# **Biblioteca Digital** FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL ELOIR

# Tesis Doctoral



# Estudio de los mecanismos moleculares de patogénesis del sarcoma de Kaposi mediados por el Herpesvirus Humano-8/KSHV y su oncogén, el receptor acoplado a proteína G (vGPCR), en modelos animales

## D'Agostino, Agata Magdalena

2004

## Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Citatipo APA:

D'Agostino, Agata Magdalena. (2004). Estudio de los mecanismos moleculares de patogénesis del sarcoma de Kaposi mediados por el Herpesvirus Humano-8/KSHV y su oncogén, el receptor acoplado a proteína G (vGPCR), en modelos animales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

fitațip/Chiragoidle.net/20.500.12110/tesis\_n3772\_DAgostino D'Agostino, Agata Magdalena. "Estudio de los mecanismos moleculares de patogénesis del sarcoma de Kaposi mediados por el Herpesvirus Humano-8/KSHV y su oncogén, el receptor acoplado a proteína G (vGPCR), en modelos animales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\_n3772\_DAgostino

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



## FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis para optar al título de

Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Estudio de los mecanismos moleculares de patogénesis del sarcoma de Kaposi mediados por el Herpesvirus Humano-8/ KSHV y su oncogén, el receptor acoplado a proteína G (vGPCR), en modelos animales

# Autor: Agata Magdalena D'Agostino Director: Dr. Enrique A. Mesri

3772

Weill Medical College of Cornell University

# UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis to access to the PhD degree from Universidad de Buenos Aires

Studies in animal models on molecular mechanisms of Kaposi's sarcoma pathogenesis mediated by Human Herpesvirus-8/ KSHV and its oncogen, the G protein coupled receptor (vGPCR).

# Autor: Agata Magdalena D'Agostino Director: Dr. Enrique A. Mesri

## Weill Medical College of Cornell University

A MI MUSA

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiese sido posible sin la dirección y orientación por parte del Dr. E. A. Mesri. A él mi más profundo agradecimiento. En cuanto a la preparación técnica deseo agradecer la paciencia y el compromiso a las Dras. Pilar Eroles y Chiara Chiozzini quienes codo a codo colaboraron en este proyecto y me transmitieron todos sus conocimientos, también a Rafael Tejada y a todos los que me aportaron sus conocimientos; especialmente a los grupos colaboradores de este trabajo, los grupos de los Dres. Ethel Cesarman, Dirk Dittmer y Shahin Raffi; a mis profesores de técnicas inmunohistoquímicas que me abrieron las puertas de un mundo nuevo y lleno de gratificaciones y a todos aquellos que estuvieron a mi lado, cerca o lejos, conteniéndome en los momentos difíciles. A ellos un capítulo aparte para agradecérselos por siempre.

Deseo agradecer a mi amigos que compartieron los trajines de la vida durante el transcurso del trabajo, especialmente a Lucía, Mariana, Gaby, Noe, Sol, Cynthia, Eugenia, Tomás, Mariano, Leopoldo y la banda del 4to K que fueron mucho más que "friends" y me ayudaron a seguir adelante en una Nueva York post 9-11. A mis amigos de siempre que como siempre estuvieron siempre, a los Faltan, a Piti, Lisa e Isa que me ofrecieron hogar y refugio y a los locos de Casa Loca, a mi lado en buenas y no tan. Al resto de mis amigos que a pesar de las distancias témporo-espaciales y de estar desparramados por el mundo me dan la alegría y el honor de contarme entre ellos, para mí es un orgullo y una pasión saberme su amiga. Gracias.

Por último, el más importante de los agradecimientos al ser humano más lindo en años luz a la redonda quien ha dejado todo lo que siempre tuvo y se subió a la montaña rusa de mi vida, para Musa el agradecimiento y la dedicación de este humilde trabajo. KSHV es un oncovirus implicado en Sarcoma de Kaposi (KS) y otros cánceres asociados a SIDA. KS es un neoplasma caracterizado por la proliferación de células ahusadas y la intensa angiogénesis. Los mecanismos a través de los cuales KSHV causa la respuesta angioproliferativa de KS se desconocen y la reproducción de todos los aspectos de KS mediante infección experimental por KSHV aún no ha podido ser demostrada.

El receptor acoplado a proteína-G (vGPCR) de KSHV puede estimular cascadas de señalización que inducen angiogénesis y transformacion celular. Indentificar estas cascadas puede tener significancia terapéutica. Ciclooxigenasa-2 (COX-2) es un mediador involucrado en angiogénesis tumoral que puede ser regulada por antinflamatorios (AINEs). En la primera parte de este trabajo demostramos que vGPCR regula la actividad y la expresión de COX-2 vía ERK-1/2. Encontramos que la inhibición de COX-2 impide la angiogénesis inducida por vGPCR y que la administración del AINE Celecoxib retarda el crecimiento tumoral con disminución en la vasculatura y producción de VEGF. Así, COX-2 sería uno de los componentes moleculares del cambio angiogénico de vGPCR y un posible blanco terapéutico.

En la segunda parte mostramos que la transfección con KSHV clonado en un Cromosoma Artificial Bacteriano (KSHVBac36) en preparaciones de médula ósea murinas enriquecida en precursores de células endoteliales (mEC) es suficiente para inducir tumorigénesis y llevar al cambio fenotípico angiogénico. Las células mEC transfectadas con KSHVBac36 (mECK36) estaban infectadas con KSHV, secretaban VEGF, eran angiogénicas *in vivo* e indujeron en ratones inmunodeficientes la formación de sarcomas de células ahusadas vascularizados que expresaban LANA y marcadores característicos de KS. La inhibición de la expresión de vGPCR en las mECK36 utilizando siRNA condujo a la inhibición de su angiogenicidad y tumorigenicidad.

Estos resultados definen un modelo animal para estudiar la patogénesis de KS mediada por KSHV y señalan a vGPCR como uno de sus principales oncogenes angiogénicos.

Palabras claves: KSHV, GPCR, angiogénesis, cáncer, carcinogénesis viral, modelos animales, Ciclooxigenasa-2.

Studies in animal models on molecular mechanisms of Kaposi's sarcoma pathogenesis mediated by Human Herpesvirus-8/ KSHV and its oncogen, the G protein coupled receptor (vGPCR).

## ABSTRACT

KSHV is a human oncovirus associated with Kaposi's sarcoma (KS) an AIDS associated cancer. KS is a neoplasm characterized by proliferation of spindle-shaped cells and intense angiogenesis. The mechanisms whereby KSHV causes KS angioproliferative response are not well defined and the reproduction of KS by experimental KSHV infection has not yet been shown.

vGPCR is a G protein-coupled receptor encoded by KSHV that subverts host's signaling pathways to induce cell transformation and angiogenesis. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is a mediator involved in tumor angiogenesis that can be inhibited by NSAIDS. We demonstrated that vGPCR upregulates COX-2 activity and expression, and we found that inhibition of COX-2 by the NSAID Celecoxib impairs vGPCR-driven angiogenesis and tumorigenesis. Taken

together these results show that COX-2 is a molecular mediator of vGPCR angiogenicity and potential target for KS therapy.

On the second part we show that transfection of KSHV cloned in a Bacterial artificial chromosome (Bac36) into mouse Bone marrow preparations enriched in endothelial cells and its progenitors (mEC) is sufficient to induce tumorigenesis and angiogenesis. mEC transfected with KSHVBac36 (mECK36) were infected with KSHV, displayed high levels of VEGF secretion, were angiogenic *in vivo* and induced spindle-cell sarcomas expressing KSHV LANA and KS phenotypic markers. The inhibition of vGPCR expression mediated by siRNA led to inhibition of mECK36 angiogenesis and of tumor growth.

These results define an animal model of KSHV-mediated KS pathogenesis *in vivo* and point to vGPCR as one of its major angiogenic oncogenes.

Key words: KSHV, vGPCR, angiogenesis, cancer, viral carcinogenesis, animal models, Cyclooxygenase-2

# ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen	
Resumen en inglés – Abstract	
Abreviaturas	
Introducción	
Sarcoma de Kaposi	16
Patogénesis del Sarcoma de Kaposi	17
Etiología del Sarcoma de Kaposi	24
Herpesvirus asociado a Sarcoma de Kaposi	26
KSHV y la patogénesis herpesviral del Sarcoma de Kaposi	30
Receptor viral acoplado a proteína G (KSHV-ORF74)	37
Modelos animales para el estudio de la patogénesis de KS	42
Inflamación y Ciclooxigenasa-2	44
Objetivos	
Objetivo general y alcances	49
Objetivos específicos	50
Materiales y Métodos	51
Células, animales, productos químicos y biológicos	51
Transfecciones	52
Enzimo Inmuno Ensayo para PGE₂ (EIA)	54
Western Blots (WB)	55
RT-PCR Semicuantitativa	55
Ensayo de angiogénesis inducida por células tumorales	57

	Ensayo de crecimiento tumoral	57
	Ensayo de metástasis	58
	ELISA para VEGF	58
	Inmunohistoquímica para COX-2, CD31, CD34, KDR, LANA	59
	Inmunohistoquímica para $\alpha$ -SMA	60
	Inmunofluorescencia para LANA y K8.1	61
	Hibridización <i>in situ</i> para LANA	61
	Análisis Estadístico	62
Resul	Itados	64
	Primera Parte	64
	vGPCR regula la actividad de Ciclooxigenasa-2	64
	vGPCR activa la expresión de Ciclooxigenasa-2	66
	Ciclooxigenasa-2 regula la angiogenicidad de vGPCR	67
	COX-2 media la tumorigénesis inducida por vGPCR	71
	Los tumores inducidos por vGPCR expresan COX-2	73
	COX-2 modula la angiogénesis tumoral y producción	
	de VEGF en los tumores inducidos por vGPCR	75
	Segunda Parte	79
	Generación de células de linaje endotelial murina	
	conteniendo el genoma completo de KSHV	79
	Caracterización de las células mECK36	82
	La expresión de KSHV en células mEC estimula la	
	secreción de VEGF e induce angiogénesis	84
	Las células mECK36 son tumorigénicas	86
	Caracterización de los tumores inducidos por mECK36	89

	Las células mECK36 generan lesiones multifocales	
	del tipo de KS en los pulmones de ratones SCID/ NOD	91
	Rol de vGPCR en la patogénesis viral inducida por	
	KSHV en mEC	93
	La inhibición de la expresión de vGPCR reduce la	
	capacidad de KSHV de estimular la actividad de COX-2	98
Discusión		101
Bibliografía		117

## ÍNDICE DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Lesión de Sarcoma de Kaposi en estadio nodular	20
FIGURA 2. Cápside del Herpesvirus asociado a Sarcoma de Kaposi	25
FIGURA 3. Estructura genómica de KSHV	28
FIGURA 4. Receptor acoplado a proteína G	38
FIGURA 5. Cascadas de señalización activadas por vGPCR	41
FIGURA 6. COX es la enzima clave en la producción de	
prostaglandinas a partir de ácido araquidónico	45
FIGURA 7. Estructura tridimensional de Ciclooxigenasa-2 (COX-2)	47
FIGURA 8. vGPCR regula la actividad COX-2 en células NIH3T3	65
FIGURA 9. vGPCR regula la expresión de COX-2 vía ERK-1/2	68
FIGURA 10. COX-2 media la angiogenicidad de vGPCR in vivo	70
FIGURA 11. La tumorigenicidad de las células transformadas	
por vGPCR disminuye ante el tratamiento con Celecoxib	72

FIGURA 12. Los tumores inducidos por vGPCR expresan COX-2	74
FIGURA 13. El Tratamiento con Celecoxib inhibe la angiogénesis	
tumoral inducida por vGPCR	76
FIGURA 14. La inhibición de COX-2 afecta la producción de VEGF	
in vitro e in vivo	78
FIGURA 15. Esquema del constructo conteniendo el genoma de KSHV	81
FIGURA16. Las células mEC transfectadas con Bac36 expresan	
los genes de KSHV, LANA y K8.1	83
FIGURA17. Las células mEC transfectadas con KSHV son	
angiogénicas	85
FIGURA 18. Las células mECK36 son tumorigénicas	88
FIGURA 19. Los tumores mECK36 expresan LANA	90
FIGURA 20. Los tumores desarrollados por mECK36 expresan	
CD31/PECAM, flk-1 y CD34	90
FIGURA 21. mECK36 producen lesiones multifocales en pulmón	92
FIGURA 22. La inhibición de la expresión de vGPCR	
disminuye la angiogenicidad de mECK36	95
FIGURA 23. La inhibición de la expresión de vGPCR disminuye la	
capacidad tumorigénica de mECK36	97
FIGURA 24. La inhibición de la expresión de vGPCR en las	
células mEC-KSHV disminuye la capacidad de secretar PGE <sub>2</sub>	99

## ABREVIATURAS

- AC: anticuerpo
- ADN: Ácido DesoxiriboNucléico
- ARN: Ácido RiboNucléico
- AINE: Antiinflamatorio No Esteroideo
- α-SMA: a-SMA: Actina de músculo liso alfa
- Bac36 o KSHV Bac36: Cromosoma Artificial Bacteriano conteniendo el

genoma completo de KSHV

- **b-FGF:** Factor de Crecimiento Fibroblástico basico
- **CMV:** Citomegalovirus
- COX-2: Ciclooxigenasa-2
- DAB: Di-Amino Benzidina
- DMSO: Di-Metil SulfÓxido
- **EBV:** Virus Epstein Barr
- EC: Célula Endotelial
- EGFP: Proteína Verde Fluorescente
- FBS: Suero Fetal Bovino
- Fig.: Figura
- HUVEC: Célula Endotelial de Vena Umbilical Humana
- HVS: Herpes Virus Saimiri
- IL-6: Interleuquina-6
- IL-8: Interleuquina-8
- **IFN-**γ: interferón gamma

