dividirse en dos células hijas genéticamente iguales. La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del organismo: mientras que las neuronas no se dividen y las células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos se renuevan cada tres años, las células del hígado se dividen una vez al mes, y los precursores hematopoyéticos de la medula ósea o las del epitelio intestinal generan de modo continuo nuevas células para asegurar el mantenimiento del tejido del que forman parte.

Pero cuando la proliferación celular deja de ser un proceso regulado, se convierte en un proceso capaz de originar un cáncer.

2.1. Fases del ciclo celular

La serie de eventos mediante los que una célula genera dos células hijas se denomina ciclo celular, y comprende el periodo entre dos divisiones mitóticas. Consta de cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M. En su conjunto, y aunque con variaciones dependiendo del tipo celular, el ciclo completo tiene una duración de 24 horas.

La fase G_1 (del inglés *Gap* o intervalo) es el periodo que sigue a una división celular, previa a la síntesis o replicación del DNA. Durante este tiempo la célula dobla su tamaño y su masa debido a la síntesis continua de todos sus componentes. Hay células que pueden parar su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo, en lo que se denomina fase G_0 .

En la fase G_1 existe un punto de control llamado “punto de restricción R” en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de DNA, y que las condiciones ambientales son favorables (presencia de nutrientes, sales y temperatura adecuadas).

La fase S corresponde al tiempo durante el cual se replica el DNA de la célula. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de DNA de cadena doble, que son copia una de la otra. Durante esta fase se expresan ciertos genes necesarios para este proceso como los de las histonas.

El periodo comprendido entre la finalización de la replicación del DNA y el inicio de la división es la fase G_2 . Durante este periodo, las células se preparan para la escisión en dos células hijas. En esta fase existe un segundo punto de control G_2 -M, en el que la célula debe comprobar dos condiciones antes de dividirse: La primera, que ha duplicado la masa celular pudiendo dar lugar a dos células hijas. La segunda, que se ha completado la replicación del DNA y que ésta se ha realizado una sola vez. Finalmente, las células entran en la fase de mitosis M propiamente dicha.

En la fase M, los cromosomas se condensan haciéndose visibles al microscopio óptico y los microtúbulos se organizan a partir de dos cuerpos polares situándose en ambos extremos de la célula formando el huso mitótico que servirá como guía a los cromosomas. Durante la primera fase de la mitosis (profase), desaparece la membrana nuclear. A continuación, los cromosomas se unen por medio de los cinetocoros, unas estructuras asociadas a los centrómeros, a los microtúbulos en la zona media celular formando la placa ecuatorial (metafase). Es entonces cuando la célula ha de superar otro punto de control, punto de control M, que solo permite seguir adelante si todos los cromosomas están alineados sobre el huso. Si esto es así, las cromátidas hermanas se separan, yendo cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando llegan a los extremos (telofase), la célula comienza a escindirse (citocinesis) por la zona media dando lugar a dos células hijas. El reparto de los demás componentes tiene lugar prácticamente por el flujo de citoplasma, sin que se conozca ningún mecanismo que asegure una distribución exactamente igualitaria como ocurre con los cromosomas. La membrana nuclear vuelve a formarse y los cromosomas a descondensarse. La existencia de puntos de control es clave, permitiendo que todo el proceso tenga lugar cuando la célula esta correctamente preparada mediante una triple comprobación de que se han dado las condiciones necesarias para iniciar una nueva fase. Quizás el punto de control R sea el más importante, ya que una vez superado, la célula se compromete a continuar la replicación y se hace independiente de señales externas como factores de crecimiento o inhibidores del mismo, dependiendo únicamente de las proteínas del propio ciclo celular que regulan de forma controlada su progresión.

2.2. Los complejos Ciclina/Cdk

La progresión a lo largo del ciclo celular desde un estado de quiescencia o desde la fase M está asociado a la activación secuencial de unas proteínas quinasas heterodiméricas compuestas por una subunidad catalítica denominada Cdk (*cyclin-dependent kinases*) y una subunidad reguladora conocidas como ciclinas (**Figura 4**). En el genoma de los mamíferos se conocen doce locis que codifican Cdk, aunque solamente cinco de ellos (Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4 y Cdk6) han sido implicados en la regulación del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2005; Chen *et al.*, 2006). Durante las distintas fases del ciclo celular, la diferente concentración de ciclinas es crítica para formar y destruir

complejos ciclina/Cdk, existiendo un ciclo de síntesis y degradación de ciclinas que activa y desactiva secuencialmente, a lo largo del ciclo, distintos complejos ciclina/Cdk (Graña *et al.*, 1998; **Figura 4**).

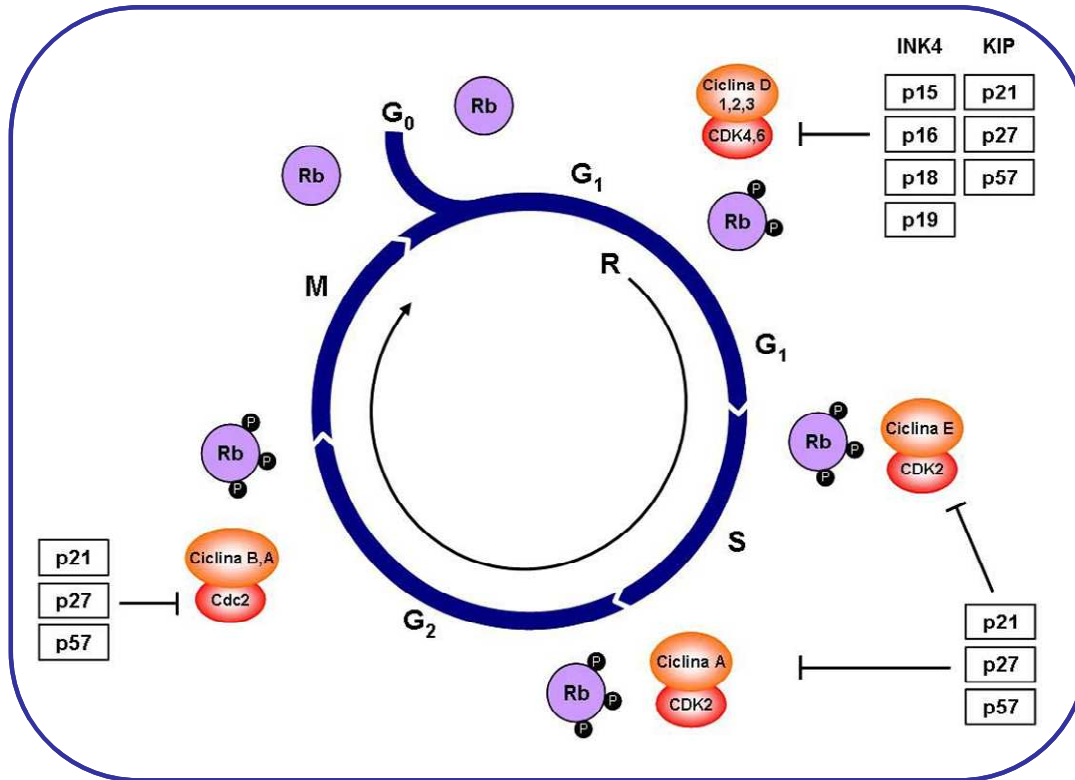


Figura 4. El ciclo celular. El esquema muestra las distintas etapas del ciclo y la secuencia de fosforilación de Rb a lo largo del ciclo por los distintos complejos Ciclina/Cdks.

Mientras que la Cdk1 es generalmente considerada como una quinasa mitótica, el resto de Cdks juegan un su papel en las fases tempranas del ciclo celular. La progresión a través de de la fase G₁ es regulada por un complejo mecanismo que implica al menos a tres Cdks (Cdk4, Cdk6 y Cdk2) y sus ciclinas reguladoras (Sherr y Roberts, 1999; Malumbres y Barbacid 2005). Inicialmente, los estímulos mitogénicos inducen la síntesis de las ciclinas tipo D (D1, D2 y D3), formándose los complejos activos ciclina D/Cdk4, 6. La activación de estos complejos implica la fosforilación de las proteínas *pocket* Rb, p107 y p130. Estas proteínas contiene múltiples sitios de fosforilación para Cdks. Estudios *in vitro* han desvelado que no existe gran diferencia entre Cdk4 y Cdk6, o entre las distintas ciclinas D. De esta manera, es probable que la única diferencia

radique en la especificidad de tejido y/o su activación diferencial durante el desarrollo (Ciemerych y Sicinski, 2005).

La fosforilación de Rb por los complejos ciclina D/Cdk4, 6 permite la transcripción de genes por parte del factor de transcripción E2F, el cual se encuentra inhibido en el complejo Rb-E2F. Precisamente, unas de las dianas transcripcionales de E2F son ciclinas tipo E, requeridas para la activación de Cdk2. El complejo ciclina E/Cdk2 presenta su pico de actividad máxima durante la fase G₁ media-tardía, fosforilando de forma irreversible a Rb correspondiéndose con el “punto de restricción R” (Malumbres y Barbacid, 2005). El “punto de restricción R” ha sido definido como el punto de la fase G₁ a partir del cual la célula deja de ser dependiente de estímulos mitogénicos para continuar con el proceso de división celular.

Además de la fosforilación de Rb, el complejo ciclina E/Cdk2 parece ser esencial para iniciar la replicación del ADN. Una vez que la célula entra en la fase S es necesario que el complejo ciclina E/Cdk2 sea silenciado para impedir una doble replicación del ADN (Hwang y Clurman, 2005). La ciclina Cdk2 no permanece asociada durante mucho tiempo a la ciclina E, interactuando con las ciclinas A1 y A2 presentes durante la fase S, contribuyendo al mantenimiento de la fosforilación de las proteínas *pocket* entre otras proteínas durante esta fase.

Al final de la fase S, las ciclinas A se asocian a con Cdk1. Los complejos ciclina A/Cdk1 y ciclina A/Cdk2 comparten varios sustratos implicados en la replicación del ADN y en el control del ciclo celular. Durante la fase G₂ la ciclina A es degradada mientras que las ciclinas tipo B se sintetiza activamente. Como consecuencia, estas ciclinas forman complejos con Cdk1 siendo parte esencial para regular la transición G₂-M y la progresión a través de la mitosis.

Diferentes análisis bioquímicos a lo largo de los últimos quince años han asentado las bases de un modelo de división celular en el que Cdks específicos son los responsables de conducir cada fase del ciclo celular. De esta forma, la rotura de los complejos formados por las proteínas *pocket* y E2F requiere la acción secuencial de ciclina D/Cdk4, 6 y ciclina E/Cdk2 a lo largo del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2005).

Sin embargo, recientes evidencia genéticas, obtenidas con ratones modificados genéticamente han cambiado los conceptos básicos que se tenían al respecto. Tal es así, que la falta de Cdk4 y Cdk6 (Malumbres *et al.*, 2004) así como la falta de Cdk4 y Cdk2 no impide la proliferación normal de MEFs. Experimentos realizados *in vivo*, mediante la utilización de ratones mutantes simples y dobles de Cdks, muestran defectos en la proliferación pero solamente en tejidos específicos. Realmente, solo aquellos ratones carentes de Cdk1 (Santamaría *et al.*, 2007), ciclina A2 y posiblemente ciclina B1, presentan alteraciones importantes en fases tempranas del desarrollo (Murphy *et al.*, 1997; Brandeis *et al.*, 1998). Lo cual indica que la actividad de Cdk1 es la única que no puede ser compensada por otras Cdks. Estos experimentos sugieren un cierto grado de redundancia en la actividad de las Cdks en el control del ciclo celular.

2.3. CKIs, Inhibidores de los complejos Ciclina/Cdk

Existe un tipo de proteínas, llamadas CKIs (*Cdks Inhibitors*), que juegan un papel fundamental en la regulación del ciclo, actuando de forma opuesta a las ciclinas mediante la inhibición de Cdks, previniendo la fosforilación de Rb y por lo tanto inhibiendo la proliferación celular (**Figura 4**).

En mamíferos han sido identificadas dos clases de CKIs, éstas difieren tanto en su estructura, mecanismo de acción y especificidad. La primera de ellas es la familia de *cip/kip* formada por p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}, e inhiben a todas las Cdks que actúan durante la fase G₁ y S. Los miembros de la segunda familia *ink4*, compuesta por p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} se asocian específicamente a Cdk4 y Cdk6 siendo eficientes inhibidores de su actividad quinasa al evitar la unión con la ciclina D (Serrano, 1993). Las cuatro proteínas INK4 tienen una actividad bioquímica muy similar, pero se caracterizan por una regulación transcripcional específica.

El locus *ink4a/ARF*, frecuentemente inactivado en numerosos cánceres humanos, codifica dos proteínas supresoras de tumores diferentes, las cuales funcionan como reguladoras del ciclo celular. La primera de ellas es la ya mencionada p16^{INK4a}, la cual actúa activando a Rb. El otro transcrito codificado por el locus *ink4a/ARF* es p19^{ARF}

(también llamado p14^{ARF} cuando nos referimos específicamente a la proteína en humano; Quelle *et al.*, 1995). A pesar de encontrarse en el mismo locus, *ink4a* y *ARF* presentan promotores independientes. La función de p19^{ARF} es la de estabilizar al supresor de tumores p53, inhibiendo la actividad ubiquitin-ligasa de MDM2 secuestrando a ésta en el núcleo (Honda y Yasuda, 1999; Weber *et al.*, 1999). Aunque en principio p19^{ARF} no se puede considerar un CKI, la existencia de múltiples niveles de entrecruzamiento entre las rutas de p19^{ARF}/p53 y p16^{INK4a}/Rb, hacen que p19^{ARF} sea capaz de prevenir la total fosforilación de Rb, ya que a través de p53 se activa la expresión de p21^{CIP1}, inhibiendo el complejo Ciclina A, E/Cdk2 (Cheng *et al.*, 1999).

Como se puede comprobar, el papel central que desempeña Rb en el control de la división celular está acompañado de una intrincada red de proteínas que colaboran para que este proceso se lleve a cabo con una gran precisión. Esto hace que sea necesaria la existencia de cierta redundancia en la función de muchas de las proteínas implicadas en el control de todo el proceso. La delección de *Rb1* o bien mutaciones en las proteínas que forman parte de esta compleja maquinaria hacen peligrar la integridad de todo el proceso de división celular y puede provocar la aparición de cáncer.

2.4. El gen del retinoblastoma

El gen del retinoblastoma *Rb1* causante del retinoblastoma infantil fue el primer gen supresor de tumores identificado y uno de los genes mejor estudiado (Friend, 1998). Además, la pérdida de este supresor de tumores es una de las mutaciones más frecuentes en gliomas humanos de alto grado.

El retinoblastoma es un cáncer de retina infantil poco común que afecta aproximadamente a uno de cada 20.000 ó 30.000 niños (Knudson, 1971). Esta enfermedad afecta a las células precursoras neuronales de la retina. A pesar de que el retinoblastoma puede presentarse a cualquier edad, aparece con mayor frecuencia en los cinco primeros años de vida del individuo, cuando estas células están aún en proceso de división. Es la mutación de ambos alelos del gen *Rb1* lo que desencadena la aparición del tumor. Cuando el retinoblastoma es esporádico (60% de los casos), ambas mutaciones inactivadoras del gen *Rb1* se producen durante el desarrollo de la retina y

sólo se ve afectado uno de los ojos y por un único tumor. Por otra parte, la forma hereditaria de la enfermedad (retinoblastoma familiar) lleva asociado una mutación recesiva de los progenitores y otra mutación adquirida durante los primeros años de vida. Esta forma de la enfermedad se caracteriza por la aparición de múltiples tumores independientes, que afectan a ambos ojos del enfermo y principalmente a niños de corta edad.

Debido a que Rb (producto del gen *Rb1*) desempeña un papel crucial en el control del ciclo de celular, la pérdida o inactivación del gen *Rb1* y por lo tanto de la proteína Rb es un factor de gran importancia en la aparición de otros tipos de cánceres humanos. De hecho, la mutación de *Rb1* es una de las más frecuentes, encontrándose en un 50% de los cánceres de adultos. Entre ellos podemos destacar: sarcomas, carcinomas de pulmón, vejiga, mama, esófago, próstata, cuello uterino y algunas leucemias. Estos y otros cánceres aparecen más tardíamente en la vida que el retinoblastoma y en tejidos diferentes, pero en todos ellos *Rb1* coopera con otras mutaciones en oncogenes u otros genes supresores de tumores, siendo la pérdida de *Rb1* un paso importante en la progresión hacia la malignidad. Así, aunque el retinoblastoma es poco común, los cánceres en los que está implicado el gen de *Rb1* son muy abundantes, siendo las alteraciones del gen de *Rb1* el prototipo de la inactivación por delección.

2.4.1. La familia de retinoblastoma.

La proteína Rb (928 aminoácidos) es codificada por el gen retinoblastoma *Rb* localizado en la banda q14 del cromosoma 13 humano con una extensión de 200 kb y 27 exones. La proteína Rb es fosforilada específicamente en la transición G₁-S y permanece así hasta el final de la fase M. Cuando Rb está hipofosforilada se une e inhibe a varias proteínas, entre ellas a factores de transcripción de la familia de E2F que controlan la expresión de genes críticos en la síntesis de ADN. De esta forma, Rb bloquea la progresión de las células manteniéndolas en fase G₁. Sin embargo, tras su fosforilación Rb ya no es capaz de unirse y bloquear a estos factores de transcripción promoviendo la entrada en fase S y permitiendo la progresión del ciclo celular.

Además de Rb, la familia de retinoblastoma, está constituida por las proteínas p107 (Ewen *et al.*, 1991) y p130 (Hannon *et al.*, 1993; Mayol *et al.*, 1993) codificadas por los genes *RBL1* y *Rb2*, que también participan en la regulación del ciclo celular. Esta familia de proteínas son conocidas como proteínas *pocket*, ya que presentan una región común a todas ellas denominada *pocket* (**Figura 5**) compuesta por dos PDs (*Pocket Domain*): PD-A y PD-B. Los PDs son fundamentales para la unión y regulación de muchas proteínas celulares incluyendo al factor de transcripción E2F.

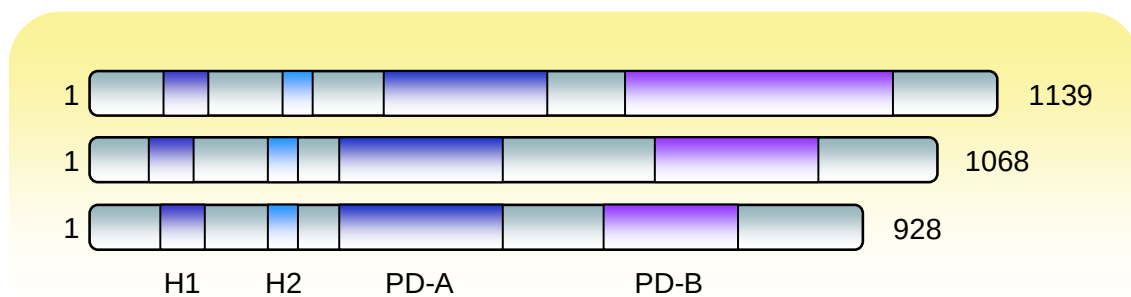


Figura 5. Estructura de las proteínas de la familia Rb. Dominios altamente conservados (H1 y H2), dominios *pocket* (PD-A y PD-B).

Estos dominios presentan también gran afinidad por oncoproteínas virales como el antígeno T largo de SV40, la proteína E7 del virus del papiloma humano o la proteína E1A de adenovirus (Nevis, 1994). Estas oncoproteínas aprovechan esta cualidad para interactúan con los miembros de la familia de Rb bloqueando su actividad. Muchas de las proteínas diana de Rb, p103 y p107 presentan una región altamente conservada (LxCxE) mediante la cual se unen a PD-B, mientras que PD-A es necesaria para estabilizar la estructura de PD-B/LxCxE (Mulligan y Jacks, 1998).

2.4.2. E2F, diana de Rb

La diana mejor caracterizada de las proteínas *pocket* (Rb, p107 y P130), son los miembros de la familia del factor de transcripción E2F. La familia de E2F está compuesta por seis miembros (de E2F1 a E2F6) que forman heterodímeros de unión a ADN con los miembros de la familia de coactivadores DP (DP-1, 2 y 3), controlando la expresión de muchos genes que codifican proteínas relacionadas con la regulación y

progresión del ciclo celular, como: ciclinas A, E y D1, p107, E2F1, 4 y 5, Cdk2; así como muchas otras relacionadas con la replicación del ADN como: timidín quinasa, DHFR, DNA Pol α y Cdc6.

Los seis miembros de la familia de E2F presentan distinta afinidad con los miembros de la familia Rb. E2F4 y 5 forman complejos con p107 y p130, mientras que Rb los forma con E2F1-5. No se sabe si E2F6 forma complejos con alguna de las proteínas *pocket* y su función aún no se conoce con exactitud, aunque se cree que actúa como un represor de la transcripción, bloqueando los sitios de unión de E2F (Cartwright *et al.*, 1998; Gaubatz *et al.*, 1998; Trimarchi *et al.*, 1998).

Los miembros de la familia Rb pueden regular la expresión de genes a través de E2F de dos maneras distintas. Primero, uniéndose directamente a E2F y por lo tanto inhibiendo su actividad transcripcional. Segundo, través de modificaciones en el promotor de genes diana de E2F; éste es el caso de los complejos formados por Rb y p103 con la histona deacetilasa HDAC1, Estos complejos Rb/HDAC1 o p130/HDAC1 se unen a E2F y desacetilan al promotor, lo que implica un cambio en la estructura de la cromatina, dificultando la actividad del factor de transcripción (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Stiegler *et al.*, 1998).

Además del control de E2F se ha propuesto que la acción bioquímica de las proteínas de la familia Rb comprende también la asociación y modulación de diversas proteínas celulares que incluyen a un amplio rango de factores de transcripción como MyoD, C/EBP, HBP1 o NPR/B, enzimas como ABL y la ya mencionada HDAC. Además, las proteínas *pocket* se unen a diferentes complejos de ciclina/Cdk e interactúan con componentes de la maquinaria de replicación del ADN. Por tanto actúan a distintos niveles celulares para controlar la proliferación y los procesos de diferenciación.

3. Barreras frente al Cáncer

Fue en 1982, cuando con la identificación de *ras* como un oncogén humano (Shih *et al.*, 1982; Parada *et al.*, 1982; Pulciani *et al.*, 1982) se dio el pistoletazo de salida a la gran carrera para llegar a comprender los complejos mecanismos que regulan o deciden si una célula llega a ser tumoral o no. Der y Parada en sendos trabajos demostraban que la activación de la proteína oncogénica Ras era capaz de inducir transformación en células inmortalizadas de roedor (Der *et al.*, 1982; Parada *et al.*, 1982). Sin embargo, casi al mismo tiempo se descubrió que eran necesarias la cooperación entre Ras y alteraciones adicionales como la expresión de c-Myc o E1A para conseguir la transformación de células primarias murinas (Land *et al.*, 1983; Ruley, 1983). Sin embargo, las células humanas parecían menos propensas a la transformación y era necesaria la combinación de al menos tres eventos oncogénicos diferentes para inducir la transformación. De este modo, con la coexpresión de HRas^{V12}, SV40 ER y hTERT (Hahn *et al.*, 1999; Rich *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2002) o HRas^{V12}, E1A y Mdm2 (Seger *et al.*, 2002) se lograba transformar células humanas primarias.

No fue hasta la década de los noventa cuando Serrano descubrió que en células WT, la expresión de Ras activado, a pesar de ejercer un claro papel en la activación de la proliferación, terminaba por inducir la parada irreversible de la proliferación celular conocido como senescencia. Esta respuesta se manifestaba como un mecanismo de supresión tumoral, asentando las bases para el entendimiento de los procesos que regulan el cáncer. Sin embargo, la mayoría de los oncogenes (E1A, E2F-1, HRAs^{V12} o Myc) provocaban una respuesta antiproliferativa en forma de muerte celular programada o apoptosis en lugar de senescencia (Debbas y White, 1993; Lowe y Ruley, 1993; Hermeking y Eick, 1994; Qin *et al.*, 1994; Wu y Levine, 1994; Woo y Poon, 2004)

En la actualidad son muchos los avances que han contribuido al esclarecimiento de los mecanismos que regulan la senescencia y la apoptosis como mecanismos de supresión tumoral. La relación entre estas dos barreras aún no ha sido elucidada, sin embargo parece que ambos mecanismos de supresión tumoral comparten muchas vías de activación. En este sentido se han asociado tanto la senescencia como la apoptosis a

diversos signos de estrés replicativo como la activación de la *checkpoints* de daño en el ADN o la activación de la vía de p38MAPK por acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre otros. De esta forma, la senescencia así como la activación de apoptosis proporcionan una barrera frente a la progresión de lesiones preneoplásicas.

3.1. Apoptosis o muerte celular programada

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada es un fenómeno ubicuo que juega un importante papel durante la embriogénesis, el desarrollo y la homeostasis celular en el adulto. Su función es la eliminación de células superfluas en un lugar determinado: por ejemplo, la eliminación de los linfocitos autoreactivos que reconocen antígenos propios, o la eliminación de las células que forman las membranas interdigitales durante el desarrollo embrionario.

La muerte celular programada consta de dos fases: en la primera o fase de determinación, las células reaccionan ante un estímulo (o ante su ausencia) decidiendo iniciar el proceso de muerte; en la segunda o fase de ejecución, las células sufren una serie de alteraciones estructurales que conducen a la muerte de la célula. En esta fase de ejecución se produce una disminución de adhesión celular y los contactos intercelulares, cambios en la superficie celular con aparición de profusiones que causan un aumento en la movilidad, una reducción del volumen celular y la condensación de la cromatina en zonas discretas, sobre todo, en la periferia del núcleo.