I.D.: intradérmico

- I.P.: Intraperitoneal
- KDR: flk-1: VEGF-R2: Receptor de VEGF 2 tipo tirosina quinasa

KSHV: HHV-8: Virus asociado a Sarcoma de Kaposi. Herpesvirus humano-8

LANA: antígeno nuclear asociado a latencia

- MAPK: MAP quinasa
- mEC: Preparacion celular de medula osea de raton enriquecida en celulas
- endoteliales y sus progenitores
- mECK36: mEC transfectada con KSHV Bac36
- min: minuto/s
- MIP: Proteína inflamatoria de Macrófagos
- NFkB: Factor nuclear kappa B
- **ON:** Over Night (tratamiento durante toda la noche equivalente a 18 hs)
- Onc-M: Oncostatina M
- ORF: (Del Ingles Open Reading Frame) Marco Abierto de lectura
- PBS: Buffer Fosfato Salino
- **PGE<sub>2</sub> : Prostaglandina E<sub>2</sub>**
- **PI3K:** Fosfatidil Inositol 3-Fosfato
- PMA: Acetato de Metil Forbol
- PTX: Toxina de pertussis
- RNAi: siRNA: ARNi: ARN de interferencia
- S.C.: Subcutáneo
- SC58215: Celecoxib: Celebrex®
- SIDA: Síndrome de InmunDeficiencia Adquirida
- **TIA:** Ensayo de Angiogénesis inducida por células Tumorales

**TNF-** $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular

- VEGF-R1: flt-1: Receptor 1 de VEGF
- VEGF-R2: KDR: flk-1: Receptor 2 de VEGF
- **VEGF-R3:** Receptor 3 de VEGF
- vGPCR: Receptor acoplado a proteína G viral
- VIH: HIV: Virus de Inmudeficiencia Humana
- **WB:** Western blot o Inmunoblot

## INTRODUCCIÓN

#### SARCOMA DE KAPOSI

El Sarcoma de Kaposi (KS) es el cáncer más común asociado a SIDA (Safai 1985; Gallo 1998). Esta enfermedad, definida como tumor de tipo sarcoma vascular, ha sido descripta por Moriz Kaposi en 1872 (Kaposi 1872) pero hasta la epidemia de SIDA ocurrida en los años '80 se consideraba una enfermedad poco frecuente, endémica de África ecuatorial o presentada esporádicamente en la región mediterránea en personas de edad avanzada.

Con la irrupción de la epidemia de VIH surgió una nueva forma más agresiva en pacientes jóvenes con SIDA indistintamente de la ubicación geográfica, quedando así definidos los distintos tipos de presentación de la enfermedad que se pueden clasificar de acuerdo a la epidemiología de KS y según los grupos de riesgo y prevalencia del siguiente modo:

## -Sarcoma de Kaposi clásico:

Sarcoma poco agresivo y relativamente indolente que afecta principalmente las extremidades de personas ancianas de origen judío mediterráneo (Safai 1985)

-Sarcoma de Kaposi endémico:

Sarcoma que se presenta en poblaciones determinadas de África ecuatorial sin distinción de edad (Oettle, 1962)

-Sarcoma de Kaposi iatrogénico:

Sarcoma que se presenta en pacientes que reciben tratamientos inmunodepresivos, generalmente post-transplantes (Franceschi y Geddes 1995)

#### -Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA:

Sarcoma más común y agresivo en la actualidad que se manifiesta en personas infectadas con VIH. Comienza con lesiones en piel y que sin el tratamiento adecuado se disemina en forma fulminante afectando vísceras como intestino, hígado, bazo y pulmones (Safai 1985)

## PATOGÉNESIS DEL SARCOMA DE KAPOSI

Estos tumores vasculares surgen como lesiones multifocales en la piel, pulmones y tracto gastrointestinal caracterizado por intensa angiogénesis, proliferación de células de tipo ahusada y extravasación eritrocitaria (Safai 1985; Ensoli 1998; Gallo 1998). Las células ahusadas son el principal tipo celular en las lesiones y se las considera su componente neoplásico.

Existen controversias acerca del origen de estas células. Generalmente se asume que son de origen endotelial dado que la mayoría son positivas para marcadores fenotípicos de tipo endotelial como CD34 y factor VIII, pero algunas de ellas expresan marcadores de músculo liso, macrófagos o células dendríticas (Nickoloff y Griffiths 1989). Inclusive algunas expresan simultáneamente marcadores de distintos tipos celulares mesodérmicos sugiriendo precursores mesenquimáticos totipotentes o un origen derivado de un precursor endotelial bajo un proceso anómalo de diferenciación.

Estas células ahusadas presentes en las lesiones han podido ser aisladas y cultivadas a partir de células circulantes en pacientes con SIDA que luego han desarrollado KS (Browning 1994). Estas células presentaban un fenotipo adherente y marcadores de macrófagos y células endoteliales (Siriani 1997). Estos resultados dieron lugar a la hipótesis del precursor hematopoiético circulante de KS.

Las principales características histopatológicas de esta enfermedad son

-la proliferación de células endoteliales y células de fenotipo ahusado,

-la angiogénesis que se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes y

-el infiltrado celular de tipo inflamatorio.

Estas características histopatológicas definen los distintos estadios de KS que de acuerdo a su evolución se definen como:

#### 1) Estadio de parche:

Representado por las lesiones tempranas, generalmente en piel, que presentan pequeños espacios irregulares revestidos por células endoteliales que recubren los vasos dérmicos normales y en los que se pueden observar infiltrados de linfocitos.

## 2) Estadio de placa:

Es el siguiente estadio caracterizado por la expansión de células ahusadas y la invasión vascular hacia la dermis. Estas células ahusadas forman canales vasculares en forma de herraduras que contienen eritrocitos.

## 3) Estadio nodular.

Es el estadio final donde las lesiones se cubren por capas sumamente vascularizadas de células ahusadas confiriendo el aspecto de nódulos (Fig. 1).

Dado que las lesiones de KS evolucionan desde un infiltrado inflamatorio con escasa proliferación celular hacia una presentación e invasividad posteriores típicas de auténtica malignidad, tanto la teoría de reacción inflamatoria como la carcinogénica se han propuesto para explicar la patogénesis de KS.



## FIGURA 1. Lesión de Sarcoma de Kaposi en estadio nodular

*a*, Apariencia y *b*, Características histológicas de las lesiones de KS: células ahusadas, espacios vasculares irregulares, extravasamientos eritrocitarios e infiltrado inflamatorio. La flecha señala una célula ahusada marcada con anti-VEGF (Boshoff 1998).

Por un lado existen evidencias de que las lesiones podrían tener un origen neoplásico; pero por el otro, también hay indicios de que las lesiones son consecuencia de una hiperplasia reactiva. En el estadio inicial las células ahusadas son la parte minoritaria del componente celular, abundando sobre todo las células inflamatorias. Esto se suma al hecho de que clínicamente KS se presenta como lesiones múltiples con distribución definida y de frecuente remisión espontánea favoreciendo así la teoría de enfermedad reactiva.

Las células provenientes de las lesiones crecen en cultivo sólo por algunos pasajes y con cariotipo diploide normal salvo tres líneas celulares con verdaderas características neoplásicas pero que provienen de pacientes en estadios muy avanzados de KS (Siegal 1990; Albini 1997; Lunardi-Iskandar 1995).

La hipótesis neoplásica predice clonalidad de las lesiones, mientras que la hipótesis reactiva predice una presentación policional. Estudios de clonalidad muestran que en estadios avanzados las lesiones de KS suelen ser clonales (Rabkin 1995, 1997) pero aún hoy en día la controversia sigue existiendo y la situación real podría ser una combinación de ambas presentaciones patológicas.

Así, la hipótesis reactiva predice un desarrollo a partir de un estadio inicial de parche donde la proliferación de células endoteliales o sus precursores sería policional y estaría debida a una prominente reacción

inflamatoria y angiogénica (Risau 1997). Posteriormente, las lesiones podrían evolucionar hacia los estadios avanzados convirtiéndose en una enfermedad neoplásica clonal con diseminación de células ahusadas en distintas partes del cuerpo.

Este modelo es comparable a la linfoproliferación policional observada en individuos inmunodeficientes infectados con Virus Epstein Bar (EBV) que posteriormente progresan hacia un linfoma cional de células B.

Por otro lado, la hipótesis neoplásica predice que KS comenzaría siendo una neoplasia de origen indistinguible de las células ahusadas y que la hiperplasia reactiva sería consecuencia de la reacción a los factores secretados por estas células neoplásicas minoritarias.

Este modelo es comparable con el de la enfermedad de Hodgkin, aunque en este caso las células neoplásicas minoritarias (Células de Reed-Sternberg) son gigantes y fácilmente identificables.

Las células de KS producen en cultivo altos niveles de citoquinas como Interleuquina 6 (IL-6), Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a), Oncostatina M (Onc-M) Interferón gamma (IFN-g) y Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Ensoli 1989, 1994; Miles 1990; Nair 1992; Salahuddin 1998; Samaniego 1995). Principalmente se ha demostrado que VEGF, IL-6, bFGF e IFN- $\gamma$  son angiogénicas *in vitro* e *in vivo*.

Varios experimentos sugieren que la histogénesis de las células ahusadas puede recapitularse, al menos parcialmente, cuando se tratan células endoteliales con citoquinas inflamatorias y factores angiogénicos que se encuentran en altas concentraciones en las lesiones de KS. Entonces, dada la naturaleza de KS se ha sugerido que estas lesiones serían impulsadas y mantenidas por estas citoquinas (Nair 1992; Samaniego 1995, 1997). En especial el VEGF jugaría un rol central en la patogénesis de KS siendo un factor angiogénico y de crecimiento para las células de KS encontrado en forma ubicua en las lesiones (Cornali 1996; Masood 1997) en coincidencia con la expresión de su receptor 2 (VEGF-R-2) también llamado KDR que se sobreexpresa en las lesiones (Brown 1996). A pesar de toda esta información aún no se han definido totalmente los mecanismos por los cuales la angiogénesis mediada por VEGF gatillaría y promovería la patogénesis de KS (Gallo 1998).

Las lesiones tempranas de KS son tratadas con terapias locales y no tóxicas; sin embargo, la quimioterapia sistémica en KS avanzado es difícil de tolerar por pacientes con SIDA (Jie 1997). En su forma avanzada diseminada es aún difícil de tratar causando morbilidad y mortalidad importantes. El desarrollo de terapias basadas en la patogénesis de KS es fundamental para mejorar las perspectivas terapéuticas (Jie 1997; Mesri 1999; Toschi 2002).

## ETIOLOGÍA DEL SARCOMA DE KAPOSI

En la década del '80 comenzó a observarse KS agresivo en hombres jóvenes homosexuales, y con el posterior descubrimiento del SIDA y el virus asociado VIH que correspondía con los casos de KS se comenzó a sospechar del VIH como factor etiológico de KS. Lo que llamaba la atención era que la incidencia de KS en pacientes con SIDA era 20 veces mayor en el grupo de pacientes hombres y homosexuales que en cualquier otro grupo de portadores de VIH. Debido a esto se comenzó a sospechar de la existencia de otro cofactor de transmisión sexual que hiciera que la incidencia de KS fuera coherente con los datos epidemiológicos.

Durante muchos años se sospechaba de una etiología viral para el Sarcoma de Kaposi (Oettle 1962). En 1972 se detectaron partículas herpesvirales en lesiones de KS atribuidas (ahora sabemos que erróneamente) a Citomegalovirus (CMV) (Giraldo 1972). Son varios los virus que se han encontrado presentes en las lesiones pero ninguno de ellos se encontraba consistentemente en las lesiones (Huang 1992; Monini 1999). Con el advenimiento del SIDA-KS en 1981 resurge la hipótesis del cofactor etiológico viral, pero fue recién en 1994 cuando el grupo liderado por Yuang Chang identificó, utilizando una técnica de sustracción genética, ADN viral en lesiones de KS y lo secuenció, encontrándose alta homología con el Virus de Epstein

Bar (EBV) y el Herpesvirus Saimiri (HVS) que son dos herpesvirus oncogénicos en humanos y primates respectivamente (Chang 1994). Así, tratándose de un Herpesvirus se lo llamo Herpesvirus Asociado a Sarcoma de Kaposi (KSHV) o Herpesvirus-8 humano (HHV-8). Nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que las secuencias herpesvirales encontradas en las lesiones podían encontrarse encapsidadas formando partículas virales que podían infectar células B humanas (Mesri 1996). La microscopía electrónica de las partículas virales ha demostrado que los viriones de KSHV poseen la clásica arquitectura herpesviral (Mesri 1996; Renne 1996; Arvanitakis 1996).



FIGURA 2. Cápside del Herpesvirus asociado a Sarcoma de Kaposi Imagen por microscopía electrónica de KSHV encapsidado obtenido de Iesiones de Sarcoma de Kaposi (Arvanitakis, 1996).

### HERPESVIRUS ASOCIADO A SARCOMA DE KAPOSI

KSHV pertenece a la familia de gamma herpesvirus y al género *Rhadinovirus* que son en general virus linfotrópicos oncogénicos.

Los herpesvirus poseen un genoma compuesto por ADN lineal doble cadena, están recubiertos por una cápside icosahédrica que a su vez se encuentra recubierta por un tegumento y una estructura externa o envoltura con puntas formadas por glicoproteínas (Fields 1996).