3.1.1. Factores nucleares que intervienen en la apoptosis

La proteína p53 es una proteína de unión a secuencias específicas de ADN, la cual regula la transcripción de genes como: *bcl-2*, *bax* y *apaf-1*. El incremento de la transcripción de *bax* y *apaf-1* y la represión paralela de *bcl-2* puede ser en parte responsable de la apoptosis inducida por p53. En colaboración con estos mecanismos, p53 puede activar apoptosis por procedimientos independientes de transcripción mediante interacción directa con algunos componentes del factor TFIIH (*transcription factor IIH*), entre ellas las helicasa XPD y XPB (*xeroderma pigmentosum group D and B*). A pesar de que p53 es quizás el más importante factor nuclear que interviene en la

muerte celular programada, existen rutas independientes de p53 que inducen apoptosis a causa de daños en el ADN o desregulación del ciclo celular.

3.1.2. Apoptosis como mecanismo de supresión tumoral

La apoptosis ha sido ampliamente aceptada como un mecanismo de supresión tumoral (Brown y Attardi, 2005). En muchos casos y en numerosos tipos de células este proceso de apoptosis es dependiente del gen p53. Cuando una célula con la proteína p53 normal presenta un daño limitado en el ADN, se induce una parada del ciclo celular en la fase G₁. De esta manera, la célula tiene tiempo de reparar la lesión y posteriormente reiniciar la progresión del ciclo celular. Sin embargo, Si el daño en el ADN es demasiado severo, la célula puede desencadenar una respuesta persistente de daño en el ADN (DDR), lo que probablemente desencadene apoptosis o senescencia. El DDR es mediado por proteínas que actúan como sensores de daño en el ADN tales como MRE11/NBS1/Rad50, las cuales disparan la activación un sistema de transducción de señal que incluye a la quinasa ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*), CHK1 (*CHecKpoint-1*) y CHK2 (*CHecKpoint-2*; Harper y Elledge, 2007). En última instancia el DDR activa a p53, contribuyendo a la activación de apoptosis mediante regulación de oncogenes como bcl-2 y bax, de manera que la célula que está excesivamente dañada, muere (Dragovich *et al.*, 1998). Cuando el gen supresor de tumores *p53* no se expresa como resultado de una delección o de su bloqueo transcriptional, o cuando la actividad de la proteína que codifica está alterada por mutaciones, no se produce la muerte de las células. Entonces tiene lugar la replicación del DNA, generándose células hijas conteniendo cromosomas más o menos aberrantes; es decir, la transmisión de mutaciones que puede originar la pérdida del control de la proliferación y la aparición de tumores.

Otro mecanismo que conduce a la activación de p53 es activado por las señales mitogénicas aberrantes, provocando la desregulación de la ruta Rb/E2F. La hiperactivación de E2F activa la vía p19^{ARF}/MDM2/p53 produciéndose la estabilización y acumulación de p53, facilitando así su activación y contribuyendo a la inducción de apoptosis en aquellas células que presentan una proliferación aberrante (Serrano, 2000).

Por otra parte, se ha descrito que la activación de la ruta de estrés quinasa p38MAPK es capaz de inducir apoptosis en respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROS) causado por el estrés replicativo que sufren las células durante el proceso de tumorigénesis. Este mecanismo parece jugar un importante papel en la inhibición de la iniciación tumoral (Dolado *et al.*, 2007).

3.2. Senescencia

La senescencia celular replicativa ha sido descrita hace más de 40 años como el final de la capacidad replicativa de una célula normal en cultivo (Hayflick y Morhead, 1961). Las células senescentes son incapaces de hacer progresar su ciclo celular y duplicarse, pudiendo permanecer en este estado durante periodos de tiempo prolongados. Esto es debido en parte a la acumulación de inhibidores de CDK entre los que destaca p16^{INK4a} y p21^{CIP1}. Experimentos con fibroblastos humanos han revelado que la senescencia replicativa es consecuencia del agotamiento telomérico que sufren las células a lo largo de sucesivas divisiones. Durante este proceso replicativo se produce el acortamiento de los telómeros el cual llegado a unos niveles críticos es detectado por la célula como una lesión de su ADN y como consecuencia activa los mecanismos de respuesta a daño en el ADN (DDR), teniendo como fin la iniciación de la senescencia replicativa (Herbig *et al.*, 2004).

Pero la senescencia no es un proceso exclusivo para prevenir el crecimiento indefinido de las células de un organismo. Este tipo de mecanismo que induce parada del ciclo celular también es observado cuando las células son sometidas a ciertos eventos oncogénicos. En 1997 se describe que la expresión constitutiva de Ras oncogénico, induce senescencia cuando es expresado en célula en cultivo. Por lo tanto, La expresión de Ras oncogénico en distintos tipos celulares de mamífero induce la parada irreversible del ciclo celular con rasgos similares a la senescencia por estrés replicativo (Serrano *et al.*, 1997). Esto sugiere que los mecanismos de control celulares son capaces de responder ante la activación de un oncogén y además dicha respuesta parece utilizar, al menos en parte, los mismos mecanismos utilizados por la célula durante la senescencia replicativa.

3.2.1. Senescencia inducida por oncogénesis (OIS)

Desde que en 1997 Serrano describiese lo que posteriormente se denominará senescencia inducida por un oncogén (OIS). Muchos otros trabajos han demostrado que OIS también ocurre cuando sometemos a la célula a la acción de otros oncogenes distintos de Ras o eliminamos ciertos supresores de tumores. De este modo la activación y expresión de oncogenes que forman parte de la ruta de señalización de Ras tales como RAF (Fanton *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998) o MEK (Lin *et al.*, 1998) pueden inducir senescencia. Del mismo modo, la eliminación de un supresor de tumores como PTEN, el cual ejerce su función inhibiendo la cascada PI3K inducida por Ras, también es capaz de inducir senescencia celular (Chen *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que la activación de reguladores de ciclo celular localizados en el núcleo también es capaz de inducir OIS. Así por ejemplo, el incremento de la expresión del factor de transcripción E2F que regula la transición del ciclo celular de G₁ a S, provoca senescencia celular. Del mismo modo, Ciclina E (un modulador de Cdks) y Cdc6 (*DNA-replication licensing factor*) inducen senescencia cuando son expresadas ectópicamente (Bartkova *et al.*, 2006). De forma similar, los altos niveles de ciclina E, y más genéricamente, la desregulación de la actividad quinasa dependientes de ciclina en G₁, es muy frecuente en cánceres humanos comprometiendo el ensamblaje de los complejos replicativos, originando un estrés replicativo que desencadena DSBs, inestabilidad genómica y como consecuencia activación de *checkpoints* del ADN que activan los mecanismos para la prevención de desarrollo de la tumorigénesis (Gorgoulis *et al.*, 2005). Por lo tanto, la activación del estímulo replicativo de la célula va a disparar ciertos mecanismos de protección celular que desembocan en la senescencia inducida por oncogénesis (OIS).

3.2.2. OIS *in vivo*

La experimentación *in vitro* en la que se somete a las células a altos niveles de expresión de oncogenes, hizo plantearse la posibilidad de que OIS existiese realmente como un mecanismo de supresión tumoral. Este hecho ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias para el estudio de la senescencia *in vivo*. En la actualidad se sabe que

la senescencia es un proceso que permite a las células protegerse frente a eventos oncogénicos, no solo *in vitro* sino también *in vivo*. Numerosos trabajos han demostrado que eventos oncogénicos como la hiperactivación de Ras (Braig *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005), E2F, STAT5 (Mallette *et al.*, 2007) o la pérdida de PTEN (Chen *et al.*, 2005), entre otros, son capaces de desencadenar senescencia *in vivo*. Concretamente, el uso de ratones *knockin* que expresan niveles de Ras oncogénico similares a los niveles endógenos (Collado *et al.*, 2005) ha permitido demostrar que la senescencia celular también es inducida en un modelo *in vivo* cuando la cantidad de proteína oncogénica presente en la célula es reducida.

Por lo tanto, es evidente que la senescencia tiene una función importante como mecanismo supresor de tumores previniendo la malignización celular causada por mutaciones oncogénicas.

3.2.3. Características de las células senescentes

La senescencia es una barrera para la proliferación celular. Los mecanismos mediante los cuales la activación de un oncogén es capaz de frenar la proliferación celular todavía no se ha llegado a comprender totalmente. Al igual que ocurre en la senescencia replicativa donde la disfunción telomérica activa los *checkpoints* dependientes de ATM/ATR, la activación de un oncogén como HRas^{V12} es capaz de inducir OIS por activación de los *checkpoints* de respuesta a daño en el ADN (DDR) siendo capaces de frenar el crecimiento celular (Serrano *et al.*, 1997; Di Micco, *et al.*, 2006).

La mayoría de las células que sufren OIS presentan una serie de características como la presencia de focos de daño en el ADN asociados a senescencia (*senescence-associated DNA-damage foci*, SDF), que contienen las formas activadas de ATM, NBS1 y del complejo ATR, ATRIP (*ATR-interacting protein*) y RPA (*relation protein A*). A su vez, la activación de ATM/ATR da lugar a la fosforilación de 53BP1 y MDC1 junto con la forma fosforilada de la histona H2AX (γ -H2AX). OIS también ha sido caracterizada por la presencia de focos de heterocromatina (*senescence-associated heterochromatic foci* SAHF; Narita, 2003; Di Micco, 2006). Tanto SAHF como SDF coexisten en células senescentes pero no necesariamente colocalizan (Di Micco *et al.*, 2006). Además el

análisis de DDR muestra un incremento en la fosforilación de la quinasas Chk2 y Chk1, y fosforilación de p53 en Serina15, junto con el incremento de los inhibidores de CDKs p21^{CIP1} y p16^{INK4a}, p53 y la forma hipofosforilada de Rb (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005; Di Micco *et al.*, 2006). Estas apreciaciones también se observan en fibroblastos humanos, MEFs y células de epitelio de mama humano sometidos a la acción de otro oncogén como hTERT. Por lo que se puede decir que OIS esta asociada con la presencia de daños en el ADN y la activación de las vías DDR.

3.2.4. Vías implicadas en la activación de senescencia

En la actualidad son muchos los avances que han tenido lugar en el esclarecimiento de los mecanismos que regulan la senescencia como mecanismo de supresión tumoral. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que no existe un único mecanismo de activación de la senescencia. El daño en el ADN, el estrés replicativo, la formación de heterocromatina, la acumulación de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos de *feedback* negativos han sido todos ellos propuestos como causantes de la activación de senescencia, que junto con la inducción de apoptosis actúan como barreras frente al cáncer. De este modo, parece que la senescencia no es desencadenada por una serie lineal de eventos, sino que parece estar regulada por una compleja red de señales. De acuerdo con esto, múltiples vías pueden cooperar para inducir este proceso. A continuación trataremos aquellos que están teniendo mayor repercusión en los últimos años.

3.2.4.1. Activación de DDR

El análisis de los eventos que ocurren inmediatamente después de la expresión un oncogén como Ras revela que la senescencia viene precedida del incremento brusco de la proliferación y la posterior activación de DDR (**Figura 6**).

Los datos publicados sugieren que los eventos oncogénicos que suceden temprano en la progresión de la mayoría de los cánceres activan los *checkpoints* regulados por ATM/ATR a través de la replicación aberrante y daño en el ADN y por lo tanto se activa una barrera inducible contra la progresión del tumor y la inestabilidad génica

(Bartkova *et al.*, 005; Gorgoulis *et al.*, 2005). Los posibles candidatos inductores de tal respuesta incluyen: genes que sobreestiman vías mitogénicas (Di Micco *et al.*, 2006), aberraciones en la ruta de Rb/E2F1 como sobreexpresión de Ciclina E o Cdc6 (Bartkova *et al.*, 2006) y mutaciones en genes reparadores de ADN como BRCA2 (Lomonosov *et al.*, 2003). El estrés replicativo sufrido por las células en estas condiciones, provoca el colapso de las horquillas de replicación activando la cascada ATR/H2AX/Chk1, lo cual, seguido de las dobles roturas del ADN desencadenarían la activación de la ruta ATM/H2AX/Chk2/p53. Tal respuesta limita la progresión de la lesión, y posiblemente contribuye a prolongar el periodo de latencia impidiendo que las lesiones premalignas evolucionen a lesiones malignas (Bartkova *et al.*, 2005).

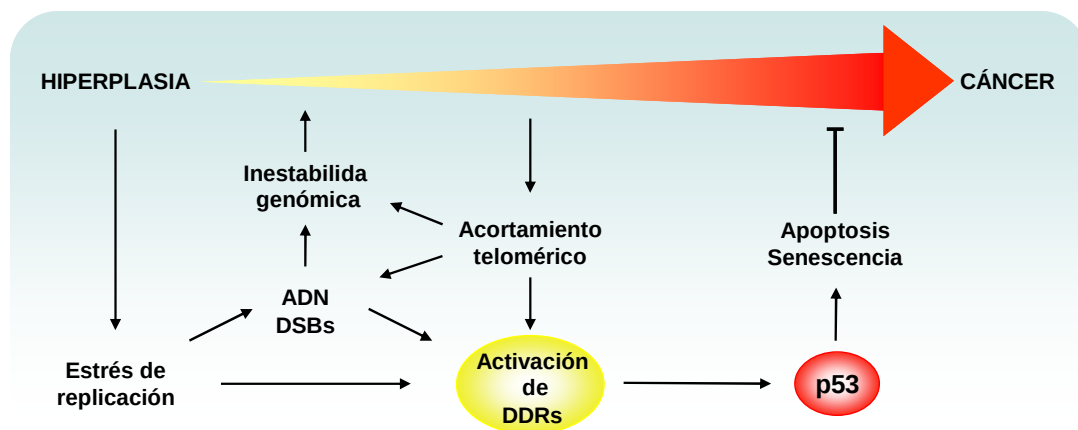


Figura 6. Modelo de activación de DDR en cáncer. La estimulación aberrante de la proliferación celular (como ocurre en lesiones neoplásicas) conduce al estrés replicativo, roturas de la doble cadena del ADN (DSBs), inestabilidad genómica y activación de DDRs, provocando la activación de senescencia o apoptosis dependiente de p53 suprimiendo la expansión de las lesiones precancerosas. El acortamiento telomérico también contribuye a la formación de DSB del ADN, activación de DDRs e inestabilidad genómica.

Se ha demostrado que en estadios tempranos del desarrollo tumoral (pero no en tejido normal) comúnmente se expresan marcadores de DDR. Estos marcadores incluyen entre otros las formas fosforiladas de las quinasas ATM y Chk2, así como la histona H2AX y p53. Este tipo de respuesta también es observada en cultivos celulares expuestos a la expresión de diferentes oncogenes que alteran la proliferación y la replicación del ADN. De esta forma, las quinasas Chk2, se encuentra activada en cultivos celulares afectados por el estrés replicativo inducido por oncogenes como *myc* o *ras*. Todo ello hace pensar que los *checkpoints* de daño en el ADN son activados en estadios tempranos del cáncer, produciendo el arresto celular o la apoptosis y por consiguiente bloquean la progresión

tumoral (Bartkova *et al.*, 2005). De hecho, la activación de Chk2 y Chk1 por fosforilación varía dependiendo de la fase de malignización en la que se encuentre el tumor. La activación de Chk2 es muy evidente en lesiones precancerosa pero no en tejidos normales (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005). Estos datos sostienen la hipótesis de que ATM/ATR puede ser constitutivamente activada en tumores, induciendo la fosforilación de Chk1, Chk2, p53 e histona H2AX. (Bartkova *et al.*, 2005, Gorgoulis *et al.*, 2005). Parece por lo tanto que en fases tempranas de la tumorigénesis, antes de que se produzca inestabilidad genómica y malignización del tumor, las células activan el DDR regulado por ATM/ATR, para tratar de retrasar o prevenir la evolución del cáncer (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005; Bartkova *et al.*, 2006; **Figura 7**). Como demostración de la importancia de la activación del DDR como mecanismo de supresión tumoral, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la inhibición o delección de genes implicados en la ruta ATM/Chk2/p53 inducen el desarrollo de tumores más rápidamente y de forma más agresiva destacando la importancia de estas rutas en la prevención de la tumorigénesis (Serrano *et al.*, 1997, Braig *et al.*, 2005; Mallette *et al.*, 2007).

Experimentos *in vitro* han demostrado que la contribución de p53 sobre la senescencia inducida por Ras oncogénico, mediante la comparación de MEFs WT con MEFs p53^{-/-} sometidos a la acción de Ras oncogénico. En contraposición con los MEFs WT, las células *knockout* continúan proliferando y presentan características de células transformadas como: morfología refractaria y pérdida de inhibición por contacto (Serrano *et al.*, 1997) y favorecen la formación de tumores (Woo y Poon, 2007), indicando que p53 es esencial para inducir senescencia. De forma similar, la inactivación de p16, compromete la senescencia inducida por estés oncogénico (Serrano *et al.*, 1997).

Como comprobación de lo anteriormente mencionado, diversos experimentos han demostrado que ruptura de los *checkpoints* celulares son capaces de colaborar con ciertos oncogenes en la transformación celular. Así, se ha demostrado que la expresión de Ras oncogénico es capaz de inducir transformación en MEFs Chk2^{-/-} pero no ocurre lo mismo en MEFs Chk2^{+/+}. Este proceso no solo ocurre en células de ratón. Se ha comprobado en células humanas que la inactivación de Chk2 o p53 coopera con Ras

oncogénico y la proteína viral E1A incrementando el número de colonias que crecen independientes de sustrato (Di Micco *et al.*, 2006). De forma similar, la inactivación de ATM, uno de los componentes de la ruta ATM/Chk2/p53, permite que las células superen la senescencia inducida por E2F, y si ésta se asocia a la ausencia de Rb se bloquea la senescencia inducida por STAT5 (Mallette *et al.*, 2007). Por lo tanto, parece evidente que las rutas de p53 y p16^{INK4a} junto con las vía de DDR son de gran importancia en la activación de OIS.

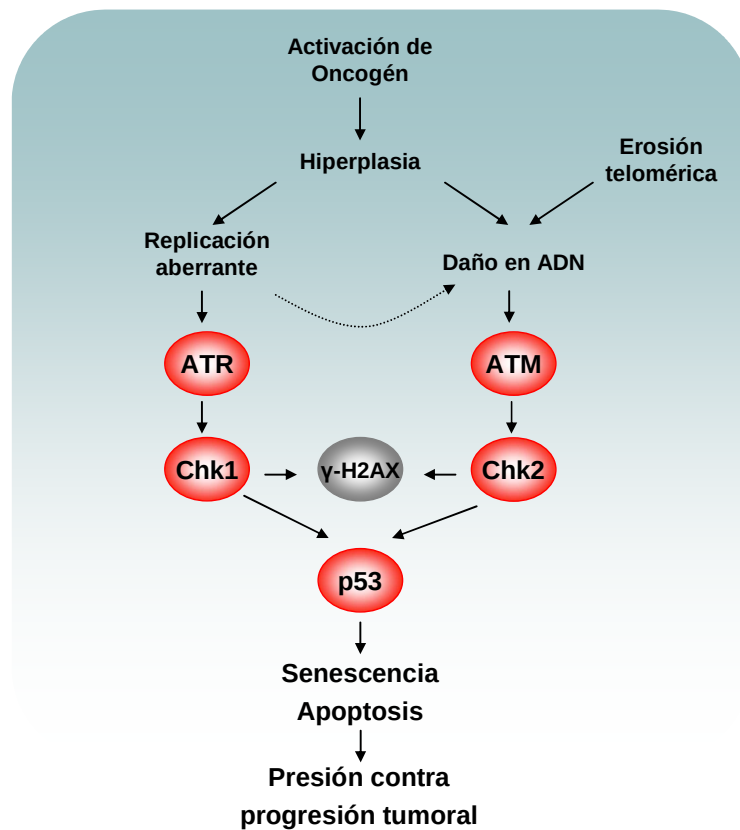


Figura 7. Esquema de la activación de *checkpoints* de daño en ADN inducido por oncogénesis. El daño en ADN inducido por estrés oncogénico y la disfunción telomérica pueden converger en la activación de DDR, actuando como un mecanismo que previene la aparición de lesiones preneoplásicas.

3.2.4.2. ROS y p38MAPK

La activación de OIS puede producirse por la activación de *checkpoints* tras daño en el ADN debido al estrés replicativo. Sin embargo, se han propuesto otros mecanismos como mediadores de este proceso. En este sentido, se ha planteado que OIS puede ser

activado por la acumulación intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) debido al estrés oncogénico. Hay que destacar que la aparición de nuevos mecanismos activadores de OIS no excluye a los anteriores. En su lugar, es posible que cooperen para promover o mantener la senescencia. Sin embargo, la activación de alguno de estos mecanismos puede verse limitada dependiendo del tipo de evento oncogénico o del tipo de tejido.

El estrés oxidativo ha sido tradicionalmente considerado como un tóxico producido por el metabolismo celular. Recientemente se han relacionado los niveles elevados de ROS con la regulación de vías de transducción de señales, pudiendo cooperar con señales oncogénicas en la transformación celular y la aparición de tumores. La acumulación de ROS intracelular actúa a diferentes niveles, incluyendo cambios en la expresión génica (Allen y Tresini, 2000), incremento de la proliferación y aumento de las mutaciones en el ADN e inestabilidad genómica (Woo y Poon, 2004). Además, se han detectado altos niveles de ROS en gran número de líneas celulares derivadas de tumores (Szatrowski y Nathan, 1991), así como en tumores de diferentes tejidos (Toyokuni et al., 1995). Teniendo en cuenta estos datos se puede confirmar la existencia de una íntima relación entre el estrés oxidativo y el cáncer.

El incremento de ROS debido a la activación de Ras oncogénico es capaz de activar la ruta de p38MAPK, la cual modula especialmente la transformación inducida por oncogenes que producen especies reactivas del oxígeno. La inhibición de la ruta de ERK (Li *et al.*, 2003), inducción de senescencia (Wang *et al.*, 2002) o parada del ciclo celular dependiente de p53 (Bulavin *et al.*, 2002), la activación de inhibidores de ciclo como p16^{INK4a} o p21^{CIP1} (Bulavin *et al.*, 2004; Nicke *et al.*, 2005), o inducción de la apoptosis (Dolado *et al.*, 2007), son algunos de los diferentes mecanismos propuestos para explicar el papel de p38MAPK como supresor de tumores.

La activación de p38MAPK por ROS es mediada por la MAPK quinasa quinasa ASK1 la cual es disociada de sus proteínas inhibidoras en presencia de ROS. Si bien, mediante la inactivación de fosfatasas inhibidoras de la ruta de p38MAPK como PP2C o la fosfatasa de p38MAPK, WIP1 (también llamada PPM1D), ROS es capaz de favorecer la fosforilación de p38MAPK. De este modo, el efecto de la activación de ROS sobre la

rutas de ASK1/ p38MAPK es potenciado al inhibir fosfatasas que inactivan la ruta de p38MAPK (Dolado *et al.* 2007; **Figura 8**).

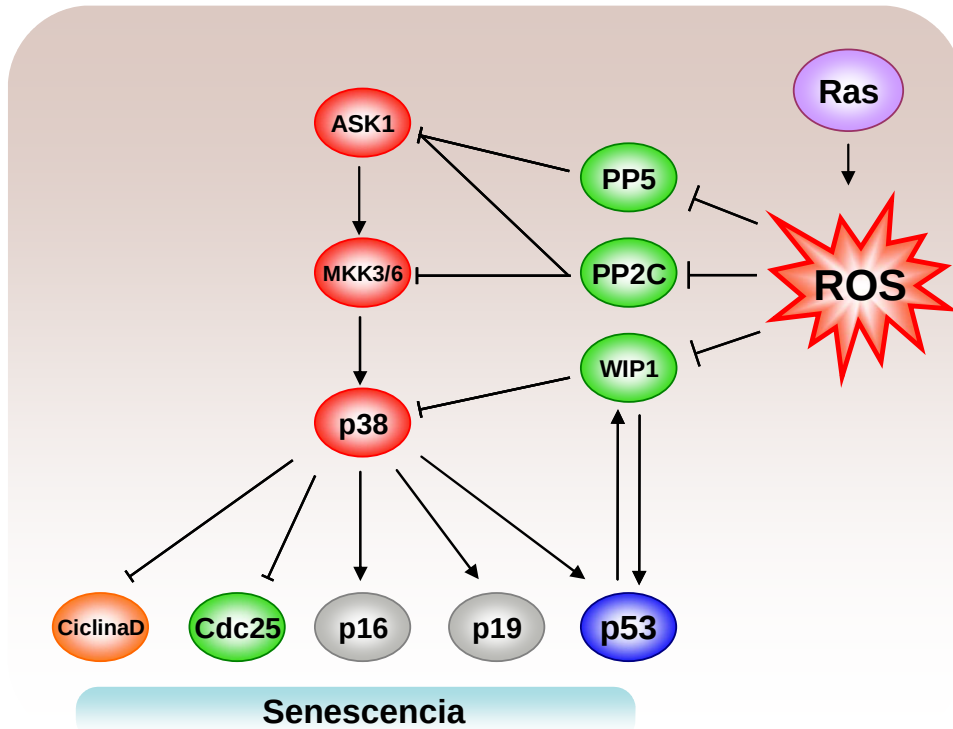


Figura 8. Ilustración esquemática del efecto de ROS sobre la activación de la ruta de p38MAPK. ROS estimula la vía mediante la inhibición de diferentes fosfatasas que regulan negativamente la cascada de señalización de p38MAPK.

La inhibición de p38MAPK revela la importancia de esta vía como inhibidor del proceso de tumorigénesis. De esta forma, las células deficientes de p38MAPK sometidas a un evento oncogénico, como el de HRAS^{V12}, son más resistentes a la apoptosis inducida por ROS. Además, estas células acumulan mayor cantidad de ROS que las células WT contribuyendo al fenotipo transformado ya que ROS induce inestabilidad cromosómica (Dolado *et al.*, 2007). Por otra parte, la vía de p38MAPK es capaz de responder al estrés provocado por el daño en el ADN cuando la célula es sometida a la luz UV o radiación gamma. De forma similar, los altos niveles de ROS inducidos por la activación de Ras causan daño en el ADN activando p38MAPK (Wang *et al.*, 2002), provocando senescencia prematura.

Por lo tanto, la activación de p38MAPK parece proteger contra la oncogénesis que produce altos niveles de ROS funcionando como un sensor del estrés oxidativo durante la iniciación de la tumorigénesis (Dolado *et al.*, 2007).

3.2.4.2.1. Rutas de activación de p38MAPK

Como ya hemos mencionado, la familia de los oncogenes Ras codifican pequeñas proteínas de unión a GTP que transducen señales mitogenéticas desde receptores tirosina quinasas al núcleo mediante la activación de múltiples vías de señalización. Entre las rutas mejor descritas se encuentra la ruta de las MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) que incluye las quinasas ERK (*extracellular mitogen-regulated kinase*), la ruta de JNK (*Jun amino-terminal kinase*) también llamada SAPK (*stress-activated protein kinase*) así como la ruta de p38MAPK.

La importancia de la cascada de MAPK sobre la proliferación celular ha quedado patente en la gran cantidad de trabajos en los que se ha observado que la desregulación de esta vía puede resultar en transformación celular y cáncer. La activación de la vía de ERK o JNK implica un incremento en la proliferación celular y supervivencia, aunque también haya sido descrito que la pérdida de la vía de JNK pueda inducir tumorigénesis (Yoshida *et al.*, 2001).

Sin embargo y aunque la función principal de la activación de la ruta Ras/MEK/ERK es la de inducir estimulación del crecimiento, es capaz de desencadenar senescencia prematura o apoptosis como barrera frente a la tumorigénesis. Uno de los mecanismos por el cual la activación de la vía Ras/MEK/ERK induce la activación de senescencia parece ser la activación de p38MAPK. De esta forma, en células tumorales o líneas celulares donde la vía de p38MAPK ha sido comprometida, la activación del oncogén Ras o la activación constitutiva de la ruta MEK/ERK promueven el crecimiento celular que conduce a la transformación celular (Dolado *et al.*, 2007). Se explica de este modo como Ras posee una doble función induciendo regulación positiva o negativa del crecimiento celular dependiendo de el grado de activación de la vía, el tiempo de activación y del tipo celular.

Las rutas de MAPKs (MEK/ERK y MKK3/6-p38MAPK) parecen mediar respuestas totalmente divergentes, pero existen evidencias de interacción entre ambas. La activación constitutiva de la ruta RAS/MEK1 induce la acumulación de MKK3/6, la activación de p38MAPK y la subsiguiente aparición de una respuesta antiproliferativa como la senescencia prematura. Ha sido descrito que la habilidad de MEK1 para mediar OIS recae en la activación de p38MAPK (Wang *et al.*, 2002). Por lo tanto la activación de MKK3/6 y p38MAPK por Ras va a requerir la activación de la ruta MEK/ERK (**Figura 9**).

La fosforilación de p38MAPK va a ser capaz de disparar estos procesos antitumorales de senescencia o apoptosis por medio de la acumulación de inhibidores de crecimiento así como por la activación de proteínas de la familia de Bcl2. La MAPK p38 induce la disminución de los niveles de ciclina D (Lavoie *et al.*, 1996), inhibición de la fosfatasa Cdc25 (Manke *et al.*, 2005) y la activación de las vías p16^{INK4a}/Rb y p19^{ARF}/p53 (Bulavin *et al.*, 2002). Además cuando p38MAPK es fosforilada puede causar apoptosis por un mecanismo que es poco entendido pero que parece implicar a la fosforilación de miembros de la familia de Bcl2 y la activación de la ruta de apoptosis mitocondrial.

Además, existen evidencias de que la ruta de p38MAPK ejerce una función supresora mediante la activación por fosforilación de p53. Diferentes residuos de serina, entre los que destacan Ser15, Ser33 y Ser46 (Bulavin *et al.*, 2003) así como Ser37 son fosforilados en p53 durante la senescencia. Mientras que la quinasa que fosforila Ser15 durante la senescencia no está bien definida, las Ser33 y Ser46 son fosforiladas por p38MAPK bajo la activación de Ras. Además, la proteína PRAK (p38-regulated/activated protein kinase) se ha revelado como la quinasa principal de Ser37 durante la senescencia ya que la fosforilación de este residuo desaparece en células de ratón *knockout* de PRAK (Sun *et al.*, 2007). Sin embargo, p53 también es fosforilado en el residuo Ser37 cuando se produce activación de los *checkpoints* de daño en el ADN. Posiblemente esta fosforilación sea llevada a cabo quinastas diferentes de PRAK.

Como estamos viendo, PRAK es mediador de la senescencia dependiente de p38MAPK. La quinasa PRAK, también llamada MK5 (MAPK-activated protein kinase 5), es una de las dianas de fosforilación de p38MAPK. Los ratones deficientes de

PRAK presentan una producción normal de citoquinas frente a shock endotóxico, sugiriendo que PRAK no juega un papel esencial en los procesos inflamatorios que se la atribuyen a la quinasa p38MAPK. Sin embargo, PRAK ha sido descrito como supresor de tumores ya que es capaz de mediar la activación de senescencia de forma dependiente de p38MAPK en respuesta a la activación de Ras oncogénico.

Los ratones deficientes de PRAK presentan mayor susceptibilidad a la inducción de carcinogénesis en la piel tras tratamiento con DMBA. De forma similar, en cultivos primarios la inactivación de PRAK previene la senescencia inducida por Ras y favorece la transformación. Además, se sabe que PRAK es capaz de activar a p53 por fosforilación directa. Por lo tanto, la fosforilación de p53 por PRAK tras la activación de la vía de p38MAPK juega un importante papel en la senescencia inducida por Ras y en la supresión tumoral (Sun *et al.*, 2007).

En contraste con los ratones deficientes de p53 o p19^{ARF}, los ratones deficientes para PRAK no desarrollan tumores espontáneos en los dos primeros años de edad. Esta diferencia indica que, aunque p53 es regulado por p38MAPK /PRAK en la senescencia inducida por Ras, p53 y p19^{ARF} tienen funciones adicionales como supresores de tumores que no son reguladas por PRAK.

En conclusión, se puede decir que al igual que otras rutas que median la actividad supresora de tumores de p53, el circuito p38MAPK/PRAK/p53 puede ser esencial para la supresión tumoral bajo condiciones causales de cáncer específicas, como es la activación de la ruta de Ras oncogénico.

Por otra parte, estudios recientes han arrojado luz sobre el posible papel la ruta de p38MAPK sobre la regulación negativa de la señal proliferativa de Ras a través de un mecanismo de *feedback*. Esta conclusión está basada en la observación de que la activación de Ras tiene como resultado la activación de PRAK y MK2, dianas de p38MAPK. Una vez activados los efectores de p38MAPK se observa una inhibición de la expresión de genes dependientes de Ras y de la proliferación. Este fenómeno se detectó tras observar el aumento de la activación de p38MAPK en tumores que contenían mutaciones endógenas de Ras pero no en tumores independientes de Ras,

comprobandose a posteriori que la inhibición de la vía de p38MAPK bloquea el efecto inhibidor que tienen este sobre la proliferación (Chen *et al.*, 2000).

Recientes estudios han demostrado que el *feedback* causado por la activación de p38MAPK es mediado por las quinasas PRAK y MK2, proponiendo que p38MAPK bloquea la acción proliferativa de Ras mediante la activación PRAK y MK2, las cuales son capaces de bloquear la activación de la ruta de JNK. (Chen *et al.*, 2000; Hui *et al.*, 2007; **Figura 9**).

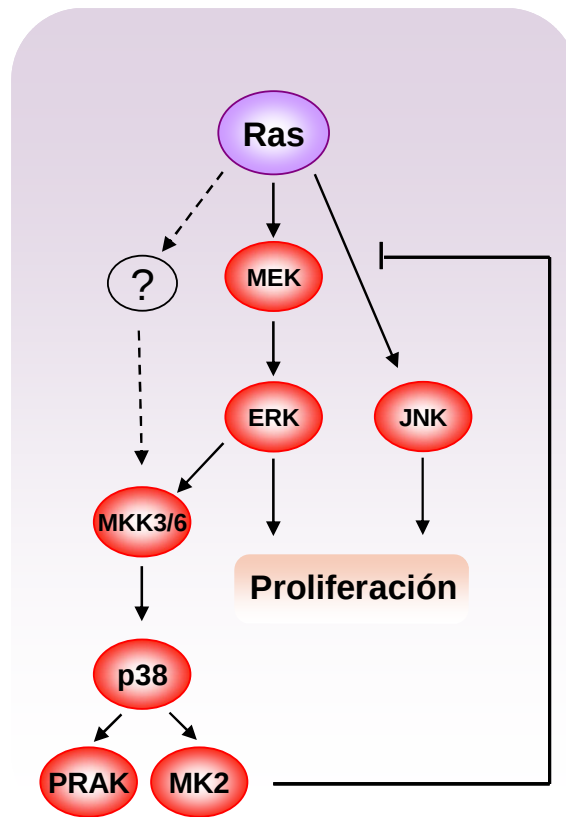


Figura 9. Modelo del feedback negativo ejercido por p38MAPK sobre la proliferación inducida por Ras: Ras estimula las rutas MEK/ERK y JNK las cuales inducen proliferación. Ras también estimula la ruta MKK6/p38MAPK de forma dependiente de MEK. Al mismo tiempo MKK6/p38MAPK inhibe la proliferación inducida por Ras a través de la inhibición de la actividad de JNK inducida por Ras. Las líneas discontinuas indican una ruta de activación de MKK6/p38MAPK independiente de MEK pero activada por Ras.

Esta conclusión es fortalecida por el hecho de que MKK6 es activada por Ras de una forma MEK dependiente, no sorprendiendo el hecho de que MEK/ERK sea capaz de activar a MK2 y PRAK. Así la vía de MEK/ERK es un punto crítico en la señalización de Ras estimulando la proliferación, pero también transmite la señal para que

p38MAPK dispare el *feedback* negativo que reestablezca la respuesta proliferativa (Chen *et al.*, 2000).

Además, Chen nos presenta la hipótesis de una nueva ruta alternativa de activación de p38MAPK independiente de MEK/ERK. El hecho de que la inhibición de MEK bloquee la activación de p38MAPK inducida por Ras pero la activación constitutiva de la vía de MEK/ERK no sea capaz de activar a p38MAPK sugiere que la vía de MEK/ERK es imprescindible pero no suficiente para la activación de la ruta de p38MAPK, por lo que debe de existir alguna otra vía de estimulación de dicha ruta (**Figura 9**).

De esta forma, el resultado de la activación de Ras podría depender de la interacción de las distintas rutas antes mencionadas conduciendo a la proliferación, diferenciación, parada del ciclo o apoptosis dependiendo de la intensidad, tiempo del estímulo o del tipo celular que recibe dicho estímulo.

3.2.4.2.2. Papel de WIP1 en la oncogénesis

Ppm1d es el gen que codifica la proteína WIP1, un miembro de la familia PP2C (proteínas serin/treonin-fosfatasas tipo 2C) evolutivamente muy conservadas. Originalmente fue descrito como un gen regulado por p53 (Fiscella *et al.*, 1997), pero más tarde *Ppm1d* fue implicado en la regulación negativa de p53 a través de su habilidad para atenuar la actividad de p38MAPK. De este modo WIP1 media la inactivación de p53 después de una situación de estrés celular (Takekawa, *et al.*, 2000; **Figura 10**). La importancia de este mecanismo de retroalimentación se ve reflejado en el hecho de que WIP1 es capaz de complementar la acción de varios oncogenes en el proceso de transformación *in vitro* y en que WIP1 se encuentra amplificado y sobreexpresado en ciertos tipos de tumores, entre ellos el cáncer de mama humano (Bulavin *et al.*, 2002), neuroblastoma (Saito-Ohara *et al.*, 2003) y adenocarcinoma de células claras de ovario (Hirasawa *et al.*, 2003).

WIP1 es capaz de inactivar por defosforilación directa a p38MAPK en residuos treonina requeridos para su activación enzimática. En contrapartida y como ya hemos indicado,

p38MAPK ha sido implicado como un regulador negativo de la progresión del ciclo celular a través de diversos mecanismos, lo cual sitúa a WIP1 como un regulador del ciclo celular. La MAPK p38 inhibe la expresión de ciclina D, fosforila e induce degradación e inhibición de la fosfatasa Cdc25 y fosforila a p53 en los residuos de activación (Ser33 y Ser46) de su región N-terminal la cual contribuye a la activación de apoptosis. Todas estas dianas de p38MAPK cooperan para activar los *checkpoints* de ciclo celular, lo cual implica que defectos en la regulación o función de la ruta p38MAPK podría perturbar la progresión del ciclo celular incrementando la posibilidad de tumorigénesis (**Figura 10**).

Varios estudios han demostrado que, de forma similar a la deficiencia de p38MAPK, WIP1 regula positivamente la proliferación comportándose como un auténtico oncogén (Bulavin *et al.*, 2002). Mientras que la delección de WIP1 reduce substancialmente la proliferación celular y activa apoptosis (Bulavin *et al.*, 2004; Hershko *et al.*, 2006; Saito-Ohara *et al.*, 2003), provocando que las células deficientes de *Ppm1d* sean resistentes a la transformación tanto *in vitro* como *in vivo* (Bulavin *et al.*, 2004). Además, experimentos en MEFs indican que la inhibición de WIP1 induce varias rutas supresoras de tumores, incluyendo a p16^{INK4a}, p19^{ARF} y p53. Consistente con la marcada activación de p16^{INK4a} en células *Ppm1d*^{-/-}, La actividad de Cdk4 está sustancialmente inhibida, teniendo como resultado la disminución de la fosforilación de Rb en Ser780 (Bulavin *et al.*, 2004). Pero el aumento de p16^{INK4a} parece no ser el único mecanismo de resistencia a la transformación inducido por la falta de *Ppm1d*. De este modo, la expresión de p19^{ARF} juega un papel clave en la resistencia ante transformación de los ratones *Ppm1d*^{-/-}. Así, la deficiencia de *Ppm1d* podría, a través de p38MAPK, aumentar la activación de moléculas que contribuyan negativamente a la proliferación celular, como las fosfatasas Cdc25 o inducción de p19^{ARF} y p16^{INK4a} (Bulavín *et al.*, 2004; **Figura 10**).

Ha sido descrito otro mecanismo mediante el cual WIP1 es capaz de inhibir a p53. WIP1 interactúa y defosforila a Mdm2 en serina 395, un sitio de fosforilación de la quinasa ATM. La defosforilación de Mdm2 incrementa su estabilidad y afinidad por p53, facilitando la ubiquitinación de p53 y su posterior degradación por el proteosoma

(Lu *et al.*, 2007). De este modo WIP1 actúa inhibiendo a p53 por vías independientes de la ya mencionada inhibición de p38MAPK.

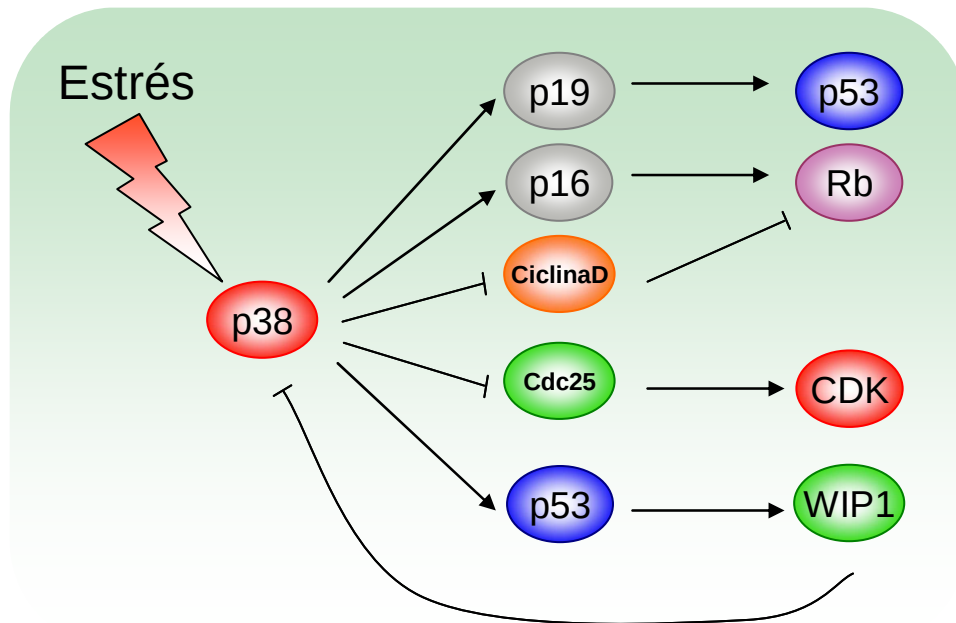


Figura 10. Papel de la fosfatasa WIP1 en respuesta a estrés celular. La activación de la p38MAPK por ciertos estímulos de estrés como radiación UV o acumulación de ROS, provoca la activación de un número de proteínas inhibidoras de crecimiento (p19^{ARF} y p16^{INK4a}), y a la inhibición de proteínas estimuladoras del crecimiento (ciclina D o Cdc25). p38MAPK también provoca la activación de p53, el cual estimula la transcripción de WIP1 llevando a cabo un mecanismo de retroalimentación negativa mediante la defosforilación de p38MAPK.

Por otra parte, WIP1 es regulado transcripcionalmente por E2F1. Concretamente, E2F1 es capaz de modular la fosforilación de p38MAPK a través de la regulación transcripcional de ASK1 y WIP1 (Hershko *et al.*, 2006). ASK1 es un miembro de la familia MAPKKK que activa tanto la ruta de JNK como la de p38MAPK por fosforilación directa de los sitios serina y treonina de sus respectivas MKKs, MKK3/6 para p38MAPK y MKK4/5 para JNK. Además, la fosfatasa selectivamente defosforila e inactiva a p38MAPK pero no a JNK, ERK o MAPKs.

La activación de E2F1 induce un incremento transitorio de la fosforilación de p38MAPK a través de mecanismos dependientes de transcripción. Así, el gen diana de E2F (*ASK*) es un efector de la activación de p38MAPK dependiente de E2F1. Esto a sido comprobado mediante la generación de un modelo *knockdown* de ASK1 por siARN, el cual es capaz de inhibir la fosforilación de p38MAPK mediada por E2F.

Curiosamente, la fosforilación de p38MAPK sufre una disminución tardía tras la activación de E2F1. Esta disminución es causada, al menos en parte, por el aumento de los niveles de proteína de WIP1 de forma dependiente a E2F1. Interesantemente, cuando E2F1 induce la expresión de WIP1, los niveles de ASK1 son todavía elevados; sin embargo, WIP1 parece reducir los niveles de fosforilación de p38MAPK aun en presencia de ASK1. Además, los datos obtenidos con el *knockdown* de WIP1 muestran un mantenimiento de la fosforilación de p38MAPK inducida por E2F1, indicando que WIP1 es un importante mediador de la defosforilación de p38MAPK regulada por E2F. Por lo tanto *Ppm1d* se revela como una nueva diana transcripcional de E2F1 (Hershko *et al.*, 2006). *Ppm1d* es conocido también por ser diana transcripcional de p53, aumentando la posibilidad de que E2F1 induzca expresión de WIP1 vía p53. Aunque, E2F1 también ejerce su capacidad de regular a WIP1 de forma independiente de p53.

Algunos de los sustratos conocidos de WIP1 son: p38MAPK, p53, Chk1 y la enzima uracil-ADN-glicosilasa reparadora de daño en el ADN. WIP1 media la defosforilación de sus sustratos que invariablemente resulta inactivados. La inactivación de p38MAPK por WIP1 disminuye la fosforilación de p53 en serina 33 y 46 provocando la disminución del efecto apoptótico de p53 favoreciendo una posible transformación celular. De forma contraria, el *knockdown* de WIP1 aumenta la apoptosis inducida por E2F1 identificando a WIP1 como un modulador de apoptosis inducida por E2F1. Curiosamente, los sustratos de WIP1 son regulados positivamente por la activación de E2F. De este modo, WIP1 cierra un mecanismo de *feedback* negativo al inhibir las proteínas inducidas por el E2F1.

Con todo lo descrito hasta ahora, se puede decir que E2F regula la expresión de la quinasa ASK1, y la fosfatasa WIP1, que modulan la actividad de p38MAPK. Identificando a ASK1 y WIP1 como mediadores esenciales de la conexión entre E2F1 y p38MAPK. Todos estos datos son consistentes con la importancia de WIP1 en la regulación de la tumorigénesis tanto en modelos celulares como in vivo, revelando a WIP1 como un auténtico oncogén.

3.2.5. El supresor de tumores p53

Al igual que *Rb*, el gen *p53* está mutado en aproximadamente el 50% de todos los tumores humanos. Parece, sin embargo, que la mutación de *p53* no es un evento temprano, sino que aparece en fases relativamente tardías del desarrollo tumoral. Descubierta en 1979 como una proteína fosforilada que se unía al producto del oncogén antígeno T del virus SV40, *p53* fue inicialmente considerada oncogénica al encontrarse en mayores niveles en células cancerosas que en normales y, además, cooperar con Ras en la transformación de fibroblastos en cultivo. Esta idea cambió radicalmente cuando se descubrió que los genes *p53* con los que se estaba trabajando eran formas mutadas de la proteína normal. De hecho, cuando en 1989 se analizó la actividad de la proteína producto del gen *p53* normal, los grupos de Arnold J. Levine y Moshe Oren (Finlay *et al.*, 1989; Eliyahu *et al.*, 1989) comprobaron que, en realidad, era capaz de suprimir el fenotipo tumorigénico, pasando a considerar a *p53* como un gen supresor de tumores.

El importante papel de *p53* en cáncer se hizo patente con el descubrimiento, ese mismo año de deleciones y mutaciones de *p53* asociadas al cáncer de colon (Vogelstein *et al.*, 1989). Posteriormente, se han ido describiendo frecuentes mutaciones que causaban la inactividad de uno de los alelos en una extensísima variedad de tumores humanos: pulmón, mama, hígado, ovario, vejiga, cerebrales, estómago, esófago, sarcomas, linfomas y leucemias.

3.2.5.1. Presión selectiva sobre p53

Como hemos observado *p53* juega un papel destacado en la regulación negativa de la progresión del cáncer. La mayoría de las rutas implicadas en la activación de senescencia o apoptosis tiene como fin la activación de *p53*. Prueba de la importancia de *p53* como supresor de tumores queda reflejada por el hecho de la existencia de presión selectiva a la que se ve sometido durante el proceso de desarrollo de los diferentes tumores. Durante los estadios tempranos de la progresión tumoral se produce un fenómeno selectivo de células defectivas de componentes de DDR como ATM y principalmente de *p53*, comprometiendo la parada celular, la senescencia o la apoptosis. El daño en el ADN inducido por oncogenes, principalmente DSBs, aumentan la

probabilidad de sufrir inestabilidad genómica. Bajo estas condiciones se produce una presión selectiva sobre p53 mediante la cual la célula trata de evadir los mecanismos de defensa de los que p53 es una pieza clave (Gorgoulis *et al.*, 2005).

En lesiones precancerosas, aquellas células que no sufran apoptosis o arresto celular permanente tienen mayor probabilidad de cometer errores en los procesos de reparación de DSBs provocando un desequilibrio alélico. Estas zonas de desequilibrios son más sensibles al estrés replicativo convirtiéndose en dianas de nuevas alteraciones pudiendo ser mutado el alelo WT. De esta manera, con el tiempo, el loci del supresor de tumores p53 es diana de estas alteraciones, liberando a la célula de los efectos supresores de los *checkpoints* activados tras la existencia de daño en el ADN facilitando así la progresión del tumor (Gorgoulis *et al.*, 2005).

Experimentos realizados con tumores de vejiga de baja, media y alta inestabilidad genómica, han revelado que los tumores con menor inestabilidad presentaban una clara activación de la ruta ATM/Chk2/p53. De igual manera ocurre con los tumores de grado medio. Sin embargo, en carcinomas con alta inestabilidad genómica la activación de la vía es menor. De forma reveladora las mutaciones en p53 y Chk2, así como la pérdida de heterocigosidad en genes implicados en la ruta ATM/Chk2/p53, son mucho más abundantes en tumores con inestabilidad alta y media (Bartkova, *et al.*, 2005) lo cual indica que la cascada ATM/Chk2/p53 se activa antes de que ocurran mutaciones en genes implicados en la detección de daño en el ADN. Por lo tanto se establece así una progresión temporal donde la activación de DDR actúa como una barrera contra el cáncer, la inestabilidad genética y contra la presión selectiva sobre mutaciones que afectan a p53 y otros supresores de tumores.

4. Los gliomas

El objetivo del presente trabajo consiste en conocer y comprender los mecanismos moleculares que interviene en proceso de transformación de las células de la glía que está indefectiblemente asociada a la formación de glioblastomas y en particular a los glioblastomas multiforme (GBM). El GBM es el más-agresivo de los tumores cerebrales y uno de los tumores con peor pronóstico dentro de los tumores humanos. Por ello, es de vital importancia llegar a comprender los mecanismos patológicos que controlan la proliferación glial en este tipo de tumores, abriendo el camino a nuevas terapias que faciliten su tratamiento.

El sistema nervioso central (SNC) es el encargado de recoger, analizar y generar las respuestas acorde a la información proporcionada por los receptores periféricos. Estas funciones son realizadas por las neuronas, y coordinadas mediante las conexiones sinápticas entre ellas. Además de las neuronas, responsables directas de las funciones cerebrales, el tipo celular más abundante en el SNC es la glía. Su número supera en 10-30 veces al de las neuronas y carecen de la capacidad de generar señales eléctricas, siendo su función principal la de dar soporte, de forma similar a la realizada por el tejido conectivo en otros órganos.

En el SNC las células gliales se dividen fundamentalmente en dos grupos: la macroglía, compuesta por los astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos. Todas ellas de origen ectodérmico. Por otro lado, está la microglía compuesta por los fagocitos, que son parte del sistema inmunitario.

Los gliomas son los tumores primarios más comunes que afectan al sistema nervioso. La definición de glioma abarca a una amplia colección de tumores primarios que afectan al SNC y que presentan una morfología y expresión génica similar a la glía.