La síntesis de ADN y el ensamblaje de las cápsides ocurre en el núcleo. Cuando el ADN de los herpesvirus entra al núcleo de una célula huésped y es liberado de su cápside puede tomar dos conformaciones distintas, puede formar un episoma de conformación circularizada y capaz de replicarse sincrónicamente con la célula permaneciendo en estado latente o puede, eventualmente, linearizarse y replicarse por mecanismo de círculo rodante entrando en fase lítica de multiplicación viral o infección productiva. Algunos tipos celulares son infectados productivamente por los herpesvirus y otros pueden se infectados latentemente pero pueden ser reactivados líticamente en respuesta a estímulos determinados. En el estado de latencia el genoma viral transcribe solamente un número mínimo de genes necesarios para la persistencia y propagación del genoma episomal en las células infectadas evitando así la detección por parte del sistema inmune. En cambio, la producción de la progenie infectiva destruye a la célula infectada. Los genes virales del programa lítico o productivo pueden ser clasificados como

tempranos o tardíos dependiendo del estadio del ciclo viral donde se expresan. En general los genes tempranos codifican para proteínas que preparan a la célula infectada para replicar el ADN viral, mientras que los genes tardíos codifican para proteínas estructurales. En general, las oncoproteínas suelen ser codificadas por genes tempranos.

Los gamma herpesvirus son generalmente linfotrópicos y solamente infectan las células de sus huéspedes naturales o de especies muy relacionadas. Se los encuentra en estado de latencia en los tejidos linfoides mientras que en fibroblastos y/o tejidos epiteliales se encuentran en estado lítico.

El género *Rhadinovirus* presenta una estructura genómica común consistente en un segmento central de ADN con bajo contenido de GC flanqueado por secuencias GC multirrepetitivas que le confiere el carácter frágil que los caracteriza (rhadino=frágil). Una característica de los rhadinovirus animales (HVS por ejemplo) es que cuando estos virus infectan especies relacionadas pero distintas a su huésped natural producen enfermedades linfoides fulminantes.

KSHV es el primer ejemplo descrito de un rhadinovirus humano y ha sido también asociado a linfomas de efusión primaria (Cesarman 1995) y a la enfermedad multicéntrica de Castleman (Soulier 1995; Dupin 1995) que se presenta como una linfoadenopatía generalizada con anormalidades inmunológicas.



## FIGURA 3. Estructura genómica de KSHV

El esquema representa el genoma completo del virus con sus distintos marcos de lectura (*Open Read Frames*, ORFs). La orientación de los distintos ORFs está denotada por la dirección de las flechas. Los ORFs homólogos a HVS en azul oscuro y los no homólogos en azul claro. Regiones codificantes putativas no designadas específicamente se muestran sobre el mapa. Las zonas repetitivas se encuentran señaladas con líneas blancas. Regiones codificantes putativas putativas no designadas como ORFs se muestran como líneas sólidas (Russo 1996).

Están descriptos más de 80 marcos abiertos de lectura para este virus (Fig. 3) nombrados según su homología con genes de HVS. Los marcos abiertos de lectura (ORFs) no homólogos a genes de HVS se han designado con la letra K (K1-K15). La adquisición de genes del huésped es un rasgo común de los rhadinovirus (McGeoch y Davidson 1995; Murphy 1997). Para KSHV se han descrito 14 marcos abiertos de lectura que tienen contrapartes celulares (Fig. 3). Se piensa que la mayoría de los genes tomados de los huéspedes o "pirateados" no son esenciales para la replicación viral en cultivo sino que cumplen funciones adaptativas en sus ambientes naturales relacionados con el ciclo viral en las células huéspedes tales como: incrementar la replicación viral e independizarla del ciclo celular, expandir la subpoblación de células infectables y/o contrarrestar los mecanismos de respuesta del huésped contra la infección viral.

El incremento de la replicación viral con independencia del estadio del ciclo celular está mediada básicamente por enzimas del metabolismo de nucleótidos y además KSHV codifica para homólogos de moléculas que podrían incrementar la proliferación celular y expandir de este modo la subpoblación de células infectables tales como: ciclina D (Cesarman 1996b; Chang 1996; Li 1997), Interleuquina-6 (Moore 1996) y un homólogo del receptor de Interleuquina-8 (Cesarman 1996b; Arvanitakis 1997). Las tres proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP) codificadas por este virus también podrían cumplir un rol similar al atraer células susceptibles a ser infectadas e inducir angiogénesis. KSHV codifica también para una proteína homóloga a Bcl-2 y otra homóloga a Flip que podrían inhibir la apoptosis en respuesta a la

infección viral por dos diferentes mecanismos (Cheng 1997; Sarid 1997) y extender la vida de las células infectadas. Por último, codifica para un homólogo al factor de respuesta a Interferón que podría inhibir la supresión mediada por interferón y mimificar su efecto proliferativo (Taniguchi 1995).

## KSHV Y LA PATOGÉNESIS HERPESVIRAL DEL SARCOMA DE KAPOSI

Patogénesis viral es el mecanismos mediante el cual los virus causan enfermedades en sus huéspedes. Así, se define virulencia como la capacidad de un virus para producir enfermedades en sus huéspedes. La virulencia depende de una variedad de factores tanto del huésped (edad, inmunocompetencia, especie) como del virus (dosis del virus, ruta de entrada, etc.) (Fields 1996).

Dentro de un individuo los virus puede causar infecciones agudas o crónicas persistentes. En las infecciones agudas son eliminados rápidamente por el sistema inmune y por ello desarrollan la habilidad de transmitirse rápidamente y/o la de sobrevivir fuera del organismo (rabia y gripe por ejemplo). Por otro lado, para establecer infecciones persistentes hacen falta mecanismos que les permitan limitar los efectos citotóxicos y evadir la respuesta inmune; en consecuencia estos virus suelen tener genomas que codifican para proteínas regulatorias capaces de contrarrestar los mecanismos

de defensa del huésped (ejemplos de esta estrategia son el VIH, el virus de la hepatitis B y KSHV). La manifestación clínica de las patologías por infecciones crónicas es por lo general un fenómeno multicausal y no determinístico que se evidencia varios años después de la infección y es por eso que la patogénesis de estos virus persistentes es más compleja y sutil que la de los virus que producen infecciones agudas.

La patogénesis viral se estudia a nivel sistémico investigando mecanismos de transmisión, ruta de entrada, sitios de replicación primaria y tejidos infectados. También se estudia a nivel celular intentando dilucidar el mecanismo de entrada a la célula huésped, los receptores virales, las vías y mecanismos por los cuales son liberados y cómo la infección viral altera las funciones celulares normales. El conocimiento de la patogénesis es importante para desarrollar estrategias racionales para el control, la prevención y la terapia de enfermedades de origen viral.

En el caso de los virus oncogénicos, algunos pueden actuar como carcinogénicos en sus huéspedes naturales, mientras que otros sólo revelan su potencial oncogénico en infecciones experimentales. La potencia de los virus como agentes transformantes también es variable. Algunos retrovirus más virulentos pueden inducir tumores en animales en tan sólo días mientras que la mayoría de los oncovirus requieren un período de latencia mucho más largo y sólo una pequeña fracción de los huéspedes desarrollan tumores. El hecho que la infección por virus oncogénicos en seres humanos no determine inevitablemente la formación de tumores refleja la naturaleza secuencial del

cáncer y la carcinogénesis en etapas, en la cual cada paso constituye un evento genético independiente e irreversible que sucesivamente contribuye a la desregulación de los mecanismos de control de la proliferación celular (Zur Hausen 1999). Muchas veces la infección viral representa solamente uno de estos pasos, el cáncer evoluciona sólo si algunos de los otros cambios genéticos necesarios para la transformación oncogénica ocurren en una misma célula. El estudio de los virus transformantes ha jugado un rol central en el entendimiento de los mecanismos que controlan el crecimiento celular proveyendo metodologías para dilucidar las vías de transducción de señales y brindando un marco conceptual en el que los mecanismos regulatorios pudiesen ser interpretados.

El primer indicio de que KSHV estaba involucrado en la patogénesis de KS fue la detección de secuencias de KSHV por PCR en las cuatro formas epidemiológicas de KS (Boshoff 1995; Moore y Chang 1995; Dupin 1995b). En los pacientes analizados KSHV fue detectado en las lesiones de KS y también en sangre periférica. Si bien se podría haber pensado que las lesiones ricas en citoquinas podrían aumentar la eficacia de replicación viral de KSHV sin ser el virus la causa de las mismas, se ha demostrado que KSHV no está presente en otros tumores similares como angiomas o angiosarcomas y es muy raramente detectable en otros tipos de tumores de piel como carcinomas escamosos y melanomas en pacientes inmunodeprimidos (Boshoff 1995).

Ensayos inmunohistoquímicos de una proteína nuclear codificada por un gen latente de KSHV (LANA) han demostrado que el virus está presente en

menos del 10% de las células ahusadas en las lesiones tempranas, mientras que en el estadio nodular infecta al 90% de estas células. Estos datos son coherentes con la idea de que en los estadios iniciales KS sería reactivo. Tanto en estadios tempranos como tardíos la expresión de LANA correlaciona con la presencia de marcadores de precursores endoteliales y endotelio linfático sugiriendo que KSHV infectaría precursores endoteliales y/o células endoteliales linfáticas que luego derivarían en células ahusadas (Dupin 1999).

Hoy en día se considera que KSHV/ HHV-8 es el  $\gamma$ -2-herpesvirus oncogénico identificado como cofactor etiológico estrictamente necesario para KS, habiendo sido identificada la infección con KSHV y su expresión genética como responsable del fenotipo angiogénico de KS (Chang 1994; Boshoff 1998; Ganem 1998; Antman 2000).

KSHV cumple con los postulados tipo Koch para virus (postulados adaptados de los originales enunciados por Koch) (Zur Hausen 1999) quedando definido como un oncovirus angiogénico necesario para la patogénesis de KS (Ganem 1998; Boshoff 1998):

1) KSHV se encuentra consistentemente en las lesiones de todas las formas clínicas de KS (Chang 1994; Moore y Chang 1995)

2) La infección con KSHV precede el desarrollo de KS y se superpone con los riesgos de contraer KS (Whitby 1995; Moore 1996; Kedes 1996)

 KSHV infecta células ahusadas y células endoteliales en las lesiones de KS (Boshoff 1995)

4) KSHV infecta y transforma células endoteliales llevando a un fenotipo angiogénico caracterizado por inducción de KDR, transformación e inmortalización (Flore 1998)

5) El genoma de KSHV (Russo 1996) contiene genes con el potencial de inducir transformación celular (Gao 1997; Godden-Kent 1997; Bais 1998; Muralidhar 1998; Lee 1998; Friborg 1999; Radkov 2000) desregulación inmunológica (Moore 1996; Nicholas 1997) y angiogenicidad (Boshoff 1997; Bais 1998; Aoki 1999; Yang 2000).

A pesar de esto KSHV causa KS sólo bajo ciertas condiciones. Alrededor del 5% de la población general se encuentra infectada con KSHV pero la incidencia de KS está debajo de 1 en 100.000. La incidencia de KS se incrementa 20.000 veces en pacientes homosexuales con SIDA sugiriendo que la inmunodesregulación y VIH son cofactores importantes para KS y la patogénesis mediada por KSHV (Gallo 1998).

La prevalencia de KSHV coincide con los patrones geográficos de incidencia de KS previa a la epidemia del SIDA. La prevalencia de la infección es mucho mayor en Italia, donde el KS clásico es más prevalente, además la incidencia de KS en distintas partes de Italia es proporcional a la prevalencia de KSHV (Whitby 1995; Gao 1996). KSHV se encuentra presente en más del 60%
de la población en ciertas partes de África (Gao 1996) en donde KS era endémico antes de la epidemia de SIDA. En estos casos aún no está claro cuales serían los cofactores involucrados.

La patogenicidad de KSHV está determinada por patrones específicos de expresión de sus genes virales por el contexto celular en que estos genes se expresan, siendo ambos altamente dependientes de factores del huésped.

Como otros herpesvirus, KSHV puede llevar a infecciones latentes o a infecciones productivas o líticas que destruyen las células infectadas. La gran mayoría de las células en las lesiones de KS se encuentran latentemente infectadas con KSHV. A pesar de esto muchos de los genes de KSHV que se han encontrado como transformantes o patogénicos para KS son genes líticos y sólo se expresan por una pequeña subpoblación de células en las lesiones de KS infectadas productivamente con KSHV (Staskus 1997; Sun 1999). Esta observación es consistente con un rol para los genes latentes en el mantenimiento de fenotipo maligno en las células ahusadas infectadas con KSHV y otro rol para los genes líticos, expresados en células productivamente infectadas, en la promoción de la angiogénesis parácrina y la proliferación de las células ahusadas mediante la liberación de citoquinas (Bais 2003).

Sin embargo, pareciera que las infecciones por KSHV canónicamente latentes o líticas no son altamente oncogénicas. Esto es sugerido por la baja incidencia de KS en la población general seropositiva para KSHV, por la baja eficiencia de transformación de células endoteliales o progenitoras *in vitro* y por

recientes experimentos que muestran que la infección latente no lleva a transformación en células endoteliales (Lagunoff 2002).

Por esto, cuestiones aún más críticas surgen acerca de como la infección con KSHV progresivamente lleva un establecimiento de lesiones angioproliferativas y transformación de células endoteliales. Existen muchas dificultades que impiden el total conocimiento de la patogénesis viral por KSHV: no existen suficientes observaciones de la biología de KSHV en los pasos tempranos de KS, no se conocen exactamente los patrones de expresión génica de KSHV durante los distintos estadios de infección de las células ahusadas y no existen aún modelos animales para poder seguir in vivo la expresión de los genes de KSHV en paralelo con la patogénesis de KS. En la ausencia de este conocimiento un modo alternativo de definir los determinantes oncogénicos del virus sería identificando genes cuya expresión acompañasen el riesgo oncogénico en células infectadas con KSHV. Esta idea sugiere que el riesgo oncogénico más alto podría ocurrir en células infectadas de novo o reactivadas durante la expresión de genes líticos tempranos y sin la capacidad de completar el ciclo productivo. Este tipo de infección abortiva ha sido documentada en infección de células HUVEC con KSHV (Vieira 2001). La probabilidad de que ocurra este tipo de infección es baja pero podría ser incrementada por situaciones en las que la reactivación de KSHV y la reinfección es incrementada, tal es el caso de SIDA, inflamación local e inmunosupresión, conocidos cofactores que dramáticamente incrementan el riesgo de KS (Gallo 1998). Es por esto que en los últimos años se han ido investigando no sólo el rol de genes latentes de KSHV sino también el de

genes líticos y en especial de aquellos genes líticos tempranos que pudiesen tener potencial patogénico como el vGPCR, K1 y vIL-6.

# **RECEPTOR VIRAL ACOPLADO A PROTEÍNA G (KSHV-ORF74)**

KSHV-ORF74 codifica para un receptor acoplado a proteína G (vGPCR) constitutivamente activo (Fig. 4) homólogo a los genes humanos CXCR2 y CXCR1 que son los receptores de las quemoquinas angiogénicas IL-8 y Gro- $\alpha$  (Cesarman 1996, Arvanitakis 1997). Este receptor puede disparar cascadas de señalización tanto en forma constitutiva e independiente de ligando (Arvanitakis 1997) como en forma activada por quemoquinas (Gershengorn 1998).

En células del linaje endotelial provenientes de lesiones de KS infectadas con KSHV el vGPCR sigue el patrón de expresión lítico (Staskus 1997; Kirshner 1999). Sin embargo ha sido propuesto como el oncogén principal de KSHV activador de angiogénesis (Bais 1998, 2003; Hayward 2003; Montaner 2003) ya que:



#### FIGURA 4. Receptor acoplado a proteína G

**a**, Estructura general de un receptor de membrana (**plasma membrane**) acoplado a proteína G (GPCR) con siete dominios intramembrana, su extremo NH<sub>2</sub> extracelular y su extremo COOH citoplasmático (**cytoplasm**); **b**, Esquema del mecanismo de acción de GPCRs en general. Cuando un estímulo (**stimulus**) se une a su receptor (**R**, **detector**); la proteína G acoplada al mismo integra la señal (**Integrator**) mediante sus subunidades (**G** $\alpha$ , **G** $\beta$  y **G** $\gamma$ ) generando guanidil-tri-fosfato (**GTP**) y así se activa un efector (**Eff**) que genera segundos mensajeros (**second messengers**). En el caso del receptor vGPCR, su estímulo son las quemoquinas IL-8 y Gro- $\alpha$ . 1- Activa en la célula huésped cascadas de señalización proliferativas e inflamatorias provocando tumorigenicidad y angiogénesis mediada por VEGF (Bais 1998; Sodhi 2000; Schwarz 2001)

2- Es el único gen codificado por KSHV capaz de producir lesiones angioproliferativas semejantes a KS en ratones (Cesarman 2000; Yang 2000; Guo 2003; Montaner 2003)

3- Inmortaliza células endoteliales humanas por activación autócrina del receptor de VEGF (Bais 2003)

Evidencias experimentales indican que vGPCR podría participar en la patogénesis de KS por estimulación parácrina de la angiogénesis y proliferación de células ahusadas y/o participar en los pasos iniciales de la transformación de células endoteliales. Estas evidencias identifican a vGPCR y las cascadas de señalización proangiogénicas activadas gracias a su efecto como blancos potenciales para prevenir y tratar KS.

Nuestro trabajo y el de nuestros colaboradores ha demostrado que la expresión de vGPCR activa la cascada de señalización de MAP quinasas mediante la activación de JNK/SAPK y p38 (Fig. 5) en células HEK293T (Bais 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que, en células endoteliales, vGPCR activa vías de señalización a través del efecto de, por lo menos, dos tipos de

subunidades G $\alpha$  de proteína G: Una vía mediada por la activación del tipo de proteína G G $\alpha$ q insensible a la toxina de *pertussis* (PTX) que lleva a la activación de la vía antiapoptótica Fosfatidil-Inositol-3-Fosfato- AKT (PI3K-AKT) y una vía sensible a PTX mediada por la activación del tipo G $\alpha$ i que lleva a la activación de NFkB (Couty 2001; Bais 2003). Estos resultados muestran la participación de vGPCR tanto en respuestas de supervivencia como en proinflamatorias, respuestas relevantes para la patobiología de KSHV en sus células blanco. Dado que NFkB es un factor de transcripción inflamatorio clave, vGPCR podría activar vías de señalización inflamatorias que llevarían a la secreción de citoquinas inflamatorias tales como IL-6, IL-1 o TNF- $\alpha$  como ha sido también demostrado (Pati 2001; Schwarz 2001; Shepard 2001) sugiriendo otro mecanismo, además de la inmortalización celular, mediante el cual vGPCR podría inducir una respuesta parácrina patogénica dada por reacción inflamatoria en los sitios donde vGPCR se expresa.



## FIGURA 5. Cascadas de señalización activadas por vGPCR

El esquema muestra las diferentes cascadas de señalización que se activan mediante la acción de vGPCR.

## MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA PATOGÉNESIS DE KS

Antes del descubrimiento de KSHV como factor etiológico de KS (Chang 1994) la mayoría de los estudios de patogénesis se habían basado en la reproducción de las lesiones tipo KS en animales y en diseñar sistemas *in vitro* en que poblaciones de células "progenitoras" eran sometidas a la acción de agentes posiblemente patogénicos (Ensoli 1992). En animales, lesiones tipo KS fueron producidas por un transgén de la proteína Tat de VIH que es un factor angiogénico detectado en lesiones de KS y que sinergiza con otros factores como bFGF en la producción de lesiones similares a KS en ratones (Ensoli 1994). También se lograron emular las lesiones por inyección subcutánea de células de KS estimuladas con citoquinas inflamatorias (Samaniego 1995).

Con la entrada en escena de KSHV surgió la nueva necesidad de desarrollar modelos animales para lograr un mejor entendimiento del rol de KSHV en la patogénesis de KS.

Dada la imposibilidad, hasta el momento, de infectar animales con este virus ecotrópico que infecta sobre todo humanos, los modelos se han ido desarrollando en base al estudio de la expresión de los diversos posibles oncogenes de KSHV. Así, nuestro laboratorio demostró en 1998 que células de fibroblasto de ratón NIH3T3 transformadas por el gen vGPCR eran capaces de desarrollar tumores en ratones inmunodeficientes (Bais 1998). Este mismo gen dio lugar al primer ensayo de un gen de KSHV en modelos de ratones

transgénicos que expresaban vGPCR en células hematopoiéticas logrando lesiones proliferativas en piel y mucosas con estimulación parácrina de la angiogénesis mediante regulación de VEGF (Yang 2000). Estos resultados fueron los primeros en evidenciar que un gen de KSHV podían inducir lesiones angioproliferativas en ratones y fueron extendidos por otro grupo que, también mediante el estudio con ratones transgénicos para vGPCR, lograron tumores de los cuales sus células que expresaban el gen podían ser transplantadas en otros animales y generar nuevos tumores (Guo 2003). Ese mismo año se desarrolló otro modelo de ratones transgénicos para el receptor retroviral aviar TVA (capaz de infectar específicamente células endoteliales con virus de leucosis aviar que expresasen genes individuales de KSHV) (Montaner 2003). Con este modelo se demostró que solamente bajo la expresión de vGPCR y no la de otros genes líticos como K8, vIRF1 y ORF50 o incluso genes latentes como LANA, vFLIP, vCiclina, kaposina, se lograba la formación de tumores vasculares.

A pesar de los avances logrados con ratones transgénicos para vGPCR o estudios de genes individuales en animales, los mecanismos que determinan la progresión de la patogénesis por KSHV *in vivo* no ha sido aún dilucidados. No existe todavía un modelo animal o celular infectable por KSHV que pueda reproducir la etipatiogenia *in vivo*. KSHV ha demostrado ser poco transformante al infectar células en cultivos y muy baja la eficiencia de infección. Otro problema es que la mayoría de los genes sospechosos de ser transformantes son genes líticos y sólo se transcriben en una subpoblación de células en las lesiones de KS (Cesarman 2000). A todo esto se suma la incógnita de cuál es

el verdadero precursor de las células ahusadas y por lo tanto el candidato de infección que corresponde abordar para el diseño de modelos animales.

# INFLAMACIÓN Y CICLOOXIGENASA-2

La inflamación es la reacción fisiológica del organismo cuando este es invadido por agentes infecciosos, estimulado antigénicamente o por lesiones físicas. Como respuesta a estos estímulos se observa un aumento del aporte sanguíneo en la zona afectada y un incremento de la permeabilidad vascular, inducida entre otros factores por prostaglandinas, permitiendo que las células inmunocompetentes (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) lleguen al sitio inflamado. El control de las reacciones inflamatorias está mediado en parte por citoquinas que además son importantes para la señalización intracelular (Bley 1998).

La ciclooxigenasa (COX) es la primera enzima en el camino por el cual el ácido araquidónico se convierte en prostaglandinas (Fig. 6) (Vane y Botting 1991) entre otro eicosanoides, estas ya se han nombrado como importantes mediadores de la inflamación en el párrafo anterior, siendo la principal la prostaglandina  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>).



## FIGURA 6. COX es la enzima clave en la producción de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico

El esquema muestra la cascada enzimática para la producción de los distintos eicosanoides. La ramificación de la ruta cíclica del ácido araquidónico conduce a la formación de prostaglandinas, prostacilinas y tromboxano.

Los fosfolípidos de membrana se hidrolizan en la unión éster sn-2 por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ante un estímulo que aumente el influjo de Ca++. Así se libera ácido araquidónico (AA) que es sustrato de COX. La fosfolipasa C, mediante otro mecanismo, también produce la liberación de AA. La síntesis de prostaglandinas se lleva a cabo en forma escalonada, mediante un complejo ubicuo de enzimas microsomales. La primera enzima de esta vía de síntesis es la prostaglandina endoperóxido sintasa, también llamada ácido

graso ciclooxigenasa (COX). La enzima tiene dos actividades precisas: una actividad endoperóxido sintasa que oxigena y cicla el ácido graso precursor no esterificado (araquinodato) para formar la PGG (endoperóxido cíclico), y una actividad peroxidasa que convierte PGG en PGH (Hamberg 1974). Los endoperóxidos son químicamente inestables, se convierten en una variedad de productos incluyendo PGE entre otros mediante distintas prostaglandinas sintasas e isomerasas. También son productos los tromboxanos y prostaciclinas (Fig. 6).

Existen dos isoformas conocidas de COX: una isoforma constitutiva, COX-1, la cual es importante en funciones fisiológicas como el mantenimiento de la mucosa gástrica; y una isoforma inducible, COX-2, la cual es inducida en células inflamatorias como monocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células tumorales (O'Banion 1992; Endo 1995).

COX-2 juega un papel importante en la producción de prostaglandinas en los sitios de inflamación, siendo su principal producto PGE<sub>2</sub>. Los estímulos que inducen COX-2 incluyen citoquinas, factores de crecimiento y promotores tumorales (Maisonpierre 1992) (Fig. 7).

La asociación entre inflamación crónica y la posibilidad de desarrollar neoplasias se conoce desde hace años y como fue discutido anteriormente pueden cumplir un rol crucial en la patogénesis de KS.

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (LZW).

# FIGURA 7. Estructura tridimensional de Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

El esquema representa la estructura terciaria de COX-2 con detalles de sus estructuras secundarias.

Tanto la inflamación como el desarrollo tumoral dependen de una adecuada vascularización, siendo entonces la angiogénesis un evento fundamental para la progresión tumoral donde distintos factores convergen en forma interdependiente y donde la reacción inflamatoria contribuye a la cascada angiogénica (Agustin 1998).

Ciclooxigenasa-2 es un blanco antiinflamatorio que a su vez ha sido implicado en la activación de la angiogénesis tumoral (Tsujii 1998, Masferrer 2000) y se expresa constitutivamente en algunas células cancerosas (Soslow 2000, Zweifel 2002). Sin embargo, hasta el día de hoy, no ha sido directamente relacionado con el Sarcoma de Kaposi.

Previamente se había demostrado que otros herpesvirus como MHV68 y EBV pueden regular la actividad de COX-2 (Murono 2001; Sun 2001) mediante algunos de sus productos. Notablemente, la inducción de COX-2 se encuentra en el camino de cascadas de señalización tales como MAPK y NFkB, cascadas que pueden ser activadas por vGPCR. La actividad de COX-2 puede ser inhibida por antiinflamatorios no esteroides (AINEs) de prescripción médica, tales como Celecoxib (*Celebrex*®), que inhiben selectivamente esta isoforma sin afectar las funciones fisiológicas reguladas por COX-1. Esto hace de COX-2 un blanco atractivo para terapias antiangiogénicas y el estudio del rol de COX-2 en la patogénesis de KS en general y de la señalización de vGPCR en particular resultaría interesante como punto de partida para comenzar a definir blancos anti-vías de señalización inducidas por este oncogén.

# **OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL Y ALCANCES**

vGPCR es el primer oncogén, propuesto en nuestro laboratorio, capaz de activar y mantener un fenotipo angiogénico y de proveer una línea celular endotelial humana inmortalizada y un modelo molecular para la regulación de la angiogénesis tumoral. A pesar de los avances a nivel molecular y celular no existe aún un modelo animal infectable por KSHV que pueda reproducir la etipatiogenia *in vivo*. Dentro de las limitaciones se encuentra que no se conocen tumores similares en animales. Por otro lado existen limitaciones metodológicas para la infección de células en cultivo, donde las infecciones son de baja eficiencia y los ensayos con mutantes y recombinantes se ven limitados.

Siguiendo con la hipótesis de que vGPCR podría estar involucrado en la patogénesis del SK por estimulacion parácrina de la angiogénesis y proliferación de celulas ahusadas, los Estudios moleculares de las vías de señalización activadas por vGPCR y la evolución de modelos *in vivo* para el estudio de la etiopatogenia viral del Sarcoma de Kaposi son necesarios y completarían eslabones importantes en el conocimiento de la enfermedad.