Como ya hemos mencionado, la glía es el tejido conectivo específico del SNC que además de dar soporte físico a las neuronas, permiten su correcto funcionamiento. Cualquiera de los distintos tipos celulares que conforman la glía, es susceptible de alteraciones génicas o cromosómicas que desemboquen en la aparición de un glioma,

por lo tanto la definición de glioma engloba una amplia colección de tumores primarios que surgen en el SNC y afectan a las estructuras cerebrales circundantes (**Figura 11**). Sin embargo, son los gliomas que tienen su origen en la alteración y malignización de los astrocitos los más abundantes. Quizás la elevada proporción de astrocitomas frente a otro tipo de gliomas, ha llevado a la comunidad médica a la utilización de astrocitoma para denominar a los gliomas en general.

Dentro de los gliomas, el glioblastoma multiforme (GBM) es el más maligno de los tumores cerebrales primarios y casi siempre presenta un pronóstico fatal. En la actualidad las alteraciones genéticas que pueden desencadenar esta enfermedad han sido desveladas. La experimentación con ratones modificados genéticamente han arrojado luz sobre los mecanismos etiopatogénicos de esta enfermedad y han proporcionado una serie de herramientas que permiten identificar y probar nuevas estrategias terapéuticas.

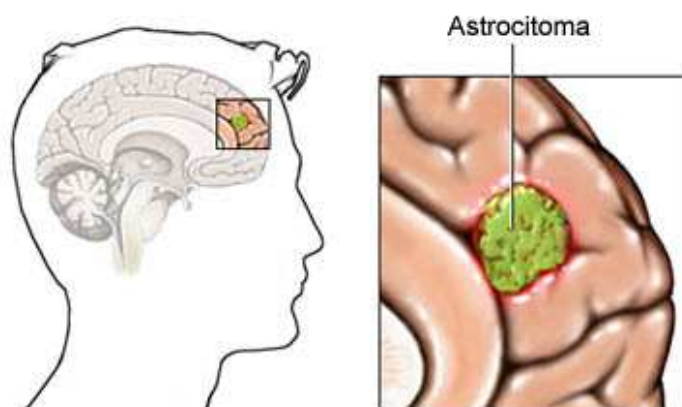


Figura 11. Representación de un corte sagital del encéfalo afectado por un astrocitoma.

4.1. Gliomas: grados y pronóstico

La OMS (Organización Mundial de la Salud) divide a este tipo de tumores en cuatro grados clínicos en base a una serie de criterios como la edad del paciente, localización del tumor, características radiológicas, histología y alteraciones genéticas, entre otros (Louis *et al.*, 2007). La combinación de todas estas variantes va a determinar el

pronóstico del paciente. De esta forma, el glioma de grado I, también conocido como astrocitoma pilocítico, es tratable quirúrgicamente y presenta un pronóstico muy favorable. Los pacientes con un glioma de grado II presentan una esperanza de vida mayor a los cinco años, mientras que la supervivencia de los pacientes afectados por gliomas de grado III desciende a los dos o tres años. El pronóstico de los pacientes que presentan el glioma más maligno, denominado glioma de grado IV o GBM, va a depender de la disponibilidad de un tratamiento efectivo, pero la esperanza de vida no suele superar el año. La aparición y desarrollo de los GBM puede surgir de forma espontánea o bien por progresión de un glioma de grado menor a uno de peor pronóstico a lo largo del tiempo. De esta forma, los pacientes diagnosticados con una lesión de grado bajo a menudo progresan a GBM antes de su muerte (Louis *et al.*, 2007).

Histológicamente los diferentes grados de gliomas son fácilmente distinguibles, destacando las diferencias en la densidad y heterogeneidad de las células que forman el tumor. Por otra parte, el aumento de la vascularización y la aparición de áreas de necrosis tumoral y hemorragias son rasgos característicos de gliomas anaplásicos y GBM.

4.2. Alteraciones genéticas en gliomas

Diversas alteraciones en la expresión de genes y anormalidades cromosómicas son comúnmente encontradas en los gliomas, existiendo una alta correlación entre dichas alteraciones y el grado de glioma (Hollan *et al.*, 2001; **Figura 12**). En los gliomas de más bajo grado, diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), Factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF2) y el factor de crecimiento neurotrófico ciliar (CNTF), así como sus receptores, se encuentran comúnmente sobreexpresados, y el supresor de tumores p53 está a menudo mutado. Los gliomas de grado III adicionalmente muestran un aumento en la incidencia de desregulación o trastorno de vías que actúan como freno del ciclo celular como la pérdida de función locus *ink4a/ARF* que codifican a p16^{INK4a} y p19^{ARF} (Jen *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994; Quelle *et al.*, 1995). Este tipo de tumores también suelen presentar una sobreexpresión asociada a la amplificación del locus *CDK4* (He *et al.*, 1994; He *et*

al., 1995; Ichimura *et al.*, 1996), así como la pérdida del gen supresor de tumores retinoblastoma *Rb1*.

	Astrocitoma de grado bajo (5-10 años)	Astrocitoma anaplásico (2-3 años)	Glioblastoma (9-12 meses)
Supervivencia			
Proliferación	+/-	++	+++
Invasividad	++	++	+++
Angiogénesis	-	-	+++
Necrosis	-	-	+++
Rx respuesta	-	++	-
	P53 mutado Sobreexpresión PDGF/R	Rb mutado Amplificación CDK4 Pérdida INK4a/ARF Pérdida PTEN Pérdida 19q Pérdida 11q	Amplificación EGFR EGFR mutado Pérdida INK4a/ARF Pérdida PTEN Rb mutado

Figura 12. Esquema de las alteraciones más frecuente que contribuyen a la formación de los distintos grados de astrocitomas.

Además de las mutaciones ya mencionadas, los gliomas de grado IV o GBMs muestran frecuentemente pérdida de la región cromosómica 10q 22-25, región portadora de varios supresores de tumores, entre los que destaca el gen *PTEN*. La amplificación y mutaciones activadoras de en el gen que codifica el factor de crecimiento epidermal (*EGFR*) es también una alteración común de los GBMs.

No todas las mutaciones mencionadas se encuentran en todos los tumores de un determinado grado, pero su alta incidencia y la correlación con el grado de tumor destaca la importancia de las rutas que específicamente afectan al proceso de gliomagénesis. El efecto sumatorio de estas alteraciones contribuye a la biología de los diferentes tipos de gliomas.

4.3. Modelo de Glioblastoma

Los pacientes diagnosticados con un glioma de alto grado son sometidos a un tratamiento que incluye la resección de la masa tumoral, seguido de tratamiento con radioterapia y posterior quimioterapia. Este tratamiento solamente es efectivo en un bajo porcentaje de pacientes, produciéndose habitualmente recidiva del tumor (Louis *et al.*, 2007).

Aunque, hasta el momento la utilización de modelos animales para encontrar nuevas estrategias para el tratamiento de gliomas en humano no han fructificado. El estudio con animales modificados genéticamente permite recapitular fielmente las lesiones que contribuyen a la inducción y progresión del tumor en humanos. Es por ello, que en el presente trabajo se ha aprovechado esta tecnología con la intención de llegar a conocer en profundidad la biología de este tipo de tumores, con el ánimo de encontrar alguna diana terapéutica que mejore su tratamiento.

Del amplio espectro de alteraciones genéticas que intervienen en el desarrollo de los glioblastomas hemos reproducido dos de las alteraciones más frecuentes que cooperan en la formación de este tipo de tumores humanos: la hiperactivación de vías de señalización intracelular y la pérdida del supresor de tumores *Rb1*. Para ello hemos utilizado astrocitos primarios de ratón *knockout* condicional de *Rb1* (Marino *et al.*, 2000) como modelo celular. Estas células nos permiten contextualizar de forma más rigurosa la etiología del tumor ya que se tratan de células gliales. Además, el hecho de provenir de ratones *knockout* condicionales para *Rb1* nos permite modelizar de forma sencilla y directa la inactivación somática de *Rb1* mediante recombinación de dicho gen.

Por otra parte, para recapitular el efecto de la amplificación o mutaciones activadoras de genes que codifican factores de crecimiento como puede ser el caso de EGFR, alteraciones comunes de los GBMs, hemos escogido la expresión del oncogén HRas, concretamente la forma constitutivamente activa HRas^{V12}. Esta elección se basa en el hecho de que Ras es el encargado de integrar las señales mitogénicas inducidas por la unión de factores de crecimiento a sus respectivos receptores celulares. Además, La

sobreexpresión del oncogén *Ras* es un sistema validado en varios modelos animales para el estudio de gliomas (Ding *et al.*, 2001; Shannon *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

Objetivos

1. Estudio de los mecanismos de respuesta al daño en ADN (DDR) y senescencia inducida por oncogén (OIS), basado en modelos de gliomas humanos.
2. Validación y análisis comparado de los datos obtenidos en los modelos animales en muestras de gliomas humanos (TMAs).
3. Caracterización de nuevos marcadores y dianas terapéuticas en gliomas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y Métodos

1. Ratones knockout *Rb1*

La cepa de ratones C57BL/6 *Rb1* knockout (Jacks *et al.*, 1992; A partir de ahora $Rb^{-/-}$) presentan insertado en el alelo mutado un casete de expresión de neomicina que impide la expresión de *Rb1*. Estos ratones deficientes de Rb, no son viables y mueren durante la embriogénesis ya que presentan graves deficiencias en el desarrollo de los sistemas hematopoyéticos y nervioso, por lo que es necesario mantener la colonia en heterocigosidad ($Rb^{+/-}$).

2. Ratones knockout condicionales *Rb1*

La cepa de ratones FVB:129-*Rb1*^{tm2Brn} (Nacional Cancer Institute; MMHCC; A partir de ahora $cRb^{loxP/loxP}$), porta una mutación condicional en el gen endógeno *Rb1* (Marino *et al.*, 2000). Esta mutación consiste en la presencia de dos sitios *loxP* que se encuentran situados en los intrones que flanquean el exón 19 del locus de *Rb1*. Utilizando la propiedad que posee la recombinasa Cre se producirá la recombinación de exón 19 de *Rb1* ya que Cre reconoce los sitios *loxP* eliminando el ADN que se encuentra entre ambas secuencias.

3. Cultivo de MEFs

A partir de embriones de ratón de trece días de edad de padres $Rb^{+/-}$ se obtuvieron los fibroblastos de embriones de ratón (MEFs) tanto $Rb^{-/-}$ como WT o $Rb^{+/+}$.

La extracción de los embriones del útero de la madre, así como el resto del cultivo fue llevada a cabo en condiciones estériles en una cámara de flujo vertical. Con los embriones libres del útero materno y del saco amniótico, el cuerpo de los embriones se procesó con la ayuda de escalpelos, con el fin de facilitar su homogenización.

Los fragmentos de cada embrión se recogieron en un tubo estéril y se lavaron dos veces con 5 ml de PBS a 4°C. Tras retirar el PBS se añadieron a cada embrión 2 ml de tripsina al 0,25% y se mantuvieron a 4°C entre 6 y 18 horas. A continuación, se incubaron los fragmentos con la tripsina a 37°C durante 30 minutos y se les añadió posteriormente 4 ml de medio *Dulbecco modified Eagle medium* (DMEM, Sigma) con un 10% suero bovino fetal, 1% L-glutamina, y 1% penicilina/estreptomicina (GIBCO-Invitrogen) a 37°C para su homogenización utilizando una pipeta de 1 ml.

Una vez terminado el proceso de homogeneización, las células de cada embrión se sembraron en una placa de 100 mm de diámetro con 9 ml de medio DMEM completo (DMEM, 10% de FBS, 1% glutamina y 1% penicilina/estreptomicina) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia (aproximadamente 48 horas), considerándose que las células se encontraban en ese momento en pase cero.

El genotipo de cada ratón o embrión fue determinado a partir de 0,5 µg de ADN aislado de la cabeza mediante amplificación por PCR, utilizando tres oligos cebadores RX3, RI3 y PGK3'. El alelo salvaje fue amplificado utilizando los oligos RX3 y RI3, y los oligos RX3 y PGK3' para amplificar alelo mutado. El alelo mutado se presenta como una banda de mayor peso que el alelo salvaje, ya que para generar los ratones *knockout* de *Rb1* se insertó en el intron 3 un casete de expresión de neomicina con el cual híbrida el oligo PGK3'.

4. Cultivo de Astrocitos

Los astrocitos *cRb^{loxP/loxP}* fueron obtenidos de ratones *cRb^{loxP/loxP}* de 3 días de edad. Los cultivos se realizaron utilizando el cerebro de los animales de una misma camada y procesando dicho tejido mediante disgregación física y posterior tamizado a través de filtros de 40µm de tamaño de poro en condiciones estériles. A continuación se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1000 g y el sedimento celular se resuspendió y sembró en placas de 90 mm de diámetro a razón de un cerebro por placa. Los astrocitos se mantuvieron en DMEM con un 10% suero bovino fetal, 1% L-glutamina, y 1% penicilina/estreptomicina. Tras 24 horas de incubación, el cultivo se

lavó con PBS y se le añadió medio fresco. Los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}$ no se mantuvieron más de 7 días en cultivo antes de comenzar los experimento.

La caracterización del cultivo se llevó a cabo mediante la detección de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) por inmunohistoquímica (**Figura 13**). La GFAP es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos. Los astrocitos se cultivaron en cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Una vez en cultivo las células se fijaron con etanol al 96%. Tras la fijación las células se rehidrataron con etanol al 30% y se calentaron en el microondas durante 5 minutos en tampón citrato pH 6. Tras lavar con TBS las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-GFAP (Dako) en una dilución 1:400 en TBS + Tritón 0,1% durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación con el anticuerpo primario se lavaron las muestras y se trataron con peróxido de hidrógeno. Como método de detección se utilizó el sistema EnVision™ k5007 (Dako) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para finalizar, las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina durante 30 segundos deshidratadas y montadas en portaobjetos con medio de montaje.

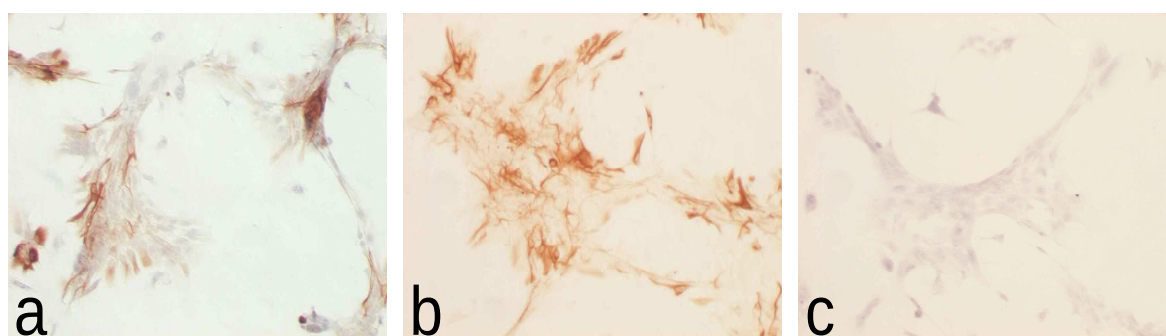


Figura 13. Caracterización de astrocitos en cultivo. **a-b.** Inmunohistoquímica de GFAP con y sin hematoxilina. La inmunohistoquímica muestra una alta positividad para GFAP, lo que indica un enriquecimiento en el cultivo de astrocitos. **c.** Inmunohistoquímica de vimentina, la falta de positividad para este anticuerpo indica que el cultivo no se encuentra contaminado por fibroblastos

5. Infección retroviral

Dada la dificultad de transfectar los astrocitos de cultivo primario, se utilizó la infección retroviral para inducir la expresión del oncogén Ras mutado (HRas^{V12}) y la pérdida del *Rb1* en nuestras células *cRb*^{loxP/loxP}. Para este cometido se utilizaron células phoenix empacadoras de retrovirus ecotrópicos (Swift *et al.*, 2001). Las células phoenix fueron cedidas por Carsten Watzl (*Institute for Immunology, University Heidelberg*). Mediante transfección por cristales de fosfato de calcio se introdujeron en las células phoenix los plásmidos retrovirales pBABE, pBABE-HRas^{V12}, PIG y PIG-CRE (**Figura 14**).

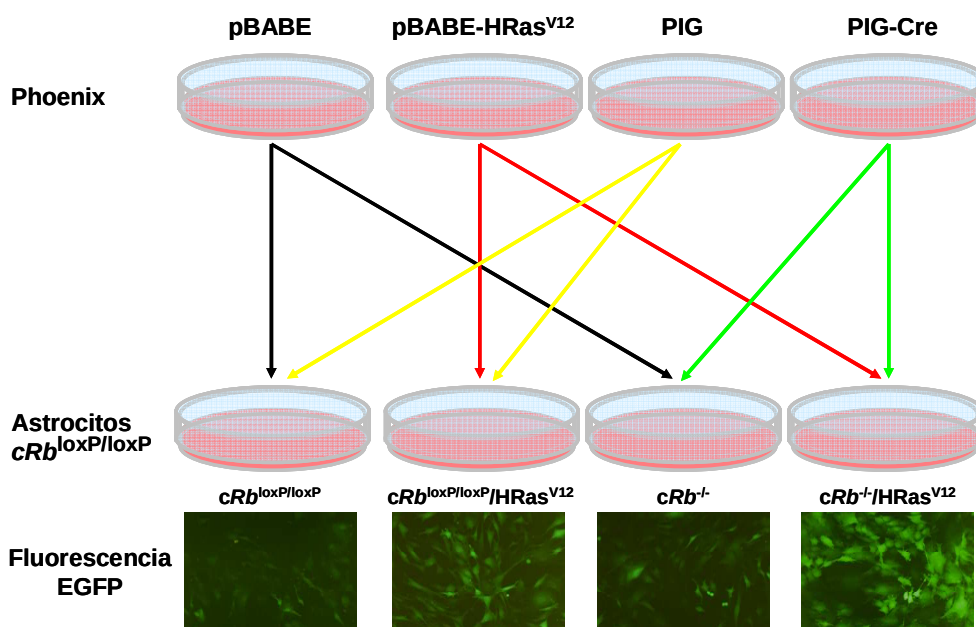


Figura 14. Esquema de infección retroviral. El sobrenadante de las células phoenix enriquecido en retrovirus se añadió al medio en el orden que indica el esquema. Como se muestra en las imágenes, los astrocitos que han sido infectados codifican la proteína EGFP, cuyo gen se encuentra incluido en plásmido PIG. Esta proteína actúa como marcador fluorescente que permite valorar el nivel de infección obtenido en cada experimento

Transcurridas 48 horas de la transfección los astrocitos fueron infectados utilizando el medio enriquecido en retrovirus de las células phoenix. Este medio enriquecido fue previamente filtrado con filtros de 0,45 µm de PVDF (Millipore) y suplementado con 4µg/ml de polibreno (Sigma). Los astrocitos infectados se seleccionaron durante dos días con 2µg/ml de puomicina, por lo que aquellas células que no hayan incorporado el

gen de resistencia a puromicina proporcionado por pBABE o PIG mueren y no forman parte del cultivo. El vector retroviral PIG codifica para la proteína EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) que permite monitorizar la eficiencia de la infección (**Figura 14**).

6. Curvas de proliferación con cristal de violeta

Los astrocitos infectados se sembraron en una cantidad de 5000 astrocitos en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. En los días uno, tres, cinco y siete, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con ácido acético-metanol 1:3 durante 15 minutos. A continuación las células se tiñeron con una dilución al 0,1% de cristal violeta (Sigma) durante 30 minutos para posteriormente lavar el exceso de colorante con PBS. Cuanto mayor sea el número de células en cada pocillo mayor será el colorante retenido por ellas. Para cuantificación, el cristal violeta contenido en las células se extrajo con ácido acético al 10% y se cuantificó en un espectrofotómetro la absorbancia de la solución a 595nm de longitud de onda. Cada grupo experimental se sembró por triplicado y los experimentos se repitieron en al menos tres ocasiones.

7. Incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU)

La incorporación de BrdU es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de la proliferación celular. La BrdU es un análogo del nucleósido timidina que puede ser incorporado al ADN durante la replicación celular. Mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-BrdU podremos cuantificar el porcentaje de astrocitos que activamente han replicado su ADN durante el tiempo que estuvieron expuestos a la BrdU.

Para este experimento los astrocitos se sembraron sobre un cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos en una cantidad de 5000 células por pocillo. A los cinco días de estar en cultivo las células se trataron con 10µM de BrdU (Sigma) durante cinco horas. Transcurrido el tiempo de incubación las células se lavaron con PBS y se fijaron con etanol al 70%. Posteriormente se retiró el etanol y tras lavar con PBS se realizó la desnaturalización del ADN durante 15 minutos con HCl 4N. Tras tres lavados con PBS las células se bloquearon 15 minutos con PBS, BSA 0,5% y Tween 0,5%. A

continuación se incubaron las células durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario Anti-BrdU monoclonal (B-2531 Sigma) diluido 1:100 en solución de bloqueo. Seguidamente se realizó un lavado con PBS y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Cy3 (315-166-047 Jackson ImmunoResearch) diluido 1:150 en solución de bloqueo. Tras lavar con PBS se incubaron las células con Hoechst 33258 (Sigma) a una concentración de 0,125 μ M durante 30 minutos. Las fotografías se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Olympus IX70 para calcular posteriormente el porcentaje de núcleos que incorporaron BrdU (fluorescencia roja) frente al número de núcleos totales teñidos con Hoechst 33258 (fluorescencia azul).

8. Ensayos de transformación

Para los ensayos de transformación se utilizaron ratones SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*). Estos ratones padecen inmunodeficiencia combinada severa careciendo de un sistema inmunológico propio funcional. Es esta característica la que hace de los ratones SCID un modelo ideal para comprobar *in vivo* la capacidad de formación de tumores.

Mediante inyección subcutánea, se introdujeron en la espalda de cada ratón 3 millones de astrocitos resuspendidos en un volumen de 0,1 ml de PBS. Los ratones inyectados fueron controlados semanalmente, considerando que se había desarrollado tumor cuando la masa tumoral presentaba un diámetro superior a 4 mm. Una vez que los tumores alcanzaban un diámetro no superior a los 12 mm los animales fueron sacrificados y se les realizó la necropsia.

9. Senescencia y cuantificación de la apoptosis

La actividad SA- β -gal fue realizada utilizando un kit de tinción de β -galactosidasa (Cell Signaling). Al igual que en las curvas de proliferación, 5000 astrocitos se sembraron por triplicado en cada pocillo de una placa de 24 pocillos.

La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante cuantificación de núcleos apoptóticos. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (Sigma) a una concentración de 0,125 μ M durante 30 minutos en oscuridad. Las células se lavaron con PBS y se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia Olympus IX70. Los experimentos se repitieron en al menos tres ocasiones.

10. Immunoblot

La extracción de proteína total de las muestras de astrocitos se realizó mediante la lisis celular con tampón RIPA (1x PBS, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1 % SDS, 10 mg/ml PMSF, 40 μ g de aprotinina/ml, 100 mM ortovanadato). Los astrocitos se incubaron en este tampón durante 30 minutos en hielo y seguidamente se sometieron a dos pulsos de sonicación de 3 segundos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos utilizando el sobrenadante donde se encuentra el extracto de proteína total de las células. Una vez cuantificada la proteína se cargaron 40 μ g del extracto de cada muestra en un gel de acrilamida. El análisis de las proteínas se llevó a cabo utilizando los anticuerpos policlonales anti p53 (CM5; Novocastra), anti-p-p53 ser15 (9284; Cell Signaling), anti-p19^{ARF} (ab80; Abcam), anti-p38MAPK (C-20; Santa Cruz), anti pp38MAPK(Thr180/Tyr182) (sc-17852 ;Santa Cruz), anti-p16 (M-156; Santa Cruz), anti-p107 (C-18; Santa Cruz), anti- γ H2AX Ser139 (07-164 Upstate) y anti-Wip1 (H-300; Santa Cruz) y los anticuerpos monoclonales anti-pan-Ras (Ab-3; Calbiochem), anti-pan-Ras^{V12} (Ab-1; Calbiochem), anti- α -Tubulina (T5168; Sigma) y anti-Rb (554136; BD). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron el oveja anti-raton y burro anti-conejo IgG conjugados con HRP (GE Healthcare).

11. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción de ROS por los astrocitos fue determinada utilizando la sonda fluorescente DHE (dihidroetidina, Molecular Probes). Los astrocitos se incubaron con 5 μ M de DHE a 37°C durante 30 minutos y protegidos de la luz. DHE es un compuesto permeable que se convierte en etidio fluorescente por la acción de los radicales del oxígeno (O₂⁻). Por lo tanto, la producción de ROS intracelular se determinó por el

aumento de fluorescencia observada en un microscopio de fluorescencia Olympus IX70 bajo idénticas condiciones en todos los grupos experimentales.

12. Preparación de cromosomas en metafase y FISH

Las extensiones de cromosomas en metafase se prepararon a partir de astrocitos en crecimiento exponencial tratados con colcemida (0,1 µg/ml) durante 7 horas. Las células se incubaron en tampón hipotónico (0,05 M KCl, 0,0034 M citrato trisódico) durante 20 minutos a 37°C y se fijaron con metanol al 75% y ácido acético al 25%. Las células fueron extendidas sobre un portaobjetos y teñidas con un 2% de Wright en tampón Gurr pH 7,0. Los cromosomas en metafase se contabilizaron utilizando un microscopio Leica 2005 bajo el objetivo de inmersión 100X. Al menos 50 metafases en tres experimentos independientes fueron analizadas. El T-FISH fue llevado a cabo sobre cromosomas en metafase no teñidos utilizando una sonda de ácido nucleico peptídico marcada con Cy3. Para el T-FISH, tanto la sonda de ADN como los portaobjetos fueron desnaturalizados a 80°C durante 5 minutos e hibridados a 37°C durante 2 horas siguiendo las especificaciones de Dako Cytomation. Las muestras fueron contrateñidas con DAPI, y las imágenes se capturaron con el microscopio Leica 2005 equipado con el software de Leica 4000.

13. Inmunohistoquímica

Veinte casos de astrocitomas humanos: diez de grado bajo (grados I-II) y diez de alto grado (grados III-IV), fueron obtenidos de los archivos del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela. Los tumores han sido diagnosticados teniendo en cuenta los criterios estándar de la última clasificación WHO (Louis *et al.*, 2007). Dos *microarrays* de tejido (TMAs) fueron creados con dichas muestras escogiendo dos cilindros de 1,5mm de diámetro de dos áreas representativas de cada tumor. Controles externos e internos fueron incluidos en cada TMA. Los TMAs fueron seccionados para la obtención de cortes de 4 µm de espesor.

La inmunohistiquímica fue realizada utilizando un kit de anticuerpo secundario que utiliza un polímero de dextrano marcado con peroxidasa conjugada (Envision Plus, Dako). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Wip1 (polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, USA) y fosfo-histona H3 (polyclonal, Cell Signaling Technology). Como paso previo a la inmunotinción se realizó una recuperación de los antígenos mediante incubación de 20 minutos en tampón Tris-EDTA pH9 para Wip1 y en tampón citrato pH 6 para la fosfo-histona H3. La incubación con los anticuerpos primarios se llevo a cabo a 4°C durante toda la noche.

14. Tratamiento con inhibidores de Wip1

Los cuatro grupos experimentales de astrocitos fueron tratados con los inhibidores químicos CCT007093 (Maybridge, Cornwall, UK) o Trióxido de Arsénico (Sigma) a una concentración de 25 mM y 10 μ M el segundo día de cultivo tras la selección con puromicina. El tratamiento se mantuvo durante cinco días para los experimentos de proliferación y durante cuatro para la actividad SA- β -gal.

RESULTADOS

Resultados

Teniendo en cuenta que la hiperactivación de vías de señalización intracelular y la pérdida de reguladores del ciclo celular son alteraciones comunes en el glioblastoma multiforme (Holland, 2001), hemos analizado el papel de la sobreexpresión de HRas^{V12} y/o la pérdida de *Rb1* en astrocitos murinos con la intención de conocer y comprender los mecanismos moleculares que interviene en el desarrollo de los gliomas. Para este propósito, se han utilizado astrocitos obtenidos de ratones *knockout* condicionales de *Rb1* (Astrocitos *cRb^{loxP/loxP}*) como modelo para el estudio de los astrocitomas. El trabajo con células primarias obtenidas a partir de estos ratones nos permite reproducir de forma controlada los eventos oncogénicos a los que se ven sometidos los astrocitos durante la progresión de este tipo de tumores cerebrales, y así poder conocer el comportamiento de estas células frente a dichos estímulos oncogénicos.

Mediante infección retroviral hemos conseguido que nuestro astrocitos condicionales expresen el alelo mutado de Ras (HRas^{V12}) y/o la proteína recombinasa Cre, la cual es capaz de eliminar de manera específica el intrón 19 del gen *Rb1* que se encuentra flanqueado por regiones *loxP* en nuestros ratones *knockout* condicionales (Marino *et al.*, 2000; **Figura 15**). De esta forma conseguimos imitar, tanto la hiperregulación de receptores de factores de crecimiento como EGFR o FGFR observada en glioblastomas, mediante la sobreexpresión de Ras oncogénico, como la desregulación del ciclo celular mediante la inactivación de la proteína Rb.

A pesar del importante papel que desempeña la ruta la Ras/Raf/MEK/ERK en el control de la proliferación. Se ha demostrado que en cultivos primarios, tanto de células humanas como murinas, la amplificación del oncogén Ras o bien la expresión de la proteína Ras constitutivamente activada no es capaz de inducir proliferación ni transformación celular. Curiosamente, la acción oncogénica de Ras induce el arresto celular en G₁ en lo que se ha dado en llamar senescencia inducida por oncogén (OIS) (Serrano *et al.*, 1997; Fanton *et al.*, 2001; Brookes *et al.*, 2002).

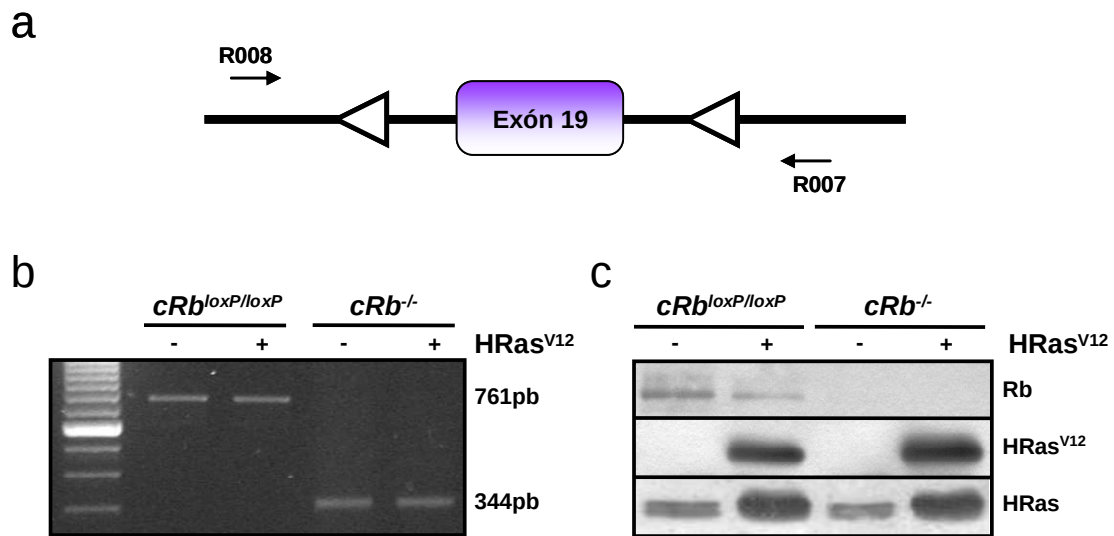


Figura 15. Caracterización de los grupos experimentales. **a.** Estructura del alelo *cRb^{loxP/loxP}*: los sitios *loxP* se encuentran flanqueando el exón 19 del gen *Rb1*. **b.** Genotipado de los astrocitos para *Rb1*. Las células infectadas con el plásmido vacío PIG (*cRb^{loxP/loxP}*) presentan una banda de 761 pb mientras las células que expresan el plásmido PIG-Cre presentan una única banda de 344 pb, lo que indica de las células han sufrido una recombinación completa del exón 19 del gen *Rb1* (*cRb^{-/-}*). La localización de los oligos usados para el análisis (R008 y R007) aparece ilustrada en el panel superior. **c.** Caracterización de los astrocitos infectados mediante *western blot*. Los niveles de proteína de Rb son evidentes en los astrocitos *cRb^{loxP/loxP}*, mientras que no se detecta proteína en los astrocitos *cRb^{-/-}* ya que han sufrido recombinación del gen *Rb1*. Los astrocitos que expresan el plásmido pBABE-HRas^{V12} muestran altos niveles de esta proteína mutada.

Con el fin de validar nuestro método experimental, hemos infectado fibroblastos primarios de ratón (MEFs WT y MEFs *Rb^{-/-}*) con el vector retroviral pBABE-HRas^{V12}. Los resultados obtenidos reproducen fielmente los mostrados en la bibliografía (Serrano *et al.*, 1997). La expresión de HRas^{V12} provoca un descenso de la proliferación de los MEFs (**Figura 16a**). Esta disminución en la ratio de proliferación es debido a que HRas^{V12} induce senescencia en los MEFs, determinada mediante un ensayo de actividad β -galactosidasa (**Figura 16b**).

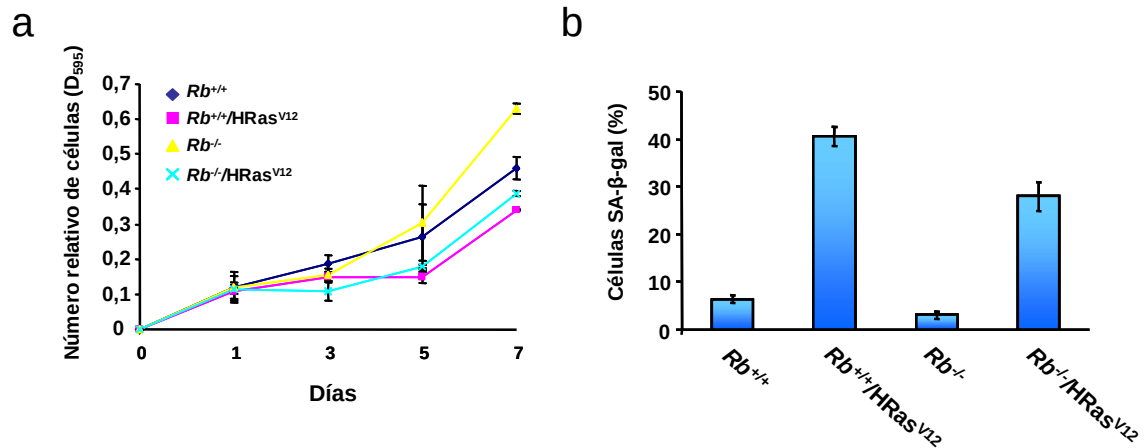


Figura 16. Los MEFs presentan una disminución de la proliferación cuando son sometidos a la expresión de Ras oncogénico. **a**, Curva de crecimiento de MEFs *wild-type* (*Rb*^{+/+}) y MEFs *Rb1 knockout* (*Rb*^{-/-}) infectados con los vectores retrovirales pBABE (vector vacío) o pBABE-HRas^{V12}. Cada punto representa la media $\pm$ DE de tres replicados. **b**, Ensayo de senescencia. El eje y representa el porcentaje de células positivas para SA- β -galactosidasa (media $\pm$ DE de tres replicados).

El siguiente paso ha sido comprobar si este mismo fenómeno ocurre también en los astrocitos. Inesperadamente, tanto los astrocitos infectados con PIG-Cre/pBABE-HRas^{V12} (astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}) como los astrocitos infectados con PIG/pBABE-HRas^{V12} (astrocitos *cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12}), lejos de presentar un arresto del ciclo celular, muestran un aumento en la ratio de proliferación con respecto al los astrocitos control *cRb*^{loxP/loxP}. Además, nuestros datos revelan una sorprendente cooperación entre Ras oncogénico y la pérdida del supresor de tumores *Rb1*. Cuando los astrocitos sufren la delección de *Rb1* conjuntamente con expresión de HRas^{V12} (astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}) la ratio de proliferación aumenta con respecto a los astrocitos *cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12} que solo expresan HRas^{V12} (**Figura 17a**).

Con el fin de corroborar estos resultados, llevamos a cabo un ensayo de incorporación de BrdU. Los datos obtenidos con este ensayo se correlacionan con el resultado obtenido en la curva de proliferación con cristal violeta. Aquellos astrocitos que sobreexpresan Ras oncogénico muestran un acusado incremento de la incorporación de BrdU, lo que indica que un mayor número de células están entrando en fase S en relación a los astrocitos control *cRb*^{loxP/loxP}. Además, la pérdida de *Rb1* también produce un incremento de la incorporación de BrdU en los astrocitos *cRb*^{-/-}, aunque en menor medida. Finalmente, y como hemos observado en las curvas de proliferación, la pérdida

de *Rb1* colabora con la sobreexpresión de HRas^{V12}, siendo los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} el grupo experimental que presenta una mayor incorporación de BrdU (**Figura 17b, c**).

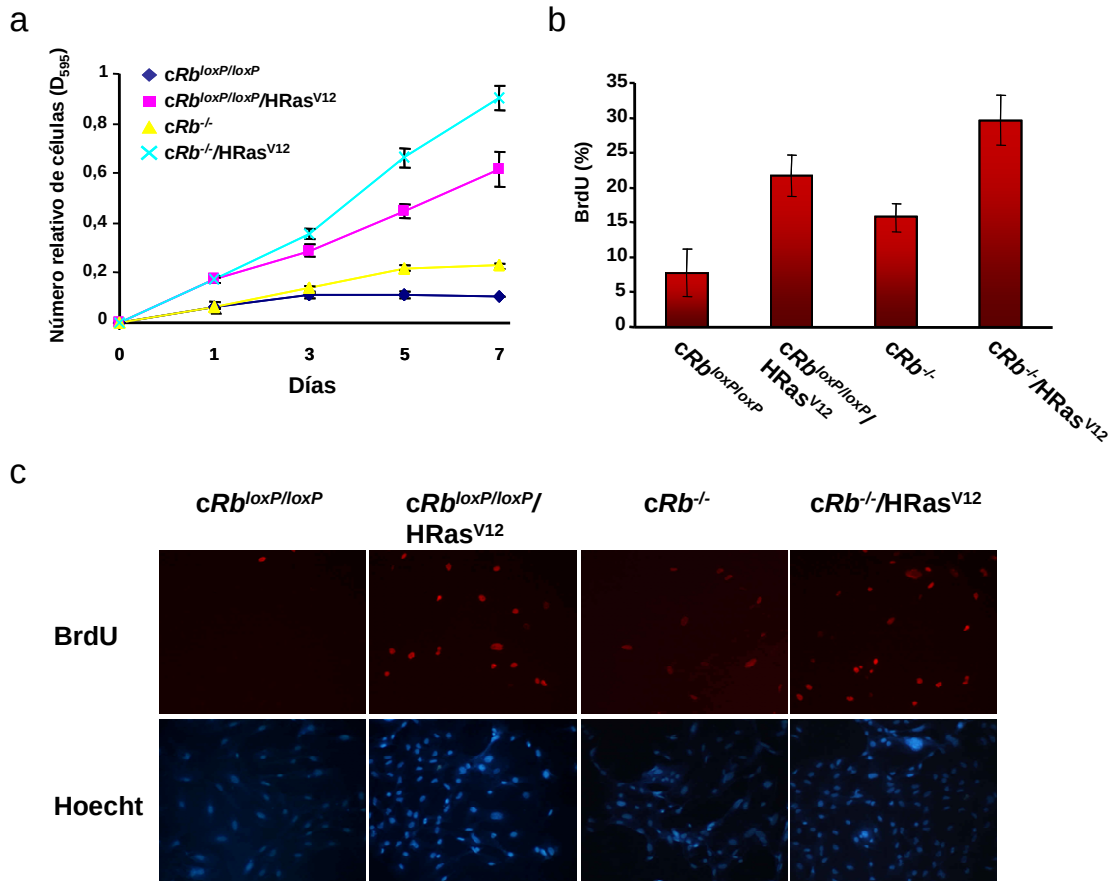


Figura 17. Los astrocitos incrementan su tasa de proliferación cuando son sometidos a la acción oncogénica de HRas^{V12} y/o a la pérdida de *Rb1*. **a**, Curva de crecimiento de astrocitos de *cRb*^{loxP/loxP} condicional co-infectados con los vectores retrovirales PIG/pBABE (vectores vacíos), PIG/pBABE-HRas^{V12}, PIG-Cre/pBABE y PIG-Cre/pBABE-HRas^{V12}. Cada punto representa la media $\pm$ DE de tres replicados. **b**, Ensayo de incorporación de BrdU en los astrocitos infectados. El eje y representa el porcentaje de células positivas para BrdU. **c**, Fotografías representativas de uno de los ensayos de incorporación de BrdU. En los paneles superiores se muestran las células que han incorporado la BrdU (Rojo). En los paneles inferiores se aprecian la totalidad de los núcleos teñidos con Hoechst 33258 (azul).

Estos datos son compatibles con el hecho de no observar actividad SA- β -galactodidasa en ninguno de los grupos experimentales, incluso en aquellos astrocitos que sobreexpresaban HRas^{V12} (**Figura 18**). Por lo tanto, en contra de lo observado en otros tipos celulares, como los fibroblastos (tanto humanos como de ratón), nuestro modelo

de astrocitos primarios no presenta signos de OIS (Serrano *et al.*, 1997; Fanton *et al.*, 2001; Brookes *et al.*, 2002). Se demuestra así que los astrocitos son capaces de evitar los mecanismos que inducen la senescencia celular dependiente de estrés oncogénico.

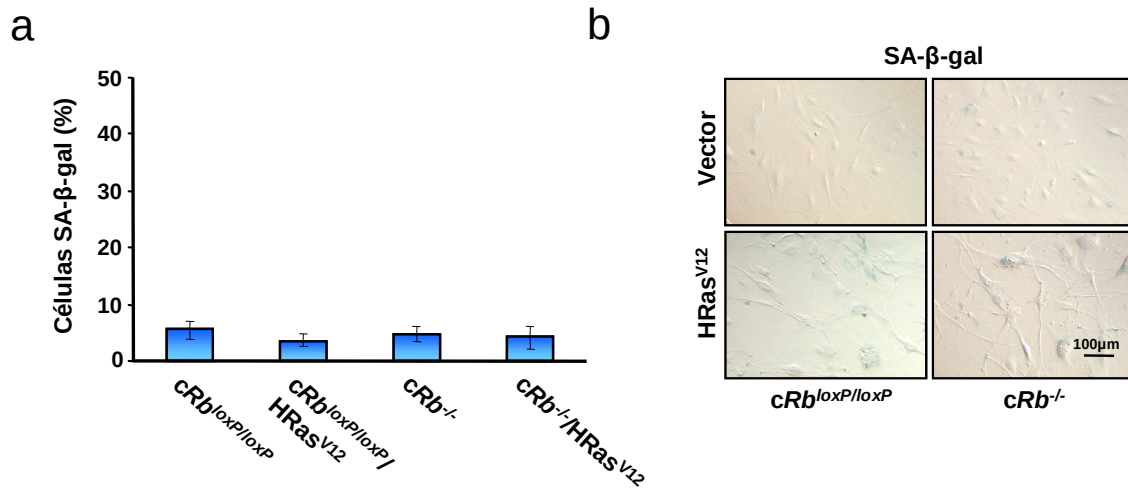


Figura 18. Ensayo de senescencia. Los astrocitos no muestran signos de OIS cuando son sometidos a la acción oncogénica de HRas^{V12} y/o a la pérdida de *Rb1*. **a**, Cuantificación del porcentaje de células con actividad SA-β-gal (media ± DE de tres replicados). **b**, Fotografías representativas de los cuatro grupos experimentales.

Por otra parte, la expresión de Ras oncogénico, además de incrementar la tasa de proliferación celular, provoca en los astrocitos cambios morfológicos. Los astrocitos infectados con Ras oncogénico, tanto los *cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}* como los *cRb^{-/-}/HRas^{V12}* muestran signos evidentes de transformación celular, presentando una morfología con numerosas prolongaciones y gran heterogeneidad en la forma y el tamaño de las células y de sus núcleos (**Figura 19a**). Este cambio en la morfología de los astrocitos fue estrictamente dependiente de la expresión de Ras oncogénico. De hecho, aquellas células que solamente sufrieron la delección del gen *Rb1*, no presenta cambios morfológicos evidentes, a pesar de mostrar un claro aumento en su tasa de proliferación.

Otro de los datos que evidencia una posible transformación de los astrocitos, es la formación de focos de crecimiento en placas de cultivo (**Figura 19b**). Este fenómeno indica que los astrocitos que expresan Ras oncogénico han perdido la capacidad de inhibición por contacto. Si bien, los astrocitos *cRb^{-/-}/HRas^{V12}* forman mayor número de

focos, los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ también son capaces de formar estos focos de crecimiento. Por lo que, podemos concluir que los astrocitos primarios muestran características propias de células transformadas debido a la acción oncogénica de Ras (Figura 19).

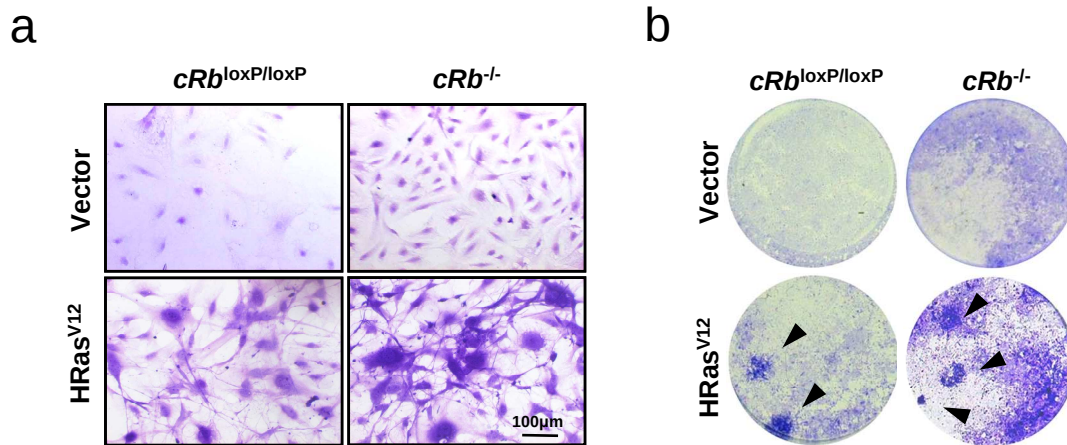
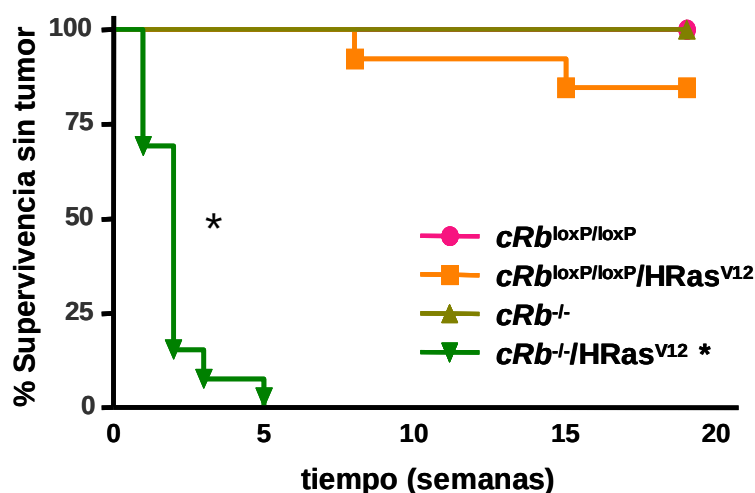


Figura 19. $HRas^{V12}$ induce transformación celular tanto en ausencia como en presencia de Rb en cultivos celulares de astrocitos. **a**, Imágenes representativas de astrocitos teñidos con cristal violeta. Los astrocitos que expresan Ras oncogénico presentan una morfología irregular, que hace pensar en una posible transformación celular. **b**, Formación de focos en placa. Esta es una característica de celular transformada. Al perderse la inhibición por contacto se favorece el crecimiento de células superpuestas manifestándose como focos de mayor tinción. Imágenes representativas del séptimo día de cultivo tras la selección con puromicina.

Dado que existen evidencias de un proceso de transformación *in vitro*, quisimos comprobar si la expresión de Ras así como la pérdida de *Rb1*, son capaces de contribuir a la transformación de los astrocitos *in vivo*. Para ello inyectamos en ratones SCID los diferentes grupos experimentales de astrocitos modificados ($cRb^{loxP/loxP}$, $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$, $cRb^{-/-}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$).

Los ratones inyectados con los astrocitos control ($cRb^{loxP/loxP}$) y los inyectados con astrocitos deficientes condicionales de *Rb1* ($cRb^{-/-}$) no desarrollan ningún tumor. Sin embargo, tanto los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ como los $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ dan lugar a la formación de tumores. Los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ forman tumores con eficiencia muy baja (2/13) y con una latencia elevada (entre 8 y 15 semanas). Por el contrario, el 100% de los ratones inyectados con los astrocitos $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ desarrollan tumor.

Además, la latencia de los tumores $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ es mucho menor a la de los tumores $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$, apareciendo los tumores $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ entre la primera y quinta semana post-inyección (**Figura 20**).



Grupo	Frecuencia
$cRb^{loxP/loxP}$	0/11
$cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$	2/13
$cRb^{-/-}$	0/7
$cRb^{-/-}/HRas^{V12}$	13/13

Figura 20. Curva de supervivencia libre de tumor (Kaplan-Meier) para la formación de tumores en ratones SCID. Los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ forman dos tumores con una latencia de 8 y 15 semanas respectivamente. Los astrocitos $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ forman tumores en el 100% de los casos y con una latencia menor a cinco semanas. * $P < 0,0001$.

Aunque los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$, al igual que los astrocitos $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$, presentan *in vitro* características de transformación celular como hiperreplicación, ausencia de OIS, cambios en la morfología celular y pérdida de inhibición por contacto, solo en ciertos casos la expresión de Ras oncogénico da lugar a la formación de tumores *in vivo* (**Figura 20**). Este comportamiento puede ser explicado por la necesidad de los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ de adquirir alteraciones o mutaciones adicionales que cooperen con este oncogén en el proceso de transformación *in vivo*. Sin embargo, existe una clara cooperación entre la pérdida de *Rb1* y expresión de Ras oncogénico en el

proceso de transformación de los astrocitos, destacando la baja latencia en la formación de este tipo de tumores.

Además de las diferencias en la latencia de los tumores, la caracterización de los tumores obtenidos en ratones SCID revela diferencias morfológicas evidentes entre los tumores originados tras inyectar astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y los originados por astrocitos $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ (**Figura 21**). Los tumores $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ presentan una morfología muy similar a la observada en astrocitomas humanos de bajo grado. Histológicamente, estos tumores están compuestos por astrocitos fibrilares bien diferenciados o neoplásicos gemistocíticos, siendo un tejido con alta celularidad y muy homogéneo en el tamaño y forma de sus células, así como en el tamaño y forma de los núcleos. Además, los tumores $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ presentan baja vascularización, característica propia de tumores de glía con baja tasa de proliferación. Por otro lado, la morfología de los tumores obtenidos de astrocitos $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ recuerda a la presentada por los GBMs humanos. Los tumores $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ están compuesto por células tumorales astrocíticas, generalmente pleomórficas, con atipia nuclear marcada y actividad mitótica enérgica, así como presencia de alta vascularización y necrosis central del tumor, típico de tumores de alto grado de proliferación (**Figura 21**).