# **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

-Determinar los mecanismos de regulación de angiogénesis en un modelo animal por vGPCR

-Analizar las consecuencias de la expresión de vGPCR en células blanco de la infección viral y en la regulación de factores angiogénicos

-Dilucidar nuevas vías de señalización activadas por vGPCR en general e investigar el rol de COX-2 en la patogénesis de vGPCR en particular.

-Establecer una línea celular conteniendo el genoma de KSHV para el estudio de la patogenia de SK *in vivo* y el rol de vGPCR en patogénesis viral.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# CÉLULAS, ANIMALES, PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

#### Células:

-NIH3T3 transfectadas con vGPCR, RasV12 o vector (Bais 1998) fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM + 10% FBS + P/S 1%. + G418 (*Sigma*)

-mEC obtenidas a partir de médula ósea de ratones Balb/C An Ncr-un cepa nude (*NCI*, Bethesda, Maryland). Brevemente, se extrajeron por lavado por inyección de PBS en los fémures de dos ratones y se incubaron en medio DMEM enriquecido con 30% FBS, Factor de crecimiento endotelial (EGF) 0,2 mg/ ml (*Sigma*), Suplemento de factor de crecimiento endotelial (ECGS) 0,2 mg/ ml (*Sigma*), Heparina 1,2 mg/ I (Sigma), Insulina transferrina selenium (*Gibco*), P/S 1% (*Gibco*) y Vitamina BME (*VWR*) en placas de cultivo de 30 mm cubiertos con gelatina. A las 4 horas el medio fue aspirado, se lavaron las células adheridas 2 veces con PBS y se incubaron en el medio ON, se repitió el lavado y asi siguió el cultivo de las células que se adhirieron. Fueron transfectadas con Bac36-KSHV o vector y una vez seleccionadas con Hygromicina fueron transfectadas con pSilencer-2.1-U6 neo vGPCR o vector y seleccionadas doblemente con Higromicina + G418 (*Sigma*).

Cultivadas en una incubadora a 37 °C y a una presión de CO<sub>2</sub> del 5%.

# Ratones:

-Machos Balb/C An NCr-nu cepa nude (*NCI*, Bethesda, Maryland) de al menos 8 semanas.

-Machos SCID/NOD cepa ICRSC-M (Taconic) de 12 semanas.

Mantenidos bajo condiciones estériles en las facilidades del RARC del Weill Medical College y tratados bajo protocolos aprobados por el comité de ética y uso de animales de laboratorio de la institución.

Drogas:

-NS398 (40 mM) (*Sigma*) -PD98059 (20 mM) y SB220025 (600 nM) (*Calbiochem*) -Celecoxib/ SC58215 (Celebrex®) (*Pharmacia, Pfizer Inc*)

TRANSFECCIONES

Vectores y constructos:

-pCEFL / pCEFL-vGPCR: El vector vacío y el vector conteniendo el inserto con la secuencia para vGPCR se encuentran clonados y caracterizados en nuestro laboratorio y son de uso corriente (Bais 1998).

-Bac36/ Bac36-KSHV: El vector vació pMHGP y el vector conteniendo el inserto con el genoma de KSHV en Cromosoma Artificial de Bacteria fueron donados gentilmente por el laboratorio del Dr. Gao (Zhou 2002).

-pSilencer 2.1-U6 neo/ pSilencer 2.1-U6 neo vGPCR: El vector vacío y las secuencias sentido y antisentido de oligonucleótidos siRNA para silenciar la expresión de vGPCR fueron obtenidos de *Ambion* a partir de las herramientas de construcción de su sitio web www.ambion.com/techlib/misc/siRNA design.html. Las secuencias elegidas fueron:

5-

GATCCCATGTTCTTGGAAATGGATTTTCAAGAGAAATCCATTTCCAAGAACA TTTTTTTGGAAA-3

5-

AGCTTTTCCAAAAAATGTTCTTGGAAATGGATTTCTCTTGAAAATCCATTTC CAAGAACATGG-3 con sitios de restricción para BamH I y Hind III y se clonaron en el vector correspondiente siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### Transfecciones:

Todas las transfecciones se realizaron con Lipofectamina 2000 (*Gibco*) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, el día anterior a la transfección se plaquearon 120.000 células por placa de 30 mm, al alcanzar el 60% de confluencia se mezclaron 100  $\mu$ l de medio Optimem con 2  $\mu$ g del ADN a transfectar. Se preparó una solución con 100  $\mu$ l de medio Optimem con 6  $\mu$ l de lipofectamina. Se mezclaron las dos soluciones y luego de 15 minutos se agregaron 800  $\mu$ l de medio completo para cada tipo celular. Luego de dos lavados con PBS de las células en cultivo se les agregó la preparación anterior durante 2 horas. Luego la preparación se reemplazó por medio completo y al día siguiente se determinó la eficacia de transfeccíon por detección EGFP.

#### ENZIMO INMUNO ENSAYO PARA PGE<sub>2</sub> (EIA)

El Enzimo Inmuno Ensayo para la detección de PGE<sub>2</sub> (actividad enzimática de COX-2) (*Cayman*) fue realizado siguiendo las indicaciones de las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron privadas de suero durante toda

la noche (ON) con la adición de los diferentes inhibidores. La síntesis de PGE<sub>2</sub> fue medida en presencia de Araquinodato de Sodio (*Sigma*) luego de 15 minutos de acumulación.

#### WESTERN BLOTS (WB)

Las células fueron lavadas en Buffer Fosfato Salino (PBS) frío y lisadas en buffer Triton/ NP40 (0.5% TritonX-100, 0.5% NP-40, 10 mM Tris [ph 7.5], 2.5 mM KCl, 150 mM NaCl, 30 mM beta-glicerofosfato, cóctel inhibidor de proteasas (*Sigma*). Los lisados celulares fueron agitados por 30 min a 4 °C y centrifugados a 10,000 x g a 4 °C por 10 min. Los sobrenadantes fueron evaluados para la determinación de su concentración proteica por el método de Bradford (*BioRad*) y ensayados como lisados celulares. Cantidades equivalentes de proteínas fueron resueltas en un gel PAGE-SDS 7.5% Tris-HCl por 45 min y transferidas a membranas PVDF, luego se incubaron con anticuerpo (AC) anti-ratón COX-2 monoclonal (*Cayman*) ON y se revelarori con el sistema anti-ratón IgG peroxidasa (*ICN*) y ECL kit (*Amersham*).

#### **RT-PCR SEMICUANTITATIVA**

El ARN fue extraído con el sistema RNA-Bee (*Tel-Test Inc.*) luego de la incubación ON con los inhibidores en medio privado de suero. El ARN fue amplificado mediante el sistema "SuperScript one-step RT-PCR" (*Invitrogen*) utilizando los siguientes primers (*Invitrogen*):

-COX-2 murina:

5'-GAGTCCATGTTCCAGGAGGA-3'

5'-CCCCCACAGTCAAAGACACT-3'

-vGPCR:

5'-CGCTGCACTGTTAATTGCAT-3

5'-GTCGCCTTAGCAGAGTGTCC-3

-LANA:

5'-TCCTCCTCATCATCCTTATT-3

5'-GCCTACATCTCCCATCTCCA-3

Los productos de la amplificación a 20, 25 y 30 ciclos fueron resueltos en un gel de agarosa al 1.9%. La intensidad de los productos de la amplificación a 30 ciclos fue analizada densitométricamente usando el programa NIH Image 1.62.

# ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS INDUCIDA POR CÉLULAS TUMORALES (TIA)

3x10<sup>-5</sup> células (dos sitios de inoculación por ratón), tratadas o no con NS398 durante 1hora previa a la inoculación, fueron inoculadas intradérmicamente (I.D.) en la parrilla costal de ratones inmunodeprimidos Balb/C nude. Azul Trypan fue utilizado para evaluar la viabilidad celular y reconocer el sitio de inoculación. Los ratones fueron sacrificados 5 días post-inoculación. El área de inoculación fue fotografiada y examinada bajo microscopio de disección. Luego se realizó el análisis morfométrico de área de inoculación y la determinación por conteo manual del número de vasos siguiendo el criterio de Auerbach (Monte 1997, Davel 2002). Este protocolo ha sido aprobado por el Comité de Revisión Institucional.

## ENSAYO DE CRECIMIENTO TUMORAL

Ratones inmunodeprimidos Balb/C fueron inoculados intraperitonealmente (I.P.) con Celecoxib 10 mg/kg o vehículo (DMSO). Luego, el mismo día, fueron inoculados subcutáneamente (S.C.) con las células transformadas por vGPCR (3x10<sup>-5</sup> por ratón). Los ratones fueron tratados tres veces por semana con Celecoxib (5 mg/kg) o vehículo I.P. (Sheng 1997). El crecimiento tumoral fue

seguido con mediciones del volumen con calibre hasta el día de sacrificio. Los tumores no se han dejado crecer más allá de un volumen de 3000 mm3. Este protocolo ha sido aprobado por el Comité de Revisión Institucional.

# **ENSAYO DE METÁSTASIS**

Ratones SCID/NOD fueron irradiados (350 rad) y luego de tres horas fueron inoculados endovenosamente (IV) con células mEC o mECK36 (2x10<sup>-6</sup> por ratón). Luego de un seguimiento continuo, a los tres meses post-inoculación cuando comenzaron a mostrar síntomas de distrés: disnea, pelo hirsuto, encorvamiento, etc., fueron sacrificados y se les realizó necropsia y análisis histopatológico.

## ELISA PARA VEGF

-Las muestras de tumores fueron pesadas y homogenizadas en buffer TBS 0.1% BSA + cóctel inhibidor de proteasas (*Sigma*) en un volumen directamente proporcional a su peso.

-Los cultivos celulares fueron privados de suero ON, 3 o 5 días tratados o no con NS398.

Los sobrenadantes fueron ensayados luego de una centrifugación a 2.000 x g por 5 min. La reacción de ELISA con anti-ratón VEGF (*R&D*) fue performada siguiendo las instrucciones del fabricante.

## INMUNOHISTOQUÍMICA PARA COX-2, CD31, CD34, KDR, LANA

Los tejidos tumorales una vez extraídos fueron inmediatamente sumergidos en solución de sacarosa 30% en PBS y al día siguiente fueron incubados durante 1 hora en OCT: sacarosa30% (1:1), congelados en matríz OCT por inmersión en nitrógeno líquido. Secciones congeladas de 8 mm de los tumores fueron fijadas acetona sometidas а una inmunomarcación en V con inmunoperoxidasas siguiendo métodos estándares de Inmunohistoquímica. Brevemente, luego del blogueo de los sitios inespecíficos y de las peroxidasas intrínsecas, las muestras fueron incubadas ON con anti COX-2 de ratón hecho en rata (Santa Cruz) CD31/ CD34/ KDR de ratón hecho en rata (Pharmingen) o isotipo control. Luego de 30 min. de incubación con anti-rata IgG hecho en cabra (Pharmingen), fueron reveladas usando el sistema "Elite-Vectastain ABCperoxidase" (Vector) por 30 min. y sustrato DAB (Vector). Las muestras fueron contracoloreadas con hematoxilina y luego del montaje definitivo fueron

fotografiadas utilizando microscopio equipado con cámara digital (*Olympus*). En el caso de LANA se realizó un desenmascaramiento antigénico antes del bloqueo con la solución de recuperación antigénica DAKO (*Cytramed*) y se detectó con el anticuerpo monoclonal para LNA-1 ORF73 de ratón hecho en rata y se prosiguió como en los otros casos. En todas las inmunohistoquímicas la dilución de los anticuerpos primarios fue 1:1000 en PBS.

# INMUNOHISTOQUÍMICA PARA α-SMA

Las secciones congeladas de 8 mm de los tumores fueron fijadas en acetona y sometidas a una inmunomarcación con inmunoperoxidasas siguiendo métodos estándares de Inmunohistoquímica. Brevemente, luego del bloqueo de los sitios inespecíficos y de las peroxidasas intrínsecas, las muestras fueron incubadas 30 min. con un anticuerpo monoclonal anti α-SMA de ratón hecho en ratón (*Sigma*) o diluyente como control, 10 min con el sistema *M.O.M. anti mouse-IgG* (ratón en ratón) (*Vector*) y fueron reveladas usando el sistema "*Elite*-Vectastain ABC-peroxidase" (*Vector*) por 30 min. y sustrato DAB (*Vector*). Las muestras fueron contracoloreadas con hematoxilina y luego del montaje definitivo fueron fotografiadas utilizando microscopio equipado con cámara digital (*Olympus*).

## **INMUNOFLUORESCENCIA PARA LANA Y K8.1**

Las células fueron cultivadas en portaobjetos gelatinizados y luego de ser lavadas con PBS se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 min. a TA. Se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0,2% TritonX en PBS 30 min. TA, se lavaron en solución de Glicina 100 mM y se incubaron en 10% FBS en PBS 20 min. a TA. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti LANA hecho en rata 1:1000 o anti K8.1 hecho en ratón 1:3000) (*ABI*) durante 1 hora a 37°C, luego fueron lavadas con PBS e incubadas otra hora con el anticuerpo secundario (anti IgG de rata o anti IgG de ratón respectivamente conjugado con Rodamina 1:100) (*Calbiochem*). Luego de ser lavadas fueron incubadas con DAPI 0,5 µg/ ml en agua por 5 min., lavadas y montadas con glicerol 50% en PBS.