Recientes estudios han indicado la existencia de ciertas barreras frente a la tumorogénesis, retrasando o inhibiendo la progresión de los tumores en etapas tempranas de su desarrollo. La activación de los *checkpoints* de daño en el ADN activados por el estrés replicativo del ADN así como por la acumulación de ROS, han sido descritos como los mecanismos principales para la activación de OIS y apoptosis como barreras frente a la tumorogénesis (Chen *et al.*, 2000; Bulavin *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2002; Dolado *et al.*, 2007; Di Micco *et al.*, 2006; Gorgoulis *et al.*, 2005).

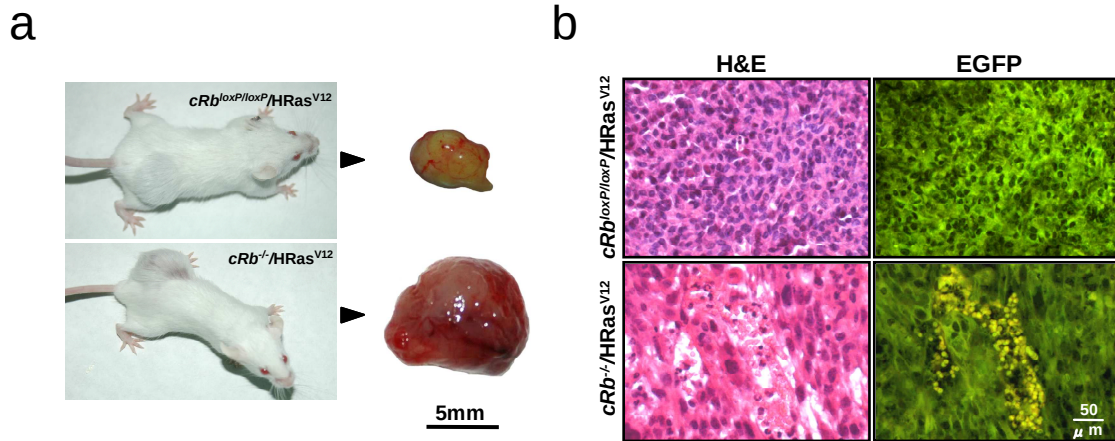


Figura 21. Transformación *in vivo*. **a**, Tumores originados en ratones SCID inyectados con astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-}/HRas^{V12}$ a la undécima y segunda semana respectivamente. Imagen del tumor tras la necropsia. **b**, H&E y fluorescencia de los tumores $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-}/HRas^{V12}$. La fluorescencia de EGFP muestra la contribución de los astrocitos en la formación de los tumores. La morfología de los tumores $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ (imagen superior izquierda), con células redondeadas con núcleos pequeños y de tamaño homogéneo, recuerda a la morfología de gliomas de bajo grado. Hay que destacar la falta de mitosis y de zonas necróticas. En contraste, los tumores $cRb^{-}/HRas^{V12}$ (panel inferior izquierdo) muestran una morfología similar a la de los gliomas de alto grado. Estos tumores presentan pleomorfismo celular, con células alargadas y fusiformes y núcleos muy irregulares que frecuentemente exhiben figuras mitóticas.

Como previamente hemos descrito, los astrocitos no muestran signos de OIS ni de apoptosis cuando son sometidos a un insulto oncogénico tan bien definido como la sobreexpresión de $HRas^{V12}$. Lejos de ello estas células aumentan su tasa de proliferación y presentaban un claro fenotipo de transformación celular, llegando a formar tumores *in vivo*. Fue por ello que quisimos comprobar el estado de estos sistemas de control encargados de inhibir la progresión tumoral en los astrocitos. En primer lugar, analizamos en nuestro modelo celular de glioblastoma si la expresión de Ras oncogénico incrementa los niveles de ROS intracelular al igual que ha sido descrito para otros tipos celulares. Mediante la sonda fluorescente DHE observamos el aumento de los niveles de ROS intracelular en los grupos experimentales $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-}/HRas^{V12}$. La fluorescencia es similar en ambos grupos. Sin embargo, los astrocitos control y aquellos que solo han perdido $Rb1$, presentan bajo niveles de ROS intracelular (**Figura 22**). Esto indica que la expresión $HRas^{V12}$ es capaz, de incrementar la producción de ROS intracelular y este incremento es independiente de la ratio de proliferación de los astrocitos y de la delección de $Rb1$.

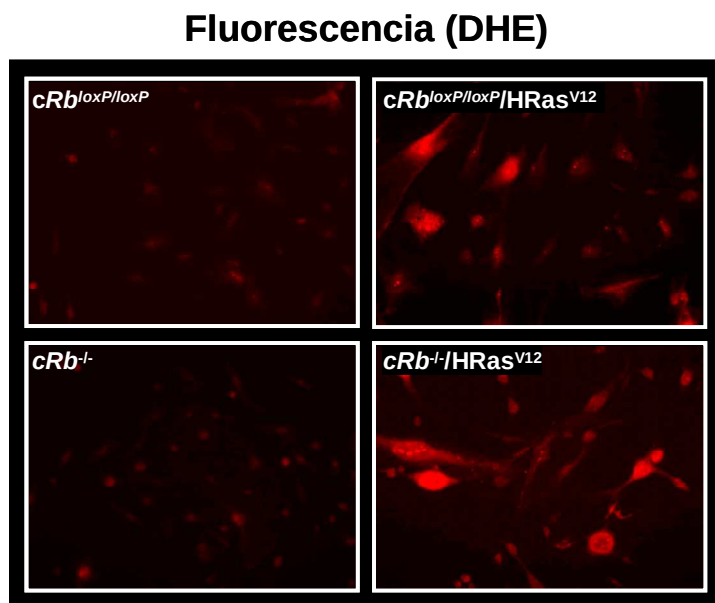


Figura 22. Detección de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) dependiente de la expresión de HRas^{V12}. Los cuatro grupos experimentales se incubaron con dihidroetidina (DHE) y el aumento de la producción de ROS se visualizó mediante un microscopio de fluorescencia. Imágenes representativas de los cuatro grupos experimentales.

En relación con estos datos y teniendo en cuenta que la producción de ROS intracelular está íntimamente relacionados con la inestabilidad cromosómica (Woo y Poon, 2004), nuestro siguiente paso ha sido comprobar el grado de inestabilidad genómica tras expresión de Ras oncogénico y la consiguiente acumulación de ROS en nuestras células. Los resultados obtenidos con extensiones de cromosomas en metafase muestran una importante inestabilidad genómica en los grupos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ (**Figura 23-24**).

Uno de los rasgos más destacables de la inestabilidad genómica de los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$, es la marcada aneuploidía que presentan estas células. Entre el 80 y 90% de los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ contienen el doble de la carga cromosómica presente en una célula normal (**Figura 23**).

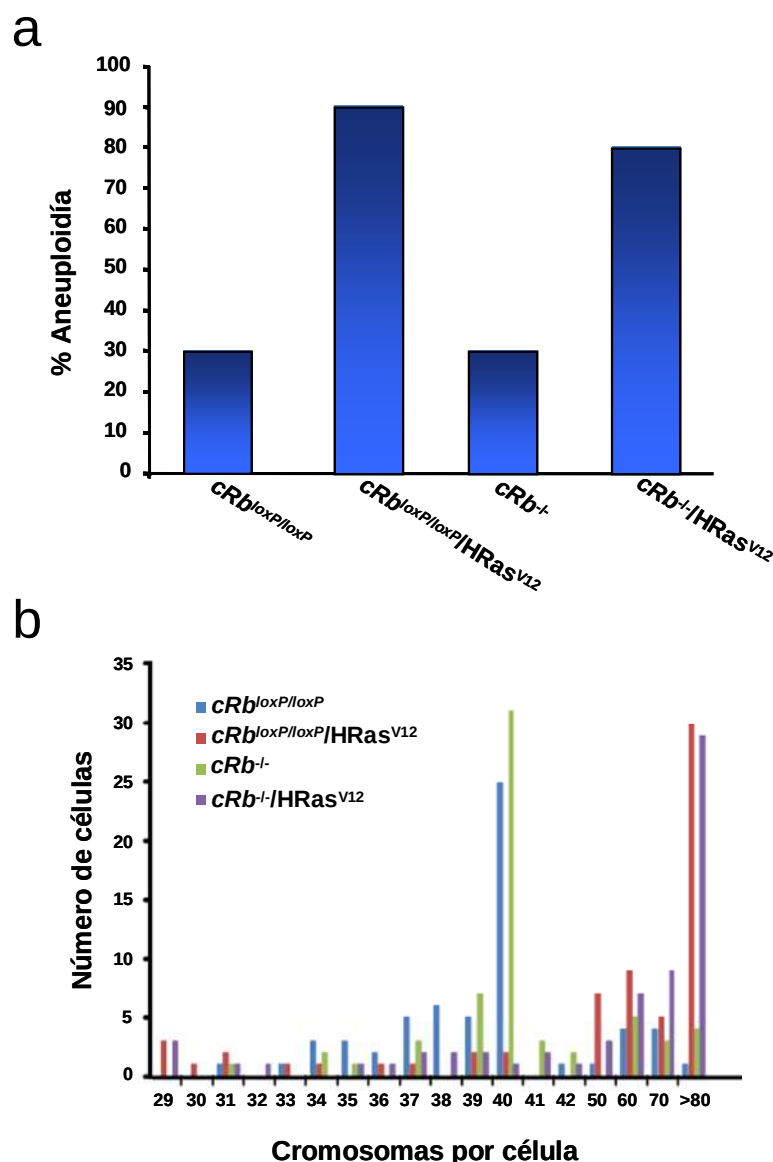


Figura 23. Inestabilidad cromosómica. **a**, Los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ presentan un mayor grado de aneuploidía que los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}$ y $cRb^{-/-}$. **b**, El número de cromosomas total de los cuatro grupos experimentales, $cRb^{loxP/loxP}$, $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$, $cRb^{-/-}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$, revela que los astrocitos que expresan Ras oncogénico ($cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$) presentan un contenido tetraploide.

Profundizando en el estudio de la inestabilidad cromosómica observamos que además de alteraciones cuantitativas, los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ presentan una gran cantidad de aberraciones estructurales en sus cromosomas. Dentro de estas, destaca la abundancia de inestabilidad centromérica, manifestada por aparición de numerosos fragmentos centroméricos, así como la presencia de fragmentos

acéntricos, rotura de cromátides, fusiones teloméricas, fusiones Robertsonianas de centrómeros y otros tipos de traslocaciones (**Figura 24**).

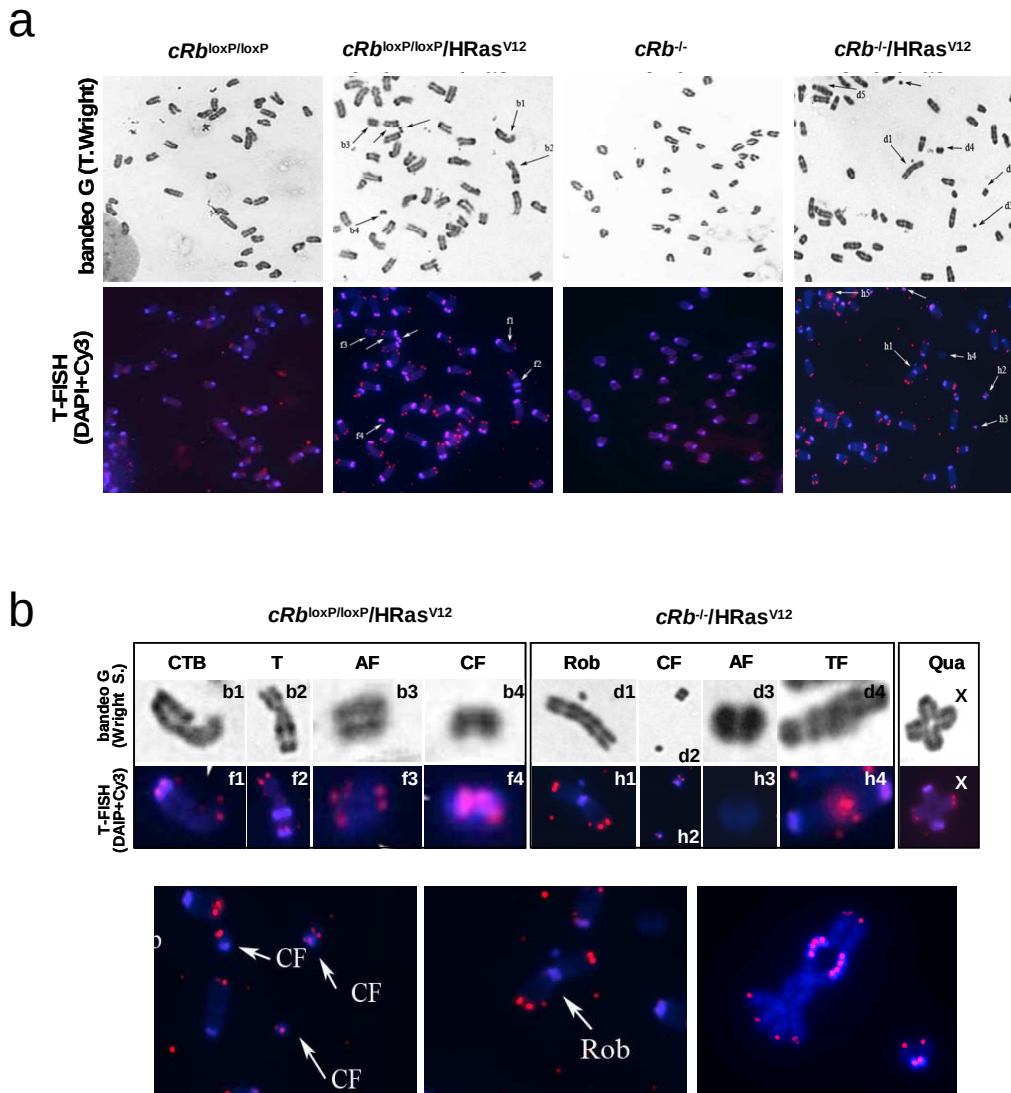


Figura 24. Tinción secuencial uniforme-bandas G (Wright S) y T-Fish de cromosomas en metafase. **a**, Extensiones de metafases representativas de los cuatro grupos experimentales, donde podemos apreciar el mayor número de cromosomas de los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ con respecto a los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}$ y $cRb^{-/-}$. **b**, Extensiones de metafases parciales de $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$ teñidas con Wright y T-Fish nos permite observar diferentes alteraciones estructurales como: fragmentos centroméricos (CF), fragmentos acéntricos (AF), rotura de cromátides (CTB), fusión telomérica (TF), fusiones Robertsonianas de centrómeros (Rob) y otros tipos de traslocaciones (T). La X indica un cromosoma cuadrivalente (Qua) encontrado en una célula $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$. El panel inferior nos muestra detalles de fragmentos cromosómicos (CF) y fusiones Robertsonianas de centrómeros (Rob) de extensiones de metafases de los astrocitos que expresan Ras oncogénico.

Por lo tanto, las anomalías cromosómicas detectadas en los astrocitos, tanto cualitativas como cuantitativas, muestran que la acción oncogénica de Ras es suficiente para inducir inestabilidad cromosómica en ausencia de otras señales, posiblemente como consecuencia de la acumulación de ROS y el estrés replicativo que sufren estas células. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-}/HRas^{V12}$ lo que implica que la ausencia de Rb no está desempeñando ningún papel sobre el grado de inestabilidad cromosómica ni sobre la acumulación de ROS.

En los últimos años la activación de DDR debido a estrés replicativo del ADN ha sido considerada como uno de los principales mecanismos desencadenantes de OIS. La presencia de DDR en estadios tempranos de la tumorigénesis así como la capacidad de $HRas^{V12}$ para inducir senescencia en fibroblastos humanos de forma dependiente de DDR (Gorgoulis *et al.*, 2005; Di Micco *et al.*, 2006; Bartkova *et al.*, 2006), han impulsado con fuerza esta teoría. Estas señales median la activación de diferentes *checkpoints* que tiene como fin la activación de las rutas supresoras de tumores $p16^{INK4a}/Rb$ y $p19^{ARF}/p53$ (Chen *et al.*, 2000; Bulavin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Braig *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005; Dolado *et al.*, 2007; Di Micco *et al.* 2006; Sun *et al.* 2007). Por lo tanto, y teniendo en cuenta que los astrocitos presentan alteraciones profundas en su ADN en ausencia de senescencia cuando sobreexpresaban $HRas^{V12}$, nos preguntamos si los *checkpoints* celulares dependientes de DDR se encuentran alterados en nuestro modelo celular.

En primer lugar nos centramos en comprobar los niveles de las proteínas que forman parte de las rutas de supresión tumoral $p16^{INK4a}/Rb$ y $p19^{ARF}/p53$ (**Figura 25**). En contra de lo que cabría esperar, los resultados obtenidos por *western blot* revelan que la sobreexpresión de $HRas^{V12}$ provoca un incremento sustancial de los niveles de las proteínas $p16^{INK4a}$, $p19^{ARF}$ y $p53$. Curiosamente, los niveles de estas proteínas también se encuentran elevados en los astrocitos cRb^{-} , aunque en menor medida. Además, parece existir una clara cooperación entre la sobreexpresión de $HRas^{V12}$ y la pérdida de Rb en la activación de estas dos rutas de supresión tumoral. De este modo, son los astrocitos $cRb^{-}/HRas^{V12}$ los que presentan un mayor incremento y una mayor activación de los diferentes componentes de las rutas $p16^{INK4a}/Rb$ y $p19^{ARF}/p53$ (**Figura 25**).

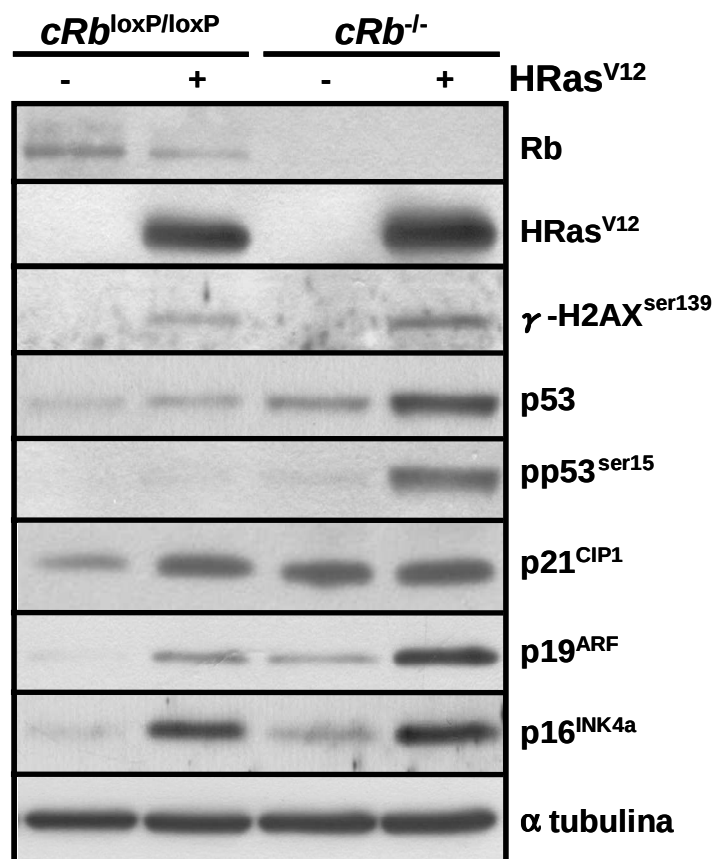


Figura 25. Los DDR son activados por HRas^{V12} y la pérdida de Rb en astrocitos. HRas^{V12} y la pérdida de Rb son capaces de inducir la expresión de marcadores de DDR como p16^{INK4}, p21^{CIP1} y p19^{ARF}, p53 y pp53^{ser15}. También se observa daño en el ADN indicado por γ-H2AX^{ser139}.

Como es sabido, la activación de DDR conlleva la activación de ATM y ATR lo cual provoca la activación de p53 por fosforilación en serina 15 y la fosforilación de H2AX en serina 139 (γ-H2AX^{ser139}). El análisis bioquímico de nuestras células muestra un aumento de los niveles de γ-H2AX en los astrocitos que expresan Ras oncogénico (*cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12} y *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}), indicando que los *checkpoints* de respuesta al daño en ADN se están activando correctamente. Además, los astrocitos *cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12} y *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} muestran niveles elevados de fosforilación en serina 15 del factor de transcripción p53, modificación asociada a la activación de DDR. También es evidente el aumento de los niveles de p21^{CIP1} (diana transcripcional de p53) íntimamente relacionada con OIS (**Figura 25**). Curiosamente, los astrocitos *cRb*^{-/-} también exhiben fosforilación de p53 capaz de aumentar los niveles de p21^{CIP1}. Sin

embrago, estas células no muestran niveles detectables de γ -H2AX (**Figura 25**). Por lo tanto, la pérdida de *Rb1* es capaz de activar la ruta de p53 independientemente de daño en el ADN. Este fenómeno parecía ser aditivo cuando se combinaban en las mismas células el estrés replicativo provocado por HRas^{V12} y la pérdida de *Rb1*.

Por lo tanto, los resultados obtenidos tras el análisis de las vías implicadas en los procesos de supresión tumoral revelan que los *checkpoints* celulares están respondiendo correctamente. Sin embargo, la activación de estos *checkpoints* no es capaz de inducir la parada del ciclo celular ni apoptosis en los astrocitos.

Por otra parte, diversos estudios han revelado la importancia de p107 en la compensación de la pérdida de *Rb1*, previniendo la transformación celular e induciendo OIS (Peeper *et al.*, 2001; Sage *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro modelo hemos observado que a pesar del acusado incremento de los niveles de la proteína p107 cuando se produce la pérdida de *Rb1*, estos niveles de p107 no impiden la transformación de los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} (**Figura 26**).

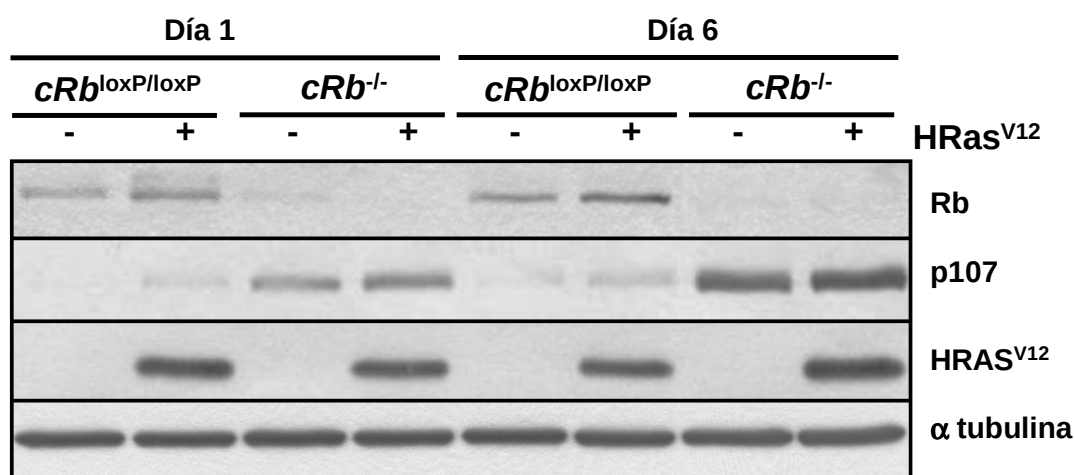


Figura 26. Análisis por *western blot* de los niveles de Rb y p107 en los astrocitos condicionales en el primer y sexto día tras la infección y selección con puromicina. Rb es prácticamente indetectable el primer día tras la selección. Los niveles de p107 se ven afectados de forma significativa por la pérdida de *Rb1*, siendo ya evidente el aumento de los niveles de p107 el primer día tras la selección.

Como ya hemos mencionado, la acumulación intracelular de ROS ha sido considerada en los últimos años como uno de los posibles causantes de la activación de la

senescencia inducida por oncogenes. Consistente con esta hipótesis, se ha demostrado que OIS puede ser inhibida cuando sometemos a las células a una atmósfera de bajos niveles de oxígeno (Lee *et al.*, 1999; Parrinello *et al.* 2003; MacLaren *et al.* 2004). Del mismo modo, la utilización de inhibidores de especies reactivas del oxígeno o la inactivación de genes implicados en la detección de ROS pueden impedir la inducción de senescencia (Lee *et al.* 1999; Wu *et al.* 2004).

Mientras que ROS junto con el estrés replicativo es capaz de inducir daño en el ADN e inestabilidad cromosómica aumentando OIS, estudios recientes ha demostrado que la acumulación de ROS puede inducir OIS o apoptosis mediante la activación de la ruta de p38MAPK. Como ya hemos mencionado en la introducción, la ruta de p38MAPK media múltiples procesos celulares, sin embargo aquí vamos a destacar su papel como regulador de la respuesta frente al estrés oxidativo y su capacidad para inducir OIS o apoptosis (Chen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Bulavin *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2007; Dolado *et al.*, 2007). De este modo, p38MAPK actúa como un sensor de ROS durante la iniciación de la tumorigénesis regulando negativamente la malignización celular inducida por Ras (Sun *et al.*, 2007; Dolado *et al.*, 2007). Por lo tanto, quisimos comprobar si la ruta de p38MAPK se encuentra activada en aquellos astrocitos que sobreexpresan HRas^{V12}.

Efectivamente, la sobreexpresión de HRas^{V12} es capaz de inducir la fosforilación y consiguiente activación de p38MAPK en los astrocitos (**Figura 27**), probablemente como consecuencia de los elevados niveles de ROS encontrados en estas células. Sorprendentemente, cuando la expresión de HRas^{V12} se combina con la pérdida de *Rb1* (astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}), los niveles de p38MAPK fosforilado disminuyen. Esta disminución en la fosforilación de p38MAPK no se correlaciona con los altos niveles de ROS observados en estas células. Por lo tanto, parece que la pérdida de *Rb1* está regulando negativamente la activación de p38MAPK de forma independiente de ROS (**Figura 27**).

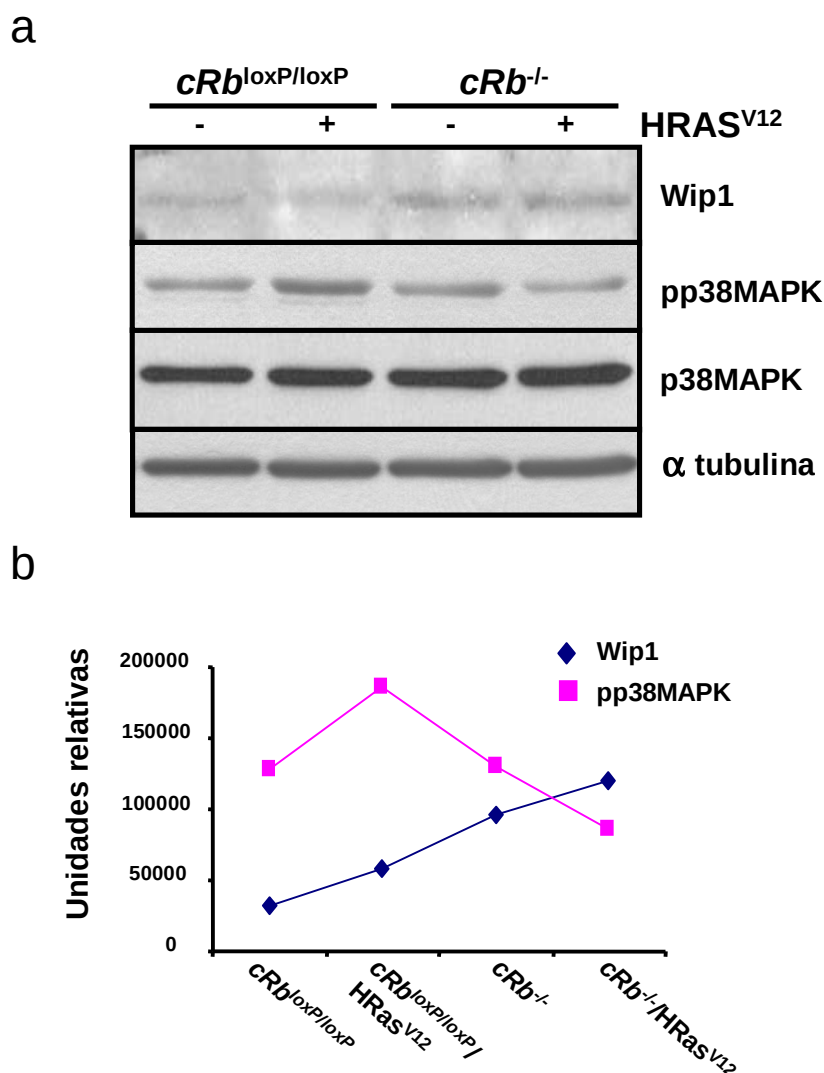


Figura 27. Wip1 es capaz de reducir los niveles de pp38MAPK en astrocitos *cRb*^{-/-}/HRAS^{V12}. **a**, El ensayo de *western blot* muestra un claro incremento de los niveles de p38MAPK fosforilada en los extractos de astrocitos *cRb*^{loxP/loxP}/HRAS^{V12}. En contraposición, los niveles de pp38MAPK disminuyen en los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRAS^{V12}. Esta disminución de la activación de p38MAPK es debido al aumento de los niveles de Wip1. **b**, Análisis densitométrico de los niveles de Wip1 y pp38MAPK realizado con el software Un-scan-it gelTM.

Con la intención de despejar esta incógnita, dirigimos nuestra atención hacia Wip1, una fosfatasa serina/treonina de tipo 2C de la familia PP2C. Esta familia de fosfatasas, altamente conservadas en eucariotas, se encuentra frecuentemente asociada con la regulación de respuesta a estrés celular (Fiscella *et al.*, 1997; Takekawa *et al.*, 2000). Numerosos trabajos publicados en los últimos años consideran a Wip1 como un posible oncogén, pudiendo colaborar con otros oncogenes en el proceso de transformación celular (Bulavin *et al.*, 2002). Recientemente se ha publicado que el factor de transcripción E2F-1 es capaz de inhibir la ruta de p38MAPK a través de la regulación

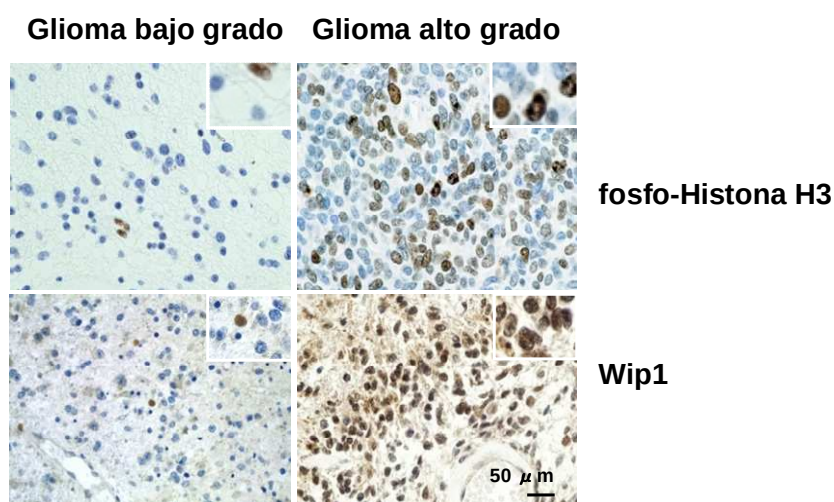
transcripcional de Wip1 (Hershko *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta estos antecedentes, comprobamos como se encuentra regulado Wip1 en nuestro modelo. Aquellos astrocitos que presentan la delección de *Rb1* (*cRb*^{-/-} y *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}) muestran un incremento de los niveles de Wip1 con respecto a los astrocitos con *Rb1* normal (**Figura 27**). De esta forma, el incremento de Wip1 dependiente de la pérdida de *Rb1* explica porque los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} presentan baja activación de p38MAPK en presencia de niveles elevados de ROS.

Una vez más, nuestros datos apuntan hacia una cooperación entre HRas^{V12} y la pérdida de *Rb1* en el proceso de transformación de astrocitos. Esta cooperación parece ser debida en parte al incremento de Wip1 y la consecuente inactivación de p38MAPK. De este modo la pérdida de *Rb1* en astrocitos que expresan Ras oncogénico confiere una doble ventaja a las células; por un lado *Rb1* incrementa la ratio de proliferación de los astrocitos y por otro es capaz de incrementar la expresión de Wip1, provocando la inactivación de p38MAPK y favoreciendo por lo tanto, el proceso de transformación celular. Este mecanismo explicaría la eficacia de los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} en la formación de tumores, la baja latencia y elevada agresividad de los mismos si se comparan con los tumores formados por los astrocitos *cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12}.

Con la intención de validar los resultados obtenidos, se comprobó el estatus de Wip1 en muestras de astrocitomas humanos de bajo y alto grado. Del mismo modo que ocurre en el modelo murino, los niveles de Wip1 están incrementados en los astrocitomas humanos con peor pronóstico, frente a los astrocitomas de grado bajo, los cuales presenta niveles de Wip1 menores o inexistentes (**Figura 28**). Teniendo en cuenta que la mayoría de los astrocitomas de alto grado presentan alteraciones en la ruta p16^{INK4a}/Rb, no es de extrañar la presencia de niveles de Wip1 elevados en este tipo de tumores. De este modo, al igual que ocurre con los astrocitos murinos, la regulación de Wip1 presenta una relación directamente proporcional al pronóstico de los tumores, siendo los niveles de Wip1 mayores en los gliomas de alto grado.

Como apoyo a nuestra hipótesis, hemos analizado los datos perteneciente a las bases de datos *Human Protein Atlas* (Berglund *et al.*, 2008) y TCGA (*Cancer Genome Atlas Research Network*, 2008). El proyecto TCGA, ha utilizado el GBM como paradigma

con el objetivo de comprender las bases moleculares del cáncer a través del análisis genómico y de expresión génica a gran escala. El análisis de los datos de expresión presente en el *Human Protein Atlas* revela una clara correlación entre la expresión de Wip1 y Ciclina A (un marcador de la actividad transcripcional de E2F-1) tanto en líneas celulares de gliomas como en muestras de tumores humanos. Además, la expresión de Wip1 en los gliomas de alto grado presenta correlación con el marcador de proliferación Ki67. A su vez, los resultados extraídos de TCGA nos muestran también una fuerte correlación entre la expresión de Wip1 y la presencia de GBM. Por lo tanto, los datos proporcionados por ambas bases de datos (TCGA y *Human Protein Atlas*), refuerzan nuestros resultados. De esta forma se establece una alta correlación entre el incremento de la expresión de Wip1 y el grado de los gliomas.



Glioma	Wip1			Nº Casos
	-	+	++	
Bajo Grado	5	5	0	10
Alto Grado	1	7	2	10

Figura 28. Análisis de la expresión de Wip1 en muestras clínicas de gliomas. Imágenes representativas de las inmunohistoquímica para Wip1 y fosfo-Histona H3. La tabla muestra los valores obtenidos en el análisis de veinte muestras de gliomas humanos de alto y bajo grado. La inmunoreactividad de Wip1 fue asignada según el siguiente criterio: -, <10% de las células presentaban inmunoreactividad; +, 11-29% de las células presentaban inmunoreactividad; ++, 30% de las células presentaban inmunoreactividad. El anticuerpo anti-fosfo-histona H3 fue utilizado como marcador de proliferación.

Para confirmar una vez más que Wip1 es realmente uno de los elementos clave en la cooperación entre HRas^{V12} y la pérdida de *Rb1* en el proceso de transformación, se trataron los astrocitos con los inhibidores químicos de la actividad fosfatasa de Wip1: CCT007093 (Rayter *et al.*, 2008) o trióxido de arsénico (Yoda *et al.*, 2008). Tanto el inhibidor CCT007093, como el trióxido de arsénico (ATO) son capaces de impedir la defosforilación de p38MAPK dependiente de Wip1, especialmente en el grupo *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} (Figura 29).

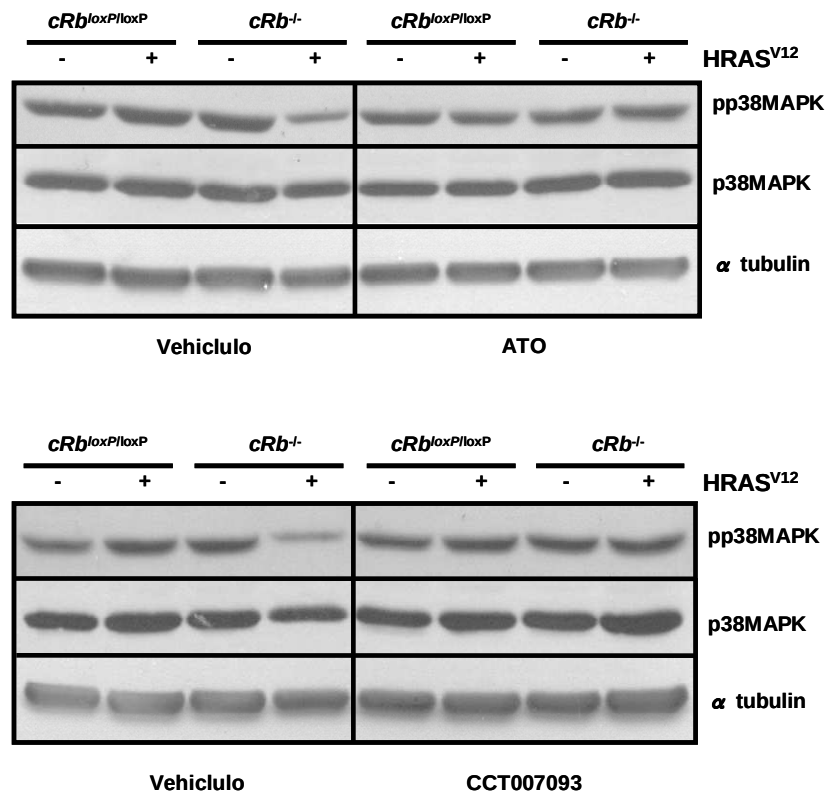


Figura 29. Efecto de los inhibidores químicos ATO y CCT007093 sobre la actividad fosfatasa de Wip1. El western blot muestra los niveles de pp38MAPK como lectura de la inhibición de la actividad fosfatasa de Wip1. Los astrocitos fueron tratados durante 8h con ATO o CCT007093. Los niveles de p38MAPK y α tubulina fueron utilizados como controles de los niveles de proteína.

Fenotípicamente los astrocitos tratados con los inhibidores muestran un drástico descenso en su ratio de proliferación, principalmente en los grupos experimentales *cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12} y *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} que presentan mayor proliferación en ausencia de los inhibidores (Figura 30).

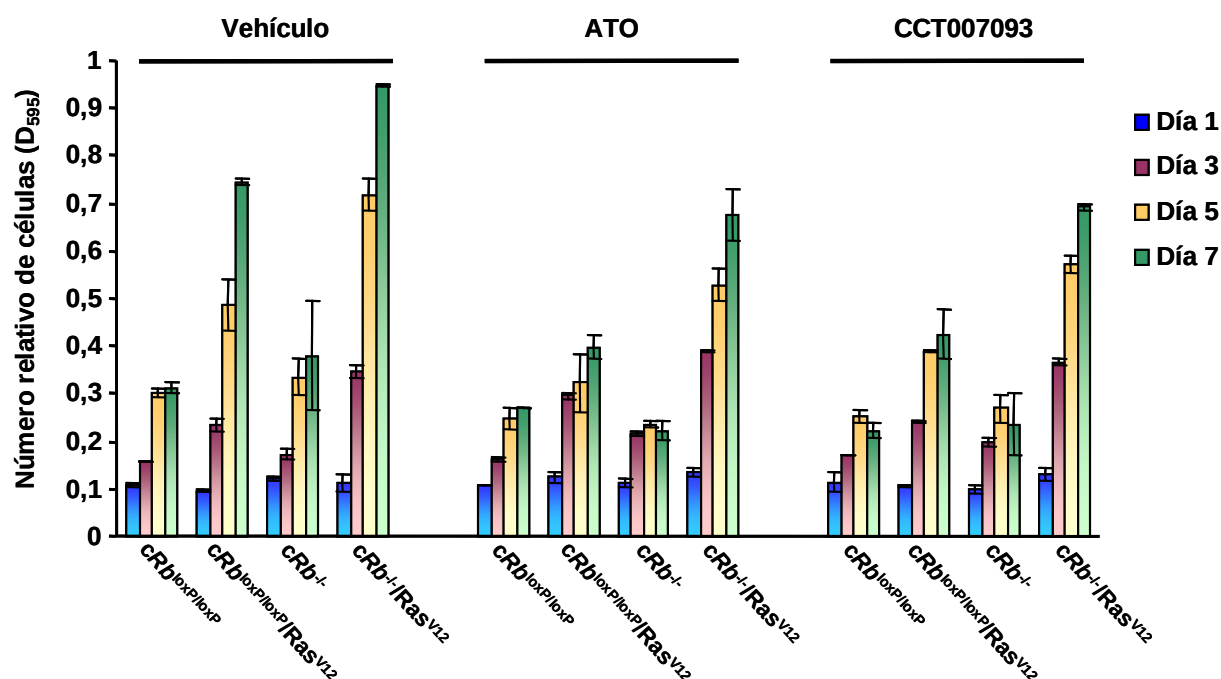


Figura 30. Los astrocitos disminuyen su ratio de proliferación cuando son tratados con inhibidores de la actividad fosfatasa de Wip1. El tratamiento con los inhibidores ATO y CCT007093 fue suministrado el segundo día de cultivo. Se aprecia una clara disminución en la ratio de proliferación de los astrocitos entre el quinto y séptimo día de cultivo, principalmente en los grupos experimentales *cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}* y *cRb^{-/-}/HRas^{V12}*. Cada punto representa la media $\pm$ DE de tres replicados.

El descenso en la proliferación de los astrocitos es debido a un incremento significativo de la senescencia cuando Wip1 es inhibido (**Figura 31**). De esta forma se confirmaban los resultados observados en MEFs *Ppm1d^{-/-}*, los cuales mostraban una tasa de proliferación reducida con rasgos de senescencia prematura (Bulavin *et al.*, 2002) y se destaca la importancia de esta fosfatasa en el control procesos oncogénicos.

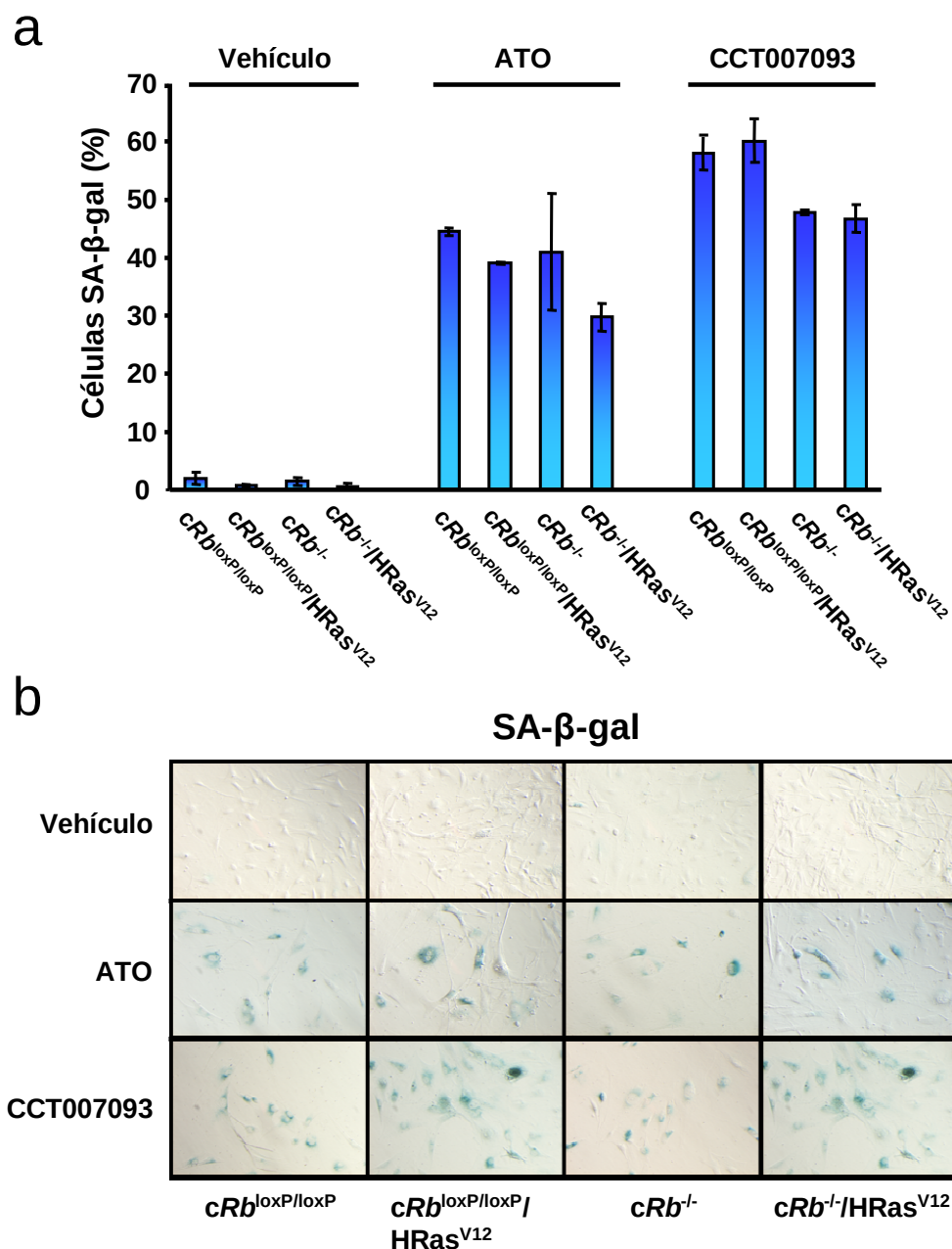


Figura 31. Ensayo de actividad SA-β-galactosidasa. Los astrocitos muestran elevados niveles de senescencia cuando son tratados con los inhibidores de la actividad fosfatasa de Wip1: ATO y CCT007093. **a**, Cuantificación del porcentaje de células con actividad SA-β-gal. **b**, Imágenes representativas de los diferentes grupos experimentales: vehículo, tratados con ATO y tratados con CCT007093.

DISCUSIÓN

Discusión

Desde que en 1997 Serrano y colaboradores describiesen que la activación de Ras en células *wild-type* inducía parada del ciclo celular, se ha debatido mucho sobre el papel de la senescencia inducida por oncogénesis (OIS) como mecanismo de supresión tumoral. Diferentes estudios han demostrado que la OIS no es un artefacto resultado de la sobre expresión de Ras oncogénico. Así por ejemplo, Collado en 2005 observó que los adenomas de ratones con un solo alelo activado de KRas sufrían OIS. Al igual que Collado otros autores han demostrado que la OIS es un proceso que ocurre *in vivo* tanto en modelos de tumores animales como en tumores humanos (Braig *et al.* 2005; Chen *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005; Courtois-Cox *et al.*, 2006). Estos datos sostienen la idea de que la OIS funciona como un mecanismo de supresión tumoral previniendo la progresión de lesiones benignas en la ausencia de mutaciones cooperadoras adicionales.

Se han realizado importantes avances en el conocimiento de los mecanismos que regulan esta respuesta. El daño en el ADN, el estrés replicativo, la acumulación de especies reactivas de oxígeno o la activación de determinadas rutas de señalización, han sido propuestas como elementos capaces de promover la activación de OIS. De este modo, parece que la senescencia no es un mecanismo activado por una serie lineal de eventos, sino que está regulado por una compleja red de señales.

Teniendo en cuenta toda esta información quisimos comprobar si las rutas de activación de OIS se encuentran activadas en nuestro modelo de glioblastoma. Un modelo que, en contra de lo que cabría esperar, se caracteriza por no mostrar signos de senescencia cuando es sometido a diversos estímulos oncogénicos.

Como ya hemos mencionado, la acción oncogénica de Ras induce el arresto celular o senescencia, tanto en células humanas como murinas, cuya principal característica es la acumulación de p53, así como el incremento de inhibidores de ciclo celular como p16^{INK4a} y p21^{CIP1} (Serrano *et al.*, 1997). Curiosamente, en nuestro modelo los astrocitos que expresa Ras oncogénico (*cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12} y *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}) muestran activación de estas rutas de supresión tumoral, presentado un claro incremento de los inhibidores

de ciclo celular p16^{INK4a} y p21^{CIP1}, de los niveles de p19^{ARF} y de p53. Sin embargo, la activación de estas vías no parece desencadenar ningún efecto como supresores de tumores en los astrocitos.

Una de las posibles explicaciones a la ausencia de OIS en los astrocitos la podemos encontrar en papel que juega p16^{INK4a} en la inducción de senescencia. Existen numerosos trabajos en los que se describe la relevancia los niveles p16^{INK4a} para determinar la respuesta de las células frente a OIS o senescencia replicativa (Serrano *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 1997; Collado *et al.*, 2005; Takahashi *et al.* 2006). Aparentemente, aquellas células que presentan niveles bajos o carentes de p16^{INK4a}, como fibroblastos humanos primarios (HFFs) o las células BJ, muestran resistencia a entrar en senescencia cuando son sometidos a la acción de ciertos eventos oncogénicos como puede ser Ras activado. Sin embargo, las líneas celulares IMR90 y WI-38, que sí presentan niveles elevados de p16^{INK4a}, son susceptibles de sufrir OIS (Beauséjour *et al.*, 2003; Benanti *et al.*, 2004). De forma similar a lo que ocurre en HFFs, los astrocitos primarios presentan unos niveles de p16^{INK4a} casi inapreciables en condiciones basales, aunque estos se incrementen de forma significativa en presencia de HRas^{V12}. De todas formas, aunque los niveles de p16^{INK4a} en los astrocitos puedan ser una de las causas del comportamiento de estas células frente a estímulos oncogénicos, no queda claro si la ausencia de senescencia en este tipo celular sea solo debida a esta característica, no pudiendo descartar la existencia de otros factores que puedan contribuir a definir el comportamiento de los astrocitos cuando son sometidos a ciertos eventos oncogénicos.

Siguiendo con el análisis del comportamiento de los astrocitos frente a diferentes eventos oncogénicos, nos han llamado la atención diversos trabajos en los que se establece un requerimiento de la proteína Rb en el proceso de transformación mediado por Ras oncogénico (Peeper *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006). De hecho, la activación de Ras dependiente de factores de crecimiento es necesaria para la activación de CDK de la fase G₁, fosforilación de Rb, activación de E2F y entrada en fase S. Está ampliamente documentado que alteraciones como la pérdida de p16^{INK4a} (Mitchell *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1996;) o la sobreexpresión de Ciclina D1 (Robles *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2001), las cuales provocan la inhibición de Rb, colaboran con Ras oncogénico en el proceso de transformación. Paradójicamente, la mayoría de

los tumores que presentan mutaciones de Ras mantienen la expresión de *Rb1*. Este fenómeno es explicado por el hecho de que la transformación inducida por Ras sorprendentemente depende de la proteína Rb funcional (Williams *et al.*, 2006). Williams propone que mientras mutaciones que alteran la ruta de Rb, como es el caso de la pérdida de p16^{INK4a}, favorecen la transformación celular, la mutación directa del gen *Rb1* impide la transformación inducida por Ras, motivo por el cual rara vez coinciden ambas mutaciones en tumores humanos.