# HIBRIDIZACIÓN IN SITU PARA LANA

Las sondas para el ARN de LANA se obtuvieron a partir de los primers :

5'-TCCTCCTCATCATCCTTATT-3'

5'-GCCTACATCTCCCATCTCCA-3'

utilizando el kit de transferasa terminal (Roche) siguiendo las especificaciones del fabricante y marcándolas con digoxina. Las células fueron cultivadas en portaobjetos gelatinizados y luego de ser lavadas con PBS se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 min. a TA. Se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0,2% TritonX en PBS 5 min. a 4 °C. Luego fueron lavadas en PBS 3 veces y con 2xSSC 1 vez. El procedimiento de hibridización se llevó a cabo según ha sido descripto anteriormente (Jiménez-García 1993). Brevemente, las sondas fueron desnaturalizadas calentándose en formamida deionizada por 10 min. a 90 °C, transfiriéndose a agua congelada. Luego se le agregó buffer de hibridización para una concentración final de 10% p/v dextransulfato/ 2xSSC/ 1 mg/ml E. coli tRNA y 10 ng/µl sonda. Esta mezcla de hibrididzación fue incubada con las células ON en cámara húmeda a 37 °C. Luego de un lavado en 2xSSC/50% formamida 37 °C, un lavado en 2xSCC a TA y otro en 1xSSC a TA de 30 min. c/u, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti digoxina unido a Rhodamina (Jackson) 60 min. en cámara húmeda oscura a TA. Luego de 3 lavados con 4xSSC la muestras fueron montadas con agente fluorescente antifading (Molecular Probes).

# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el Test de Student para las determinaciones estadísticas. Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

#### RESULTADOS

#### **PRIMERA PARTE:**

Estudios moleculares de las vías de señalización inducidas por vGPCR y la inhibición de su patogenicidad por antiinflamatorios no esteroideos que inhiben la actividad de Ciclooxigenasa-2.

## vGPCR REGULA LA ACTIVIDAD CICLOOXIGENASA-2

Nuestro grupo había demostrado previamente que células transformadas por vGPCR eran angiogénicas y tumorigénicas (Bais 1998). Dado que vGPCR puede estimular cascadas de señalización inflamatorias estudiamos si vGPCR podía regular Ciclooxigenasa-2 (COX-2). Para estudiar si vGPCR podía regular la actividad de COX-2 comparamos la producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en células NIH3T3 transformadas o no por vGPCR. Utilizamos un enzimoinmunoensayo (EIA) para medir PGE<sub>2</sub> en los sobrenadantes de dos clones de NIH3T3 transformados con vGPCR. Ensayamos también, como controles positivos, NIH3T3 transformadas o no RasV12 o estimuladas con PMA. Encontramos que la producción de PGE<sub>2</sub> era hasta seis veces más alta en las células transformadas por vGPCR que en los controles e incluso superando los

niveles de los controles positivos (Fig. 8). NS398, un inhibidor específico de COX-2 bloqueó la actividad sintetizadora de PGE<sub>2</sub> indicando que ésta es mediada por COX-2. Para determinar si la señalización inducida por vGPCR estaba directamente involucrada en el incremento de la actividad COX-2 incubamos las células con el agonista de vGPCR, Gro- $\alpha$ . Encontramos que la estimulación de vGPCR por Gro- $\alpha$  favorecía aún más la producción de PGE<sub>2</sub> en las células que expresaban vGPCR. Estos resultados muestran que vGPCR estimula la actividad de COX-2 en células NIH3T3.



#### FIGURA 8. vGPCR regula la actividad COX-2 en células NIH3T3 cells.

Células NIH3T3 (barras blancas), NIH3T3 transformadas por vGPCR clon 1 (barras punteadas), clon 4 (barras negras) y NIH3T3 transformadas por RasV12 (barras barradas) fueron incubadas ON en medio libre de suero. El agonista de vGPCR Gro- $\alpha$ , el inhibidor COX-2 NS398, el inhibidor de ERK-1/2 MAPK PD98059 o el inhibidor de p38 SB220025 fueron adicionados a los cultivos ON según está indicado. La actividad COX-2 fue ensayada midiendo en los sobrenadantes la producción de PGE<sub>2</sub> mediante EIA.

## vGPCR ACTIVA LA EXPRESIÓN DE CICLOOXIGENASA-2

vGPCR activa en forma constitutiva cascadas de señalización que podrían regular la expresión de COX-2. Para verificar si el incremento en la actividad de COX-2 era causado por la regulación de la expresión de COX-2 mediante vGPCR investigamos la expresión de COX-2 en las células transformadas por vGPCR. Analizamos lisados celulares por immunoblotting usando un anticuerpo contra COX-2. Encontramos un aumento en los niveles de proteína COX-2 en las células transformadas por vGPCR (Fig. 9a) en correlación con la actividad de COX-2 (Fig. 8) y que dicha expresión se encontraba incrementada por el tratamiento con Gro-α. Esto indica que el señalamiento por vGPCR está directamente involucrado en la regulación de la expresión de COX-2. Dado que vGPCR presenta el potencial de activar miembros de las cascadas de la familia MAP guinasa (Bais 1998; Sodhi 2000; Schwarz 2001), analizamos si vGPCR activaba la producción de COX-2 vía p38 o MAPK ERK-1/2, dos cascadas que se conocen como reguladoras de COX-2. Encontramos que las células transformadas por vGPCR tratadas con el inhibidor de ERK-1/2, PD98059, mostraban una disminución significativa en los niveles de la actividad y la expresión proteica de COX-2 (Fig. 8 y Fig. 9a) mientras que el tratamiento con el inhibidor de p38, SB22055, no mostraba cambios significativos. Estos resultados sugieren que vGPCR regularía la expresión de COX-2 mediante ERK-1/2 pero no vía p38. Paralelamente a este trabajo, en nuestro laboratorio además se encontró que ERK-1/2 se encuentra potentemente activada por fosforilación sólo en las células transformadas por vGPCR mientras que los

niveles de fosforilación de p38 no se modifican en comparación con las células control y que la disminución en los niveles totales de ERK-1/2 en las células transformadas por vGPCR parece ser una respuesta adaptativa a la activación constitutiva de ERK (Mutlu et al 1).

Debido al hecho de que la activación de ERK-1/2 regula la transcripción génica, nosotros decidimos utilizar RT-PCR para determinar si la regulación de la expresión de COX-2 por vGPCR era a nivel de transcripción y si esta dependía de MAPK. Realizamos una RT-PCR semicuantitativa con primers de COX-2 murinos. La cuantificación densitométrica demostró que las células transformadas por vGPCR expresaban niveles superiores de ARNm de COX-2 en comparación con el control. Así también observamos que estos niveles eran disminuidos por el inhibidor de ERK-1/2 PD98059 (Fig. 9*b*). Por otro lado el inhibidor de p38 que no presentó ningún efecto sobre la expresión proteica de COX-2 tampoco mostró ningún efecto sobre los niveles de ARNm de COX-2. Todos estos resultados demuestran que vGPCR regula la expresión y actividad de COX-2 vía ERK-1/2 en células NIH3T3.

## CICLOOXIGENASA-2 REGULA LA ANGIOGENICIDAD DE vGPCR

COX-2 tiene la capacidad de regular la angiogenicidad de células tumorales (Tsujii 1998) y nuestro laboratorio había demostrado previamente que vGPCR es un activador angiogénico (Bais 1998).



#### FIGURA 9. vGPCR regula la expresión de COX-2 vía ERK-1/2

a, vGPCR regula la expression de la proteína COX-2 en células NIH3T3 vía ERK-1/2 Células NIH3T3 (barras blancas), NIH3T3 transformadas por vGPCR o por RasV12 (barras negras) fueron incubadas ON en medio libre de suero y lisadas. Las proteínas fueron separadas en geles PAGE-SDS, transferidas a membranas PVDF e incubadas con anticuerpo antiratón COX-2 monoclonal y reveladas con sistema avidina-peroxidasa. El agonista de vGPCR Gro-α, PMA, el inhibidor COX-2 NS398, el inhibidor de ERK-1/2 MAPK PD98059 o el inhibidor de p38 SB220025 fueron adicionados a los cultivos ON según está indicado b, vGPCR regula la expression de ARNm de COX-2 en células NIH3T3 vía ERK-1/2. Las células fueron recolectadas luego de incubación ON en medio libre de suero y se les extrajo su ARN. El inhibidor de ERK-1/2 PD98059 o de p38 SB220025 fueron adicionados a los medios de cultivos previo a la extracción. El cDNA fue amplificado por RT-PCR utilizando primers para COX-2 y los productos de amplificación fueron resueltos en gel de agarosa. El gráfico muestra el análisis densitométrico para las bandas específicas de COX-2 luego de 30 ciclos de amplificación en células NIH3T3 (barras blancas) o transformadas por vGPCR (barras negras). En ambos gráficos se expresan las áreas calculadas por densitometría.

En este trabajo hemos demostrado in vitro que vGPCR activa COX-2, por lo tanto el siguiente paso fue investigar si la actividad de COX-2 podría modular la angiogénesis inducida por vGPCR en células transformadas. Para esto utilizamos el ensayo de angiogénesis intradérmica TIA (Monte 1996), inoculamos un grupo de ratones inmunodeficientes con células transformadas por vGPCR y otro grupo con estas células pretratadas con el inhibidor de COX-2 NS398. Inoculamos en ratones control células no transformadas tratadas o no con el inhibidor. Los ratones inoculados con las células transformadas (Fig. 10a) desarrollaron neovasculatura intrincada y mostraron mayor densidad vascular en los puntos de inoculación que los controles de NIH3T3 tratados o no con NS398 (Fig. 10c y d) los cuales sólo presentaron en sus dermis vasos maduros y rectos. Similarmente a los controles negativos las células transformadas por vGPCR pretratadas con NS398 no indujeron proliferación microvascular en los sitios de inoculación (Fig. 10b). La cuantificación morfométrica de la respuesta angiogénica mostró un aumento significativo en la densidad vascular determinada en la dermis del grupo invectado con células transformadas por vGPCR (Fig. 10e) (P<0.05). En cambio, la densidad vascular en el grupo inoculado con células transformadas por vGPCR pretratadas con NS398 no mostró diferencias significativas con los controles inoculados con NIH3T3 no transformadas (Fig. 10b, c y d). Esto indica que el tratamiento de las células que expresan vGPCR con NS398 antes de la inoculación evita la respuesta angiogénica inducida por la expresión de vGPCR (P<0.01), sugiriendo que la actividad COX-2 contribuye a la angiogénesis in vivo mediada por la señalización de vGPCR en células NIH3T3.





## FIGURA 10. COX-2 media la angiogenicidad de vGPCR in vivo

Células tratados o no con NS398 fueron inoculadas I.D. en ambos flancos de ratones nude (n=5). Los ratones fueron sacrificados luego de 5 días y el área de inoculación fue fotografiada bajo microscopio de disección. *a*, Apariencia de los sitios de inoculación en la dermis de los ratones inoculados con células NIH3T3 transformadas por vGPCR *b*, con NIH3T3 transformadas por vGPCR *p* retratadas con NS398 *c*, con NIH3T3-vector o *d*, con NIH3T3-vector pretratadas con NS398. *e*, Análisis morfométrico mostrando la media de la en las dermis de los ratones inoculados con células pre-tratadas con NS398 (barras negras) o sin pre-tratar (barras blancas) (\*) Indica diferencias significativas entre los grupos inoculados con células transformadas por vGPCR pretratadas o no (P<0.01). (#) Indica diferencias significativas entre los grupos inoculados con células por vGPCR o no (P<0.05).
#### CICLOOXIGENASA-2 MEDIA LA TUMORIGÉNESIS INDUCIDA POR vGPCR

La angiogénesis es un paso fundamental para la progresión tumoral dado que que el crecimiento tumoral y la metástasis son dependientes de la formación de nuevos vasos. Nuestros resultados mostraron que COX-2 regula la angiogenicidad de vGPCR (Fig. 10). Para analizar la contribución de la angiogenesis mediada por COX-2 en la tumorigénesis inducida por vGPCR (Bais 1998), investigamos el efecto del tratamiento con el AINE Celecoxib (SC58215) en ratones portadores de tumores inducidos por vGPCR. Inoculamos subcutaneamente (S.C.) ratones inmunodeficientes con células transformadas por vGPCR. Tratamos un grupo con Celecoxib intraperitoneal (I.P.) tres veces por semana y otro grupo control con el vehículo (DMSO). Así pudimos observar que Celecoxib producía un retardo consistente en la aparición de los tumores y una disminución significativa en el crecimiento tumoral (Fig. 11a, b, c y d) (P<0.05). El análisis histológico mostró que los tumores estaban compuesto de células ahusadas pleomórficas (Fig. 11e, f, g y h). El grupo no tratado mostraba grandes áreas de hemorragia y necrosis, atribuibles al gran tamaño de los tumores y al desvasamiento sanguíneo (Fig. 11e y g). El grupo tratado con Celecoxib no mostraba necrosis en los tumores y presentaba sólo hemorragia marginal (Fig. 11fyh).

Estos resultados indican que COX-2 contribuye al crecimiento de los tumores inducido por vGPCR y que el tratamiento de los ratones con Celecoxib fue efectivo para reducir el crecimiento tumoral.



## FIGURA 11. La tumorigenicidad de las células transformadas por vGPCR disminuye ante el tratamiento con Celecoxib

Ratones nude (n=7) fueron inoculados S.C. con células NIH3T3 transformadas por vGPCR y tratados con el inhibidor de COX-2 Celecoxib I.P. o vehículo (DMSO) tres veces por semana. **a**, Imagen de ratón tratado (panel inferior) o no (panel superior) con Celecoxib a 15 días de tratamiento. **b & c**, Tumor de ratón no tratado (b) o tratado con Celecoxib (c). **d**, El gráfico muestra el crecimiento de los tumores durante el tiempo de tratamiento (volumen/ días) en los ratones tratados con Celecoxib (negro) o vehículo (blanco). El volumen tumoral significativamente menor en todos los días medidos (P<0.05). **e**, **f**, **g & h**, Secciones tumorales teñidas con Hematoxilina-Eosina para el exámen histológico provenientes de ratones tratados (f y h) o no (e y g) con Celecoxib a 20x (e y f) o 40x (g y h) de aumento.