Williams propone una explicación mecanística para entender el porqué de la necesidad de Rb funcional en el proceso de transformación inducido por Ras. La proteína Rb, presumiblemente en conjunción con E2F, limita la transcripción de p107. Sin embargo, en ausencia de Rb, el aumento de los niveles de p107 pueden compensar la pérdida de Rb inhibiendo la proliferación, así como la transformación inducida por el oncogén Ras (Williams *et al.*, 2006; Sage *et al.*, 2003). Este mecanismo de compensación también se ha mostrado en otros estudios donde se indica que los miembros de la familia p130 y fundamentalmente p107 son capaces de compensar la delección de *Rb1* ayudando a establecer y mantener la quiescencia y senescencia celular (Sage *et al.*, 2003).

Una vez más, los astrocitos parecen comportarse de forma muy diferente a otros tipos celulares. Al igual que los experimentos de Williams, nuestros resultados revelan un incremento destacable de los niveles de p107 en los astrocitos cuando *Rb1* es delecionado, tratando de compensar su pérdida. Sin embargo, los niveles elevados de p107 no tienen ningún efecto en los astrocitos. De este modo, los astrocitos *cRb*^{-/-}/*HRas*^{V12} son capaces de transformarse a pesar de los altos niveles de p107 que presentan. Este hecho indica que Ras no está directamente ligado a Rb para inducir la transición a las fases G₁/S, como postulaban ciertos autores (Peepers *et al.*, 1997, Mittnacht *et al.* 1997). Por lo tanto deben de existir vías capaces de transmitir las señales mitogénicas provenientes de Ras de forma paralela e independientes a Rb.

Poco a poco, los resultados obtenidos con los astrocitos nos muestran las diferencias que presentan estas células con respecto a otros linajes celulares. Siguiendo con el análisis de nuestros resultados, tenemos que hacer hincapié en el papel del daño en el ADN como mediador de la senescencia inducida por oncogénesis. Bien sea por estrés

replicativo (Bartkova *et al.*, 2006; Di Micco *et al.*, 2006) o por acumulación de especies reactivas del oxígeno (Chen *et al.*, 2000; Bulavin *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2007), la acumulación de daño en el ADN parece estar íntimamente ligada a este tipo de respuesta antitumoral. De este modo, la activación de la respuesta a daño en el ADN o DDR es uno de los principales desencadenantes de la activación de OIS (Di Micco *et al.*, 2006).

En nuestro modelo se confirma la presencia de daño en el ADN y acumulación de ROS en los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/Ras^{V12}$ y los $cRb^{-/-}/Ras^{V12}$. Ambos grupos experimentales muestran niveles similares de ROS intracelular y una elevada inestabilidad cromosómica. En consecuencia, y teniendo en cuenta que los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/Ras^{V12}$ y los $cRb^{-/-}/Ras^{V12}$ no presentan signos de senescencia y proliferaban activamente, cabría esperar que los *checkpoints* de DDR no se encontrasen activos en estas células. Sorprendentemente, los *checkpoints* de DDR están funcionando correctamente, como revela la fuerte fosforilación de p53 y los niveles elevados de p16^{INK4a}, p19^{ARF} y p21^{CIP1}, asociados a la activación del DDR (Collado *et al.*, 2005; Di Micco *et al.*, 2006). Curiosamente, el incremento de los niveles de estas proteínas y de la fosforilación de p53 son mayores en los astrocitos $cRb^{-/-}/Ras^{V12}$. Estas diferencias podrían ser explicadas por el hecho de que la inactivación de *Rb1* sea capaz de activar los mecanismos de DDR independientemente del daño en el ADN. Recientemente se ha observado que los gliomas muestran radioresistencia debida a una activación preferencial de DDR contribuyendo a la supervivencia de estas células (Bao *et al.*, 2006). De hecho, se ha descrito una conexión entre E2F1 y la respuesta a daño en el ADN. La desregulación de la ruta Rb-E2F1 causada por la pérdida de Rb puede activar DDR a través de la fosforilación de ATM-CHK2 (Powers *et al.*, 2004) y la activación de esta respuesta no requiere lesiones en el ADN (Soutoglou y Misteli, 2008; Toledo *et al.* 2008). Además, la pérdida de Rb es capaz de alterar la regulación de los *checkpoints* celulares, permitiendo la propagación de mutaciones deletéreas producidas durante el proceso de hiperreplicación, promoviendo la progresión del tumor (Powers *et al.*, 2004; Toledo *et al.* 2008).

Por otra parte, es conocido que la expresión de Ras oncogénico está asociada al incremento de las especies reactivas del oxígeno (Irani *et al.*, 1997) como resultado del

estrés replicativo. ROS ha sido considerado tradicionalmente como un producto tóxico del metabolismo celular, y ha sido relacionado con señales oncogénicas en transformación celular y cáncer. El incremento de los niveles intracelulares de ROS han sido descritos como mediador de diversos efectos biológicos de HRas^{V12}, tales como: activación de senescencia y apoptosis, daño en el ADN (Chen *et al.*, 2000; Bulavin *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2007), inestabilidad genómica (Woo y Poon, 2004) y transformación (Mitsushita *et al.*, 2004). La vía de p38MAPK actúa como un sensor del estrés oxidativo durante la iniciación de la tumorigénesis regulando negativamente la transformación celular inducida por el oncogén Ras, bloqueando la proliferación o promoviendo la apoptosis (Chen *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Dolado *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007).

Cuando comprobamos el estado de esta vía supresora de tumores en los astrocitos, observamos que los astrocitos *cRb*^{loxP/loxP}/HRas^{V12} muestran altas concentraciones de ROS intracelular. Sin embargo, los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}, de forma contraria a lo esperado, presentan niveles de fosforilación de p38MAPK similares a los hallados en las células control. Recientemente se ha demostrado que la deficiencia de p38MAPK en fibroblastos inmortalizados supone una ventaja para sufrir transformación celular cuando son sometidos a la acción oncogénica de HRas^{V12} (Dolado *et al.*, 2007). Por lo tanto, los bajos niveles de p38MAPK fosforilado presentes en los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} parece ser una de las causas de que estas células se comporten como *knockouts* o *knockdowns* de p38MAPK, facilitando el proceso tumoral. La razón de este comportamiento radica en los elevados niveles de Wip1 encontrados en los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12}. Como ya hemos mencionado en la introducción, Wip1 es la fosfatasa encargada de la inactivación de p38MAPK y la inhibición de dicha fosfatasa está relacionada con la inhibición de la tumorigénesis (Bulavin *et al.*, 2004). Dado que Wip1 es una diana transcripcional de E2F1 (Heshko *et al.*, 2006), nuestros datos apuntan a que la pérdida de *Rb1* favorece la activación de E2F1 aumentando la posibilidad de que E2F1 induzca la expresión de Wip1. Este mecanismo explicaría, al menos en parte, el porqué los astrocitos *cRb*^{-/-}/HRas^{V12} son capaces de transformarse de forma tan evidente pudiendo inducir la formación de tumores con una latencia muy baja.

La validación de nuestros resultados en muestras de tumores humanos, confirma la relevancia de Wip1 en el proceso de transformación en glioblastomas humanos. Mientras que en muestras de astrocitos de grado bajo los niveles de la fosfatasa es inapreciables, un alto porcentaje de los astrocitos de grado III y GBM mostraban altos niveles de esta fosfatasa. Además, el análisis de los datos extraídos de la base de datos *Human Protein Atlas* (Berglund *et al.*, 2008) y TCGA (*Cancer Genome Atlas Research Network*, 2008) confirman nuestra hipótesis, estableciendo una alta correlación entre la expresión de Wip1 y los GBMs.

Los resultados obtenidos con los inhibidores químicos de Wip1, no hicieron más que reforzar nuestras conclusiones. El tratamiento de los astrocitos con los inhibidores CCT007093 o ATO provoca un descenso significativo en el ratio de proliferación de los astrocitos $cRb^{loxP/loxP}/HRas^{V12}$ y $cRb^{-/-}/HRas^{V12}$. Este descenso de la proliferación viene determinado por la entrada en senescencia de los astrocitos tratados con los inhibidores, al contrario de los que ocurre en el caso de aquellos astrocitos tratados con vehículo, donde Wip1 no está afectado. Todo ello remarca el papel de la fosfatasa Wip1 en el control del proceso tumoral y la señala como una posible diana terapéutica en el tratamiento del cáncer, como ya han propuesto otros autores en otros tipos tumorales (Yamaguchi *et al.*, 2006; Yoda *et al.*, 2008).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la expresión de $HRas^{V12}$ en los astrocitos provoca un incremento de la proliferación celular en ausencia de senescencia, facilitando su transformación a células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta observación no ha sido establecida para otros linajes celulares, donde OIS bloquea la progresión tumoral (Serrano *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). En adición, la activación de DDR observada en estas células plantea ciertas cuestiones acerca el tipo de relación existente entre DDR y OIS. Aunque, ha sido descrito que OIS es consecuencia de la activación del DDR, nuestros resultados confirman que esta relación no se cumple en el caso de los astrocitos.

Además, los resultados obtenidos muestran la importancia de la ruta de Rb en la progresión de los glioblastomas. La pérdida de Rb parece conferir a los astrocitos que expresan $HRas^{V12}$ ciertas ventajas que facilitan el proceso de transformación. En primer

lugar, la ausencia de Rb es capaz de aumentar el rango de proliferación de los astrocitos cooperando con el aumento de proliferación inducido por Ras. En segundo lugar, en un contexto *knockout* de *Rb1* los astrocitos son capaces de activar los *checkpoints* de daño en el ADN contribuyendo a la optimización de la reparación del mismo y aumentando la supervivencia de estas células. Por otra parte, la pérdida de Rb provoca el incremento de los niveles de Wip1 lo que conlleva la inactivación de la quinasa supresora de tumores p38MAPK favoreciendo así el proceso de transformación de los astrocitos.

En definitiva, este estudio pretende arrojar luz sobre los mecanismos que se encuentran detrás de la progresión de los astrocitomas. La identificación de Wip1 como un importante mediador de la malignización de estos tipos de tumores, implica una aproximación terapéutica presentando a Wip1 como posible diana farmacológica en el tratamiento de pacientes con GBM o astrocitomas de grado alto.

Como conclusión, quisiera destacar que de entre los numerosos genes implicados en control de los procesos oncogénicos, los mecanismos de respuesta ante un evento oncogénico no son independientes, pudiendo cooperar varios de ellos en la iniciación o mantenimiento de la respuesta senescente en determinados tipos celulares o tejido. En el caso de los astrocitos parece que los requerimientos necesarios para la inducción de la senescencia son distintos de los que presentan otros tipos celulares como los fibroblastos. Esto nos indica que las diferencias biológicas intrínsecas entre diferentes tipos celulares deben ser tomadas en cuenta a la hora de extrapolar nuestros resultados *in vitro* a un determinado tipo de tumor. Por lo tanto es de gran importancia la elección de un modelo celular adecuado en función del tipo de tumor que se quiera analizar.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR) mediada por un evento oncogénico no implica la inducción de senescencia (OIS) o apoptosis.
2. La pérdida del supresor de tumores Retinoblastoma modula la respuesta al estrés oncogénico favoreciendo la transformación celular.
3. La proteína Wipl podría ser utilizada como marcador diagnóstico y diana terapéutica en gliomas de alto grado.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

1. Ahmadian MR, Stege P, Scheffzek K, Wittinghofer A. (1997) Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of ras. *Nat Struct Biol* 4(9): 686-689.
2. Allen RG, Tresini M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28(3): 463-499.
3. Armitage P, Doll R. (1954) The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer* 8(1): 1-12.
4. Barbacid M. (1987) Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.
5. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, et al. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434(7035): 864-870.
6. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444(7119): 633-637.
7. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, et al. (2003) Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22(16): 4212-4222.
8. Benanti JA, Galloway DA. (2004) Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *Mol Cell Biol* 24(7): 2842-2852.
9. Berglund L, Bjorling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, et al. (2008) A gene-centric human protein atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics* 7(10): 2019-2027.
10. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. (1990) The GTPase superfamily: A conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348(6297): 125-132.
11. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, et al. (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436(7051): 660-665.
12. Brandeis M, Rosewell I, Carrington M, Crompton T, Jacobs MA, et al. (1998) Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(8): 4344-4349.

13. Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, et al. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391(6667): 597-601.
14. Brown JM, Attardi LD. (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5(3): 231-237.
15. Cancer Genome Atlas Research Network. (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216): 1061-1068.
16. Cartwright P, Muller H, Wagener C, Holm K, Helin K. (1998) E2F-6: A novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene* 17(5): 611-623.
17. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, et al. (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436(7051): 725-730.
18. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, et al. (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 18(6): 1571-1583.
19. Ciemerych MA, Sicinski P. (2005) Cell cycle in mouse development. *Oncogene* 24(17): 2877-2898.
20. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, et al. (2005) Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* 436(7051): 642.
21. Courtois-Cox S, Genther Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, et al. (2006) A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 10(6): 459-472.
22. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426(6963): 194-198.
23. Dalla-Favera R, Gelmann EP, Gallo RC, Wong-Staal F. (1981) A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus. *Nature* 292(5818): 31-35.
24. Debbas M, White E. (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 7(4): 546-554.

25. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. (1982) Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of harvey and kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(11): 3637-3640.
26. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, et al. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444(7119): 638-642.
27. Ding H, Roncari L, Shannon P, Wu X, Lau N, et al. (2001) Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res* 61(9): 3826-3836.
28. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, et al. (2007) p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* 11(2): 191-205.
29. Donovan S, Shannon KM, Bollag G. (2002) GTPase activating proteins: Critical regulators of intracellular signaling. *Biochim Biophys Acta* 1602(1): 23-45.
30. Downward J. (1997) Cell cycle: Routine role for ras. *Curr Biol* 7(4): R258-60.
31. Downward J. (1996) Control of ras activation. *Cancer Surv* 27: 87-100.
32. Downward J, Parker P, Waterfield MD. (1984) Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 311(5985): 483-485.
33. Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, et al. (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307(5951): 521-527.
34. Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. (1998) Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 17(25): 3207-3213.
35. Duesberg PH, Canaani E. (1970) Complementarity between rous sarcoma virus (RSV) RNA and the in vitro-synthesized DNA of the virus-associated DNA polymerase. *Virology* 42(3): 783-788.
36. Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M. (1989) Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(22): 8763-8767.
37. Ewen ME, Xing YG, Lawrence JB, Livingston DM. (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66(6): 1155-1164.

38. Fanton CP, McMahon M, Pieper RO. (2001) Dual growth arrest pathways in astrocytes and astrocytic tumors in response to raf-1 activation. *J Biol Chem* 276(22): 18871-18877.
39. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57(7): 1083-1093.
40. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, et al. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323(6089): 643-646.
41. Gaubatz S, Wood JG, Livingston DM. (1998) Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16): 9190-9195.
42. Gazit A, Igarashi H, Chiu IM, Srinivasan A, Yaniv A, et al. (1984) Expression of the normal human sis/PDGF-2 coding sequence induces cellular transformation. *Cell* 39(1): 89-97.
43. Grana X, Garriga J, Mayol X. (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 17(25): 3365-3383.
44. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, et al. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400(6743): 464-468.
45. Hannon GJ, Demetrick D, Beach D. (1993) Isolation of the rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev* 7(12A): 2378-2391.
46. Harper JW, Elledge SJ. (2007) The DNA damage response: Ten years after. *Mol Cell* 28(5): 739-745.
47. Hayflick L, Moorhead PS. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
48. He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, et al. (1994) CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 54(22): 5804-5807.
49. He J, Olson JJ, James CD. (1995) Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer Res* 55(21): 4833-4836.

50. Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 14(4): 501-513.
51. Hermeking H, Eick D. (1994) Mediation of c-myc-induced apoptosis by p53. *Science* 265(5181): 2091-2093.
52. Hirasawa A, Saito-Ohara F, Inoue J, Aoki D, Susumu N, et al. (2003) Association of 17q21-q24 gain in ovarian clear cell adenocarcinomas with poor prognosis and identification of PPM1D and APPBP2 as likely amplification targets. *Clin Cancer Res* 9(6): 1995-2004.
53. Holland EC. (2001) Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2(2): 120-129.
54. Honda R, Yasuda H. (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* 18(1): 22-27.
55. Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, et al. (2007) p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-jun pathway. *Nat Genet* 39(6): 741-749.
56. Hwang HC, Clurman BE. (2005) Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 24(17): 2776-2786.
57. Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP. (1996) Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13(5): 1065-1072.
58. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, et al. (1992) Effects of an rb mutation in the mouse. *Nature* 359(6393): 295-300.
59. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, et al. (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54(24): 6353-6358.
60. Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4): 820-823.
61. Kwon CH, Zhao D, Chen J, Alcantara S, Li Y, et al. (2008) Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. *Cancer Res* 68(9): 3286-3294.
62. Land H, Parada LF, Weinberg RA. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304(5927): 596-602.

63. Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. (1994) Pathways leading to glioblastoma multiforme: A molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 81(3): 427-436.
64. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271(34): 20608-20616.
65. Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, et al. (1999) Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274(12): 7936-7940.
66. Li SP, Junttila MR, Han J, Kahari VM, Westermarck J. (2003) p38 mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2. *Cancer Res* 63(13): 3473-3477.
67. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, et al. (1985) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 313(5998): 144-147.
68. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, et al. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 12(19): 3008-3019.
69. Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, Davies R, Venkitaraman AR. (2003) Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* 17(24): 3017-3022.
70. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.
71. Lowe SW, Ruley HE. (1993) Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* 7(4): 535-545.
72. Lu X, Ma O, Nguyen TA, Jones SN, Oren M, et al. (2007) The Wip1 phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell* 12(4): 342-354.
73. Luo RX, Postigo AA, Dean DC. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92(4): 463-473.
74. MacKenzie KL, Franco S, Naiyer AJ, May C, Sadelain M, et al. (2002) Multiple stages of malignant transformation of human endothelial cells modelled by co-

- expression of telomerase reverse transcriptase, SV40 T antigen and oncogenic N-ras. *Oncogene* 21(27): 4200-4211.
75. Malliri A, ten Klooster JP, Olivio C, Collard JG. (2002) Determination of the activity of rho-like GTPases in cells. *Methods Mol Biol* 189: 99-109.
76. Malumbres M, Barbacid M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30(11): 630-641.
77. Malumbres M, Pellicer A. (1998) RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3: d887-912.
78. Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, et al. (2004) Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118(4): 493-504.
79. Manke IA, Nguyen A, Lim D, Stewart MQ, Elia AE, et al. (2005) MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* 17(1): 37-48.
80. Marino S, Vooijs M, van Der Gulden H, Jonkers J, Berns A. (2000) Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev* 14(8): 994-1004.
81. Marx J. (1994) How cells cycle toward cancer. *Science* 263(5145): 319-321.
82. Mayol X, Grana X, Baldi A, Sang N, Hu Q, et al. (1993) Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 8(9): 2561-2566.
83. Merlino GT, Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Semba K, et al. (1984) Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science* 224(4647): 417-419.
84. Mitchell PJ, Perez-Nadales E, Malcolm DS, Lloyd AC. (2003) Dissecting the contribution of p16(INK4A) and the rb family to the ras transformed phenotype. *Mol Cell Biol* 23(7): 2530-2542.
85. Mittnacht S, Paterson H, Olson MF, Marshall CJ. (1997) Ras signalling is required for inactivation of the tumour suppressor pRb cell-cycle control protein. *Curr Biol* 7(3): 219-221.
86. Mulligan G, Jacks T. (1998) The retinoblastoma gene family: Cousins with overlapping interests. *Trends Genet* 14(6): 223-229.

87. Murphy M, Stinnakre MG, Senamaud-Beaufort C, Winston NJ, Sweeney C, et al. (1997) Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* 15(1): 83-86.
88. Nevins JR. (1994) Cell cycle targets of the DNA tumor viruses. *Curr Opin Genet Dev* 4(1): 130-134.
89. Nicke B, Bastien J, Khanna SJ, Warne PH, Cowling V, et al. (2005) Involvement of MINK, a Ste20 family kinase, in ras oncogene-induced growth arrest in human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cell* 20(5): 673-685.
90. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. (1982) Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297(5866): 474-478.
91. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, et al. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10(4): 885-892.
92. Porter AC, Vaillancourt RR. (1998) Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene* 17(11 Reviews): 1343-1352.
93. Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Barbacid M. (1982) Transforming genes in human tumors. *J Cell Biochem* 20(1): 51-61.
94. Purchio AF, Erikson E, Brugge JS, Erikson RL. (1978) Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(3): 1567-1571.
95. Qin XQ, Livingston DM, Kaelin WG, Jr, Adams PD. (1994) Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(23): 10918-10922.
96. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83(6): 993-1000.
97. Rayter S, Elliott R, Travers J, Rowlands MG, Richardson TB, et al. (2008) A chemical inhibitor of PPM1D that selectively kills cells overexpressing PPM1D. *Oncogene* 27(8): 1036-1044.
98. Rich JN, Guo C, McLendon RE, Bigner DD, Wang XF, et al. (2001) A genetically tractable model of human glioma formation. *Cancer Res* 61(9): 3556-3560.

99. Robbins KC, Antoniades HN, Devare SG, Hunkapiller MW, Aaronson SA. (1983) Structural and immunological similarities between simian sarcoma virus gene product(s) and human platelet-derived growth factor. *Nature* 305(5935): 605-608.
100. Robles AI, Rodriguez-Puebla ML, Glick AB, Trempus C, Hansen L, et al. (1998) Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes Dev* 12(16): 2469-2474.
101. Ruley HE. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304(5927): 602-606.
102. Saito-Ohara F, Imoto I, Inoue J, Hosoi H, Nakagawara A, et al. (2003) PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res* 63(8): 1876-1883.
103. Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, et al. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448(7155): 811-815.
104. Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. (1994) CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54(24): 6321-6324.
105. Seger YR, Garcia-Cao M, Piccinin S, Cunsolo CL, Doglioni C, et al. (2002) Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell* 2(5): 401-413.
106. Serrano M. (2000) The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis* 21(5): 865-869.
107. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366(6456): 704-707.
108. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366(6456): 704-707.
109. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88(5): 593-602.
110. Shannon P, Sabha N, Lau N, Kamnasaran D, Gutmann DH, et al. (2005) Pathological and molecular progression of astrocytomas in a GFAP:12 V-ha-ras mouse astrocytoma model. *Am J Pathol* 167(3): 859-867.
111. Sherr CJ, Roberts JM. (1999) CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13(12): 1501-1512.

112. Shih TY, Stokes PE, Smythers GW, Dhar R, Oroszlan S. (1982) Characterization of the phosphorylation sites and the surrounding amino acid sequences of the p21 transforming proteins coded for by the harvey and kirsten strains of murine sarcoma viruses. *J Biol Chem* 257(19): 11767-11773.
113. Stiegler P, De Luca A, Bagella L, Giordano A. (1998) The COOH-terminal region of pRb2/p130 binds to histone deacetylase 1 (HDAC1), enhancing transcriptional repression of the E2F-dependent cyclin A promoter. *Cancer Res* 58(22): 5049-5052.
114. Swift S, Lorens J, Achacoso P, Nolan GP. (2001) Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol* Chapter 10: Unit 10.17C.
115. Szatrowski TP, Nathan CF. (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51(3): 794-798.
116. Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, et al. (2006) Mitogenic signalling and the p16INK4a-rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 8(11): 1291-1297.
117. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358(1): 1-3.
118. Trimarchi JM, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, et al. (1998) E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6): 2850-2855.
119. Varmus HE, Weiss RA, Friis RR, Levinson W, Bishop JM. (1972) Detection of avian tumor virus-specific nucleotide sequences in avian cell DNAs (reassociation kinetics-RNA tumor viruses-gas antigen-rous sarcoma virus, chick cells). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(1): 20-24.
120. Vetter IR, Wittinghofer A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294(5545): 1299-1304.
121. Vivanco I, Sawyers CL. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7): 489-501.
122. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, et al. (1989) Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244(4901): 207-211.
123. Vogelstein B, Kinzler KW. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9(4): 138-141.

124. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. (1993) Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* 74(1): 205-214.
125. Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, et al. (2002) Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 22(10): 3389-3403.
126. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. (1999) Nucleolar arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1(1): 20-26.
127. Wittinghofer A, Scheffzek K, Ahmadian MR. (1997) The interaction of ras with GTPase-activating proteins. *FEBS Lett* 410(1): 63-67.
128. Wong-Staal F, Dalla-Favera R, Gelmann EP, Manzari V, Szala S, et al. (1981) The v-sis transforming gene of simian sarcoma virus is a new onc gene of primate origin. *Nature* 294(5838): 273-275.
129. Woo RA, Poon RY. (2004) Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev* 18(11): 1317-1330.
130. Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R, Galaktionov K. (2004) Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by seladin-1. *Nature* 432(7017): 640-645.
131. Wu X, Levine AJ. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3602-3606.
132. Yamaguchi H, Durell SR, Feng H, Bai Y, Anderson CW, et al. (2006) Development of a substrate-based cyclic phosphopeptide inhibitor of protein phosphatase 2Cdelta, Wip1. *Biochemistry* 45(44): 13193-13202.
133. Yoda A, Toyoshima K, Watanabe Y, Onishi N, Hazaka Y, et al. (2008) Arsenic trioxide augments Chk2/p53-mediated apoptosis by inhibiting oncogenic Wip1 phosphatase. *J Biol Chem* 283(27): 18969-18979.
134. Yoshida S, Fukino K, Harada H, Nagai H, Imoto I, et al. (2001) The c-jun NH2-terminal kinase3 (JNK3) gene: Genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors. *J Hum Genet* 46(4): 182-187.
135. Yu Q, Geng Y, Sicinski P. (2001) Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411(6841): 1017-1021.
136. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic raf. *Genes Dev* 12(19): 2997-3007.

La estimulación de señales oncogénicas en células primarias provoca la activación de senescencia inducida por oncogénesis (OIS), uno de los principales mecanismos de supresión tumoral. Recientemente se ha descrito que la activación de OIS responde a la activación de checkpoints dependientes de daño en el DNA (DDR), salvaguardando la integridad del genoma. En este trabajo se ha demostrado como los mecanismos celulares implicados en el proceso de transformación de los gliomas son capaces de desacoplar ambos procesos, OIS y DDR. Los gliomas humanos se caracterizan por presentar alteraciones en vías de señalización intracelulares, así como alteraciones en la regulación del ciclo celular.