## LOS TUMORES INDUCIDOS POR vGPCR EXPRESAN CICLOOXIGENASA-2

Para confirmar que el crecimiento de los tumores inducidos por las células que expresan vGPCR dependía de la expresión de COX-2 llevamos a cabo una inmunomarcación por peroxidasas de COX-2. Encontramos que los tumores provenientes de ratones inoculados con las células NIH3T3 que expresaban vGPCR presentaban una alta expresión de COX-2 (Fig. 12). Este resultado indica que Ciclooxigenasa-2 se expresa en los tumores inducidos por vGPCR.

Este resultado además correlaciona con el hecho de que lesiones de KS expresan COX-2 principalmente en células ahusadas que expresan genes de KSHV, dato que fue obtenido paralelamente a este trabajo en colaboración con el grupo de la Dra. E. Cesarman (Mutlu et at 1).



В

Para ver esta película, debe disponer de QuickTime™ y de un descompresor TIFF (LZW).

FIGURA 12. Los tumores inducidos por vGPCR expresan COX-2 a, Marcaje por immunoperoxidasas para COX-2 se llevo a cabo en secciones tumorales de ratones portadores de tumores inducidos por vGPCR b, isotipo control.

### LA CICLOOXIGENASA-2 MODULA LA ANGIOGÉNESIS TUMORAL Y LA PRODUCCIÓN DE VEGF EN LOS TUMORES INDUCIDOS POR vGPCR

Para evaluar si los efectos antitumorales debidos a la inhibición de COX-2 estaban relacionados con la inhibición de la angiogénesis tumoral (como propusimos más arriba) cuantificamos la vascularización intratumoral por inmunomarcación. Utilizamos CD31/PECAM, un marcador panendotelial, para marcar los vasos intratumorales y utilizamos Actina de Músculo Liso- $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) para marcar los vasos vasculares maduros cubiertos de pericitos (Benjamín 1999). El tratamiento con Celecoxib produjo una reducción significativa tanto en la cantidad de vasos totales (CD31+) como en la cantidad de vasos maduros ( $\alpha$ -SMA+) (Fig. 13), indicando que la inhibición de COX-2 compromete la angiogenicidad tumoral inducida por vGPCR. El análisis estadístico de los datos de la cuantificación de la inmunomarcación (Fig. 13e y f) indicó un detrimento estadísticamente significante en la cantidad de vasos totales CD31+ (163 +/- 29 vs 73 +/- 21) (P<0.001) y vasos maduros SMA+ (185 +/- 63 vs 64 +/- 40) (P<0.01) en los tumores provenientes de los animales tratados con Celecoxib. Estos resultados muestran que el tratamiento de los ratones con Celecoxib redujo el número total de vasos intratumorales e inhibió su maduración, indicando que la actividad enzimática de COX-2 contribuye a la angiogenicidad tumoral inducida por vGPCR.



## FIGURA 13. El Tratamiento con Celecoxib inhibe la angiogénesis tumoral inducida por vGPCR

Marcaje por immunoperoxidasas para CD31/PECAM o  $\alpha$ -SMA se llevó a cabo en secciones tumorales. **a** & **b**, Inmunohistoquímica para CD31/PECAM en animales tratados (b) o no (a) con Celecoxib. **c** & **d**, Inmunohistoquímica para  $\alpha$ SMA en animales tratados (d) o no (c) con Celecoxib. Las flechas indican ejemplos de vasos maduros (CD31+/ $\alpha$ SMA+). **e** & **f**, Distribución de los datos del marcaje en *box-plots* mostrando los resultados de la cuantificación morfométrica para CD31/PECAM (e) (*P*<0.001) y  $\alpha$ SMA (f) (*P*<0.01) (*n*=7). La media aritmética está representada por la cruz (+) dentro de las cajas. La mediana está representada por la línea media que cruza horizontalmente las cajas por dentro ( \_\_\_\_\_\_). Las líneas superiores e inferiores horizontales que limitan las cajas representan segundo y cuarto cuartil. Las líneas verticales comprenden el rango.

Dado que nuestros resultados in vivo indican que la inhibición de COX-2 afecta la angiogenicidad de vGPCR (Fig. 10) y su tumorigenicidad (Fig. 11) y sabiendo que la secreción de VEGF es esencial para la angiogénesis tumoral inducida por vGPCR, medimos el efecto de la inhibición de COX-2 sobre la secreción de VEGF tanto en los sobrenadantes de las células que expresan vGPCR como en los tumores generados por estas células. Encontramos que como se esperaba (Bais 1998) las células NIH3T3 transformadas por vGPCR secretaban concentraciones de VEGF mucho más altas que los controles. Sin embargo al tratarlas por períodos de 3 ó 5 días con NS398 los niveles de producción de VEGF disminuyeron hasta niveles similares a los controles. Esto sugeriría que la actividad de COX-2 inducida por vGPCR podría estar involucrada en la sobreexpresión de VEGF en células NIH3T3 (Fig. 14a). Asimismo, los tumores de los animales tratados con Celecoxib mostraron niveles de VEGF significativamente más bajos por unidad de masa tumoral que los tumores provenientes de animales no tratados (Fig. 14b) (P<0.001). Considerados en forma conjunta, estos resultados sugieren que la inhibición de angiogénesis en los tumores se debe entre otras causas a la inhibición de la secreción de VEGF por las células transformadas debida a la inhibición de COX-2.



### FIGURA 14. La inhibición de COX-2 afeta la producción de VEGF in vitro e in vivo

**a**, Células NIH3T3 transformadas con vGPCR fueron incubadas ON, 3 días o 5 días según se indica en medio libre de suero tratadas (barras blancas) o no (barras negras) con NS398 y la producción de VEGF fue determinada en los sobrenadantes mediante ELISA (pg/ ml). **b**, Muestras tumorales de los ratones ensayados para tumorigénesis fueron homogeneizadas y centrifugadas y la producción de VEGF fue determinada en los sobrenadantes mediante ELISA, tanto en ratones tratados con Celecoxib (SC58215) (barra gris) como en los controles de DMSO (barra blanca). El gráfico muestra la media de cada grupo y los valores individuales de las determinaciones (círculos negros) (*P*<0.001) (*n*=7).

#### **SEGUNDA PARTE:**

Creación y caracterización de un nuevo modelo animal para Sarcoma de Kaposi

### GENERACIÓN DE CÉLULAS DE LINAJE ENDOTELIAL MURINA CONTENIENDO EL GENOMA COMPLETO DE KSHV

Los intentos previos por testear tumorigénesis en ratones inmunodeprimidos por células endoteliales transformadas con KSHV han fracasado por la debilidad de los modelos xenográficos en ratones. El problema para crear un modelo alográfico es que KSHV es un virus ecotrópico y es difícil la infección de células endoteliales murinas con este virus.

Por otro lado, el hecho de que células ahusadas de KS expresasen marcadores de linajes endoteliales ha llevado al desarrollo de modelos que utilizan células endoteliales como progenitores de KS (Flore 1998; Moses 1999; Ciufo 200; Lagunoff 2002; Hong 2004; Wang 2004). Estos modelos se encuentran limitados por la imposibilidad de mostrar angiogenicidad aguda y tumorigenicidad que caracterizan las lesiones de KS por células ahusadas infectadas con KSHV. Esto contrasta con la demostrada habilidad de genes individuales de KSHV tales como ORF K1, ORF K12, vIRF, vGPCR y vIL-6 para inducir respuestas patogénicas del tipo KS cuando se expresan *in vitro* y

en animales (Bais 1998; Lee 1998; Muralidhar 1998; Aoki 1999; Yang 2000; Montaner 2003, Bais 2003). Posibles explicaciones para la imposibilidad de la reproducción de fenotipos KS en los modelos experimentales de infección por KSHV puede incluir las tendencias tanto a latencia viral como productividad de los cultivos establecidos y la utilización de linajes endoteliales diferenciados como blanco de infección. Dado que KS es multifocal y las células ahusadas expresan el marcador de *stem cells* CD34 se ha sugerido que las células progenitoras de KS podrían ser células circulantes del linaje endotelial hematopoiético, definiendo asi un blanco alternativo para la infección patogénica por KSHV (Browning 1994; Boshoff 2002; Barozzi 2003).

Por las razones expresadas y para superar estas barreras decidimos usar transfeccion del DNA viral completo sobre preparaciones de médula ósea enriquecida en precursores endoteliales (mEC). Estos cultivos presentan linajes de células candidatos para progenitores de KS (Boshoff 2002) incluyendo células endoteliales, sus progenitores y otras células hematopoiéticas proangiogénicas.

Para crear un modelo que pudiese ser genéticamente analizado y para facilitar la generación de células infectadas establemente utilizamos un cromosoma artificial de bacteria (Bac36) que codifica todo el genoma infeccioso de KSHV en el contexto de un vector resistente a Higromicina y que expresa la proteína verde EGFP para facilitar su seguimiento (Fig. 15). Este vector fue gentilmente cedido por el laboratorio del Dr. Gao y su generación se encuentra completamente caracterizada y testeada (Zhuo 2002).



0

.

FIGURA 15. Esquema del constructo conteniendo el genoma de KSHV Cromosoma artificial de bacteria codificando para el esqueleto infeccioso de KSHV en un vector resistente a Higromicina con expresión de EGFP (Bac36) (Zhuo 2002).

Encontramos que en contraste con las células transfectadas con el vector que formaban monocapas similares a cultivos de estroma, las mEC transfectadas con Bac36-KSHV generaban células EGFP+ con un fenotipo ahusado que crecían sin inhibición por contacto y formando focos de transformación. Llamamos a las células mECK36.

### CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS mECK36

Para evaluar si la población EGFP+ (Fig.16*b*) resistente a Higromicina estaba infectada por KSHV determinamos por inmunofluorescencia la expresión proteica de genes de KSHV. Observamos que las células transfectadas con Bac36 expresaban el gen nuclear latente LANA de KSHV en forma homogénea (Fig. 16*c* y *d*) y algunas coexpresaban simultáneamente el gen lítico K8.1 (Fig. 16*e* y *f*). Las células marcadas con LANA mostraron el típico patrón de punteado nuclear que suele obtenerse en inmunofluorescencia de LANA. Este patrón es producido por la concentración de LANA en zonas donde los episomas de KSHV se enlazan a los cromosomas del huésped. El patrón punteado es característico de la distribución del genoma episomal de KSHV en células y tejidos infectados (Ballestas 1999).

Confirmamos la transcripción de LANA en las mECK36 llevando a cabo hibridización *in situ* de ARN de LANA en este nuevo tipo celular y observamos que a diferencia de las mEC que no expresaban LANA, las células mECK36 presentaban hibridización positiva para el gen LANA de KSHV en su citoplasma (Fig. 16*g* y *h*).



## FIGURA16. Las células mEC transfectadas con Bac36 expresan los genes de KSHV, LANA y K8.1

Células mECK36 fueron marcadas por inmunofluorescencia para proteínas características de KSHV *a*, tinción nuclear con DAPI *b*, células transfectadas EGFP+ *c*, células mECK36 inmunomarcadas para LANA *d*, detalle de inmunomarcación para LANA con Cye3 (rojo) en convergencia con DAPI nuclear (azul) *e*, Mismas células que en *d* inmunomarcadas para K8.1 con Cye5 (infrarrojo) en convergengencia con DAPI (azul) *f*, convergencia de LANA-Cye3 (azul) con K8-Cye 5 (rojo) y EGFP (verde). En *g y h*, se llevó a cabo hibridización *in situ* para ARN de LANA en células mEC (*g*) y mECK36 (*h*) revelado con anticuerpo anti-digoxina Cye3 (rojo) en convergencia con EGFP (verde).

Los resultados de las inmunofluorescencias indicando la expresión de genes de KSHV fueron confirmados por RT-PCR para LANA y vGPCR en las células mECK36. Para determinar la integridad del genoma de KSHV transfectado nuestro laboratorio realizó en colaboración con el laboratorio del Dr Dirk Dittmer un análisis global de expresión del genoma de KSHV por RT-PCR en tiempo real. El resultado mostró que esta población celular expresaba todos los genes de KSHV, expresando tanto los genes latentes como los líticos en una manera reminiscente a la inducción lítica (Mutlu et al 2).

A pesar de que mECK36 expresaba todos los genes de KHSV no hemos podido recuperar de los sobrenadantes de los cultivos viriones de KSHV ni hemos podido infectar cultivos vírgenes a partir de los sobrenadantes de cultivos de mECK38 ni observar efectos citopáticos. Incluso muestras de los cultivos fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión y luego de exhaustivas búsquedas tampoco se han podido encontrar partículas virales ya sean maduras o inmaduras. Estos resultados sugieren que en nuestras células KSHV expresa un patrón de transcripción del tipo de infección lítica abortiva caracterizado por un bloqueo de los eventos de maduración tardíos y replicación.

### LA EXPRESIÓN DE KSHV EN CÉLULAS MEC ESTIMULA LA SECRECIÓN DE VEGF E INDUCE ANGIOGÉNESIS



#### FIGURA17. Las células mEC transfectadas con KSHV son angiogénicas

**a**, La producción de VEGF fue determinada por ELISA en sobrenadantes de células mEC y mECK36 luego de incubación ON **b**, Células mEC y mECK36 fueron inoculadas I.D. en ambos flancos de ratones nude (n=5). Los ratones fueron sacrificados luego de 5 días y el área de inoculación fue fotografiada bajo microscopio de disección. El gráfico representa el análisis morfométrico mostrando la media de la densidad microvascular (vasos/ mm<sup>2</sup>) (P< 0.05) **c**, apariencia del sitio de inoculación con células control **d**, apariencia del sitio de inoculación con mECK36.

Uno de los fenotipos definitorios de KS que se atribuye a la expresión de genes de KSHV es la respuesta angiogénica. Para evaluar si la infección con KSHV inducía angiogenicidad determinamos los niveles de VEGF en los sobrenadantes de mECK36 mediante ensayo de ELISA y determinamos neoformación vascular en la piel de ratones inoculados intradérmicamente con las mECK36. Células mEC transfectadas con el vector Bac fueron utilizadas como controles.

KSHV indujo la secreción de VEGF (Fig. 17*a*) y otorgó a las mEC la habilidad de inducir angiogénesis en la piel de los ratones 5 días postinoculación (Fig 17*b*, *c* y *d*). Estos resultados indican que la infección por KSHV gatilla la secreción de VEGF y el cambio hacia el fenotipo angiogénico en células mEC.

### LAS CÉLULAS MECK36 SON TUMORIGÉNICAS EN RATONES INMUNODEFICIENTES

Para determinar si las células mECK36 angiogénicas y que resultaron ser inmortales en cultivo eran a su vez tumorigénicas en ratón, inoculamos ratones inmunodeficientes *Balb/c nude* S.C. con mECK36 utilizando mEC transfectadas con el vector como control. Observamos que las mECK36

formaron tumores en la piel de los ratones a diferencia de las mEC que no formaron ningún tumor (Fig. 18*b*). Luego de ser disectados los tumores mostraron un color verde amarillento sugestivo de la expresión de EGFP (Fig. 18*a*). De estos tumores pudimos extraer células EGFP+ que crecieron en cultivo en presencia de hygromicina, sugiriendo su infeccion con KSHV-Bac36.

Los tumores fueron analizados por el personal del servicio de histopatología quienes lo reportaron como "sarcomas de células ahusadas vascularizados", una presentación altamente reminiscente a la de las lesiones de KS.

Estos resultados indican que las células mEC transformadas mediante la infección con KSHV además de estar inmortalizadas y ser angiogénicas presentan la capacidad de generar tumores en ratones similares a los tumores humanos de KS. La relevancia de este resultado radica en la posibilidad de estudiar estos tipos de tumores en animales una vez definido el modelo.





Días

#### FIGURA 18. Las células mECK36 son tumorigénicas

Ratones nude (n=7) fueron inoculados S.C. con células mEC-vector o mECK36 y los tumores desarrollados fueron fotografiados, **a**, foto de los tumores expresando KSHV (EGFP+); **b**, gráfico mostrando el crecimiento en el tiempo de los tumores de ratones portadores de mECK36 (mECBac36) en comparación con los ratones inoculados con mEC-vector (mEC) que no generaron tumores.

### CARACTERIZACIÓN DE LOS TUMORES INDUCIDOS POR mECK36

Para comenzar a definir el modelo y determinar si al igual que las lesiones de KS las células ahusadas de los sarcomas inducidos por las mECK36 estaban infectadas con KSHV y sus genes estaban expresados, llevamos a cabo determinaciones inmunohistoquímicas de KSHV LANA. Encontramos que aproximadamente el 50% de las células tumorales expresaban LANA, un resultado muy similar al que se obtiene en lesiones humanas de KS (Fig. 19). Este resultado sugiere que las células mECK36 que indujeron tumores en los ratones estaban infectadas con KSHV.

Otra característica típica de los tumores humanos de KS es el perfil de marcadores fenotípicos que incluye antígenos como CD34 (marcador de KS y de endotelio microvascular), VEGF-R2/ flk-1/ KDR (indicador de células de KS, vasos receptivos a VEGF-angiogénicamente activos) y CD31/ PECAM (indicador de células endoteliales y progenitores observables en tumores) entre los más importantes. Para determinar si los tumores inducidos por mECK36 presentaban marcadores que correspondían con aquellos característicos de las lesiones de KS marcamos con inmunoperoxidasas CD34, VEGF-R2/ flk-1 y CD31/ PECAM en los cortes histológicos de las lesiones.



### FIGURA 19. Los tumores inducidos por mECK36 expresan LANA

La expresión del gen LANA de KSHV se determinó mediante inmunoperoxidasas en cortes histológicos de los tumores producidos por las células mEC-Bac36; *a*, control negativo; *b*, tumor LANA+.



## FIGURA 20. Los tumores desarrollados por mECK36 expresan CD31/PECAM, flk-1/ KDR y CD34

La expresión de los genes **b**, CD31/PECAM; **c**, VEGF-R2/ flk-1/ KDR y **d**, CD34 se llevó a cabo mediante inmunoperoxidasas en cortes histológicos de los tumores producidos por las células mEC-Bac36; **a**, control negativo.

Observamos la presencia de estos tres marcadores en gran proporción correspondiendo con lesiones altamente vascularizadas (CD31) compuestas en su mayoría por vasos angiogénicos (VEGF-R2/ flk-1) y células tumorales tipo KS CD34+ (Fig. 20). Esta presentación fenotípica exhibida por los tumores inducidos por las células mECK36 por inoculación subcutánea en ratones es semejante a la que se encuentra en biopsias de KS humanos.

### LAS CÉLULAS MECK36 GENERAN LESIONES MULTIFOCALES DEL TIPO DE KS EN LOS PULMONES DE RATONES SCID/ NOD

En sus estadios más avanzados KS puede presentarse como un cáncer invasivo involucrando vísceras como pulmones y el tracto gastrointestinal. Para determinar si mECK36 podían inducir además lesiones viscerales del tipo de KS las inoculamos intravenosamente (I.V.) en ratones inmunodeficientes SCID/ NOD previamente irradiados. A tres meses de la inoculación encontramos que las células habían inducido lesiones del tipo metastásicas multifocales en pulmón caracterizadas como sarcomas de células ahusadas reminiscentes de KS visceral avanzado (de 9 a 20 focos en los pulmones) (Fig. 21). Estos resultados indican que las células mECK36 combinan la expresión de todo el genoma de KSHV con características angiogénicas, tumorigénicas e invasivas típicas del fenotipo de KS y definen a nuestro modelo apropiado para reproducir características de KS en ratones.



FIGURA 21. mECK36 producen lesiones multifocales tipo KS en pulmón Ratones SCID/ NOD fueron irradiados y luego inoculados con mECK36 o control IV. A los 3 meses fueron sacrificados y los inoculados con mECK36 mostraban en sus pulmones *a*, lesiones macroscópicas multifocales EGFP+. *b y c*, detalle microscópico de las lesiones tipo KS obtenidas de los pulmones a 20X (*b*) y 40X (*c*).

# ROL DE VGPCR EN LA PATOGÉNESIS VIRAL INDUCIDA POR KSHV EN mEC

Los resultados obtenidos con este nuevo modelo sugieren que podría ser una herramienta valiosa para el estudio y la definición de la biología de KSHV y sus genes. Pero a pesar que el fenotipo de mECK36 es consecuencia de la expresión de KSHV y consistente con el fenotipo propuesto para KSHV en KS, las células son transformadas y representan un perfil genético seleccionado con manipulación génica. Por lo tanto es necesario demostrar la dependencia entre la expresión de genes de KSHV y el fenotipo patogénico mostrado. Una forma de demostrarlo sería poniendo en evidencia la relación entre un gen de KSHV y el fenotipo patogénico.

Dados los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en modelos de transfección con el gen vGPCR que han demostrado su capacidad angiogénica y tumorigénica cuando se lo expresó como único oncogén (Bais 1998, Bais 2003) decidimos investigar si su expresión estaría relacionada con el fenotipo angiogénico y tumorigénico de las mECK36, ya que tanto las células como los tumores mostraron la expresión de vGPCR junto con la de los otros genes de KSHV. Para esto primero intentamos transfectar células mEC con mutantes de Bac36-KSHV negativas para vGPCR donadas por S-J Gao, pero luego de varios intentos no fue posible obtener poblaciones viables transfectadas con esta mutante. Por lo tanto decidimos abordar la supresión de la expresión de vGPCR a partir de otro enfoque y diseñamos siRNA para silenciar la expresión

génica de nuestro gen y para que sirviese como punto de partida de la posible manipulación genética sobre el sistema mEC – KSHVBac36. La tecnología de siRNA o ARN de interferencia (ARNi) se basa en la degradación de un ARNm específico mediante la expresión de pequeñas moléculas complementarias de su ARN (Elbashir 2001). La expresión de siRNA puede reducir durante semanas y hasta meses la expresión de su ARNm blanco, sobre todo si se expresa el siRNA establemente.

Para expresar establemente los siRNA, células mECK36 fueron transfectadas con un plásmido resistente a neomicina que expresa una horquilla de siRNA para vGPCR (siRNA-vGPCR) bajo el control de un promotor para la ARN polimerasa III. Las células cotransfectadas con el plásmido control de siRNA fueron utilizadas como control. Encontramos que la expresión de siRNA específicamente reducía la expresión de vGPCR sin alterar la expresión de LANA (Fig. 22*a*) mediante RT-PCR. Esto fue confirmado por análisis global de las transcripción de KSHV por RT-PCR en tiempo real llevados a cabo en paralelo en colaboración con Dr. Dittmer (Mutlu et al 2).

Para determinar si la supresión de la expresión de vGPCR modificaba el fenotipo transformado y angiogénico mostrado por mECK36 medimos el crecimiento en cultivo, la producción de VEGF en los cultivos mediante ELISA y la capacidad angiogénica en las dermis de ratones inmunodeficientes.



## FIGURA 22. La inhibición de la expresión de vGPCR disminuye la angiogenicidad de mECK36

*a*, La inhibición de la expresión de vGPCR mediante siRNA fue determinada por RT-PCR; *b*, Células mEC vector, mECK36, mECK36 inhibidas en la expresión de vGPCR (mECK36 + siRNA-vGPCR) y mECK36 + el control de siRNA fueron incubadas ON en medio libre de suero y la producción de VEGF fue determinada en los sobrenadantes mediante ELISA; *c*, células mECK36 + control siRNA y mECK36 + siRNA-vGPCR fueron inoculadas, I.D. en ambos flancos de ratones nude (*n*=5). Los ratones fueron sacrificados luego de 5 días y el área de inoculación fue fotografiada bajo microscopio de disección. El análisis morfométrico muestra la media de la densidad microvascular (vasos/ mm<sup>2</sup>) \*(*P*< 0.05). Observamos que la supresión de vGPCR por expresión de siRNAvGPCR no alteró el crecimiento de las mECK36 pero suprimió su habilidad para secretar VEGF (Fig. 22*b*) y redujo significativamente su habilidad para inducir neoformación vascular en las dermis de los ratones (Fig. 22*c*) (*P*<0.05). Estos resultados indican que vGPCR juega un papel no redundante en la activación angiogénica en el contexto de infección por KSHV.

Dado que el desarrollo tumoral es dependiente de angiogénesis y las células mECK36 forman sarcomas vascularizados, el efecto del bloqueo en la secreción de VEGF por siRNA-vGPCR podría afectar la angiogénesis y por ende la tumorigénesis.

Para evaluar el efecto de la inhibición de la expresión de vGPCR en el crecimiento tumoral llevamos a cabo un ensayo de tumorigénesis con las células mECK36 cotransfectadas con el siRNA-vGPCR utilizando mECK36 cotransfectadas con el siRNA control como control positivo de tumorigenicidad.

A diferencia de las mECK36 transfectadas con el siRNA control, que mostraron la misma tumorigenicidad de las células mECK36 parentales, las mECK36 transfectadas por siRNA-vGPCR no mostraron un crecimiento tumoral que superase los 4 mm<sup>3</sup> (Fig. 23).



....



vGPCR-siRNA

ctrl siRNA

## FIGURA 23. La inhibición de la expresión de vGPCR disminuye la capacidad tumorigénica de mECK36

Células mECK36 siRNA-vGPCR inhibidas en la expresión de vGPCR (círculos blancos y paneles de la izquierda) y mECK36 siRNA control (círculos negros y paneles de la izquierda) fueron inoculadas S.C. en el flanco de ratones nude (n=10). El gráfico muestra el crecimiento en el tiempo de los tumores (P<0.001). Los paneles muestran el aspecto morfológico de los tumores EGFP+.

El hecho de que estos tumores sean fluorescentes indica que las células siguen estando vivas a 45 días de la inoculación. Dado que como pudimos observar en cultivo las celulas mECK36 transfectadas con siRNA-vGPCR células crecen igual que las transfectadas con siRNA control, este resultado sugiere que las supresión de vGPCR por siRNA en las mECK36 cotransfectadas afecta la capacidad de las células para vascularizarse y generar tumores, generando en cambio "tumores durmientes".

Este resultado indica que la tumorigénesis de mECK36 es dependiente de la expresión de vGPCR y relaciona la expresión de un gen de KSHV con el fenotipo patogénico en el contexto de infección con KSHV. Además, estos resultados muestran que es posible manejar nuestro modelo genéticamente para estudiar la patogenicidad de KSHV y sus genes y apunta una vez más hacia vGPCR como determinante patogénico de KSHV.

### LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE vGPCR REDUCE LA CAPACIDAD DE KSHV DE ESTIMULAR LA ACTIVIDAD DE COX-2

El último punto de nuestra investigación se centró en trasladar los conocimientos adquiridos para vGPCR a el nuevo modelo desarrollado en mECK36. Ya definido el rol angiogénico y tumorigénico de vGPCR mediante la inhibición de su expresión por siRNA quisimos usar este sistema para

investigar si en el contexto de infeccion con KSHV, vGPCR regula la actividad de COX-2.





Células mEC-vector, mECK36 tratadas o no con los inhibidores NS398 o PD98059, meCK36-vector siRNA y mECK36 siRNA-vGPCR inhibidas en la expresión de vGPCR fueron incubadas ON en medio libre de suero y la producción de PGE<sub>2</sub> (pg/ ml) fue determinada mediante EIA.

Para esto realizamos un enzimoinmunoensayo para PGE<sub>2</sub> donde primero observamos que las células mECK36 mucho mas PGE<sub>2</sub> que las células mEC

indicando el incremento en la actividad COX-2 debida a la presencia de KSHV.

Pudimos también comprobar que tal como observamos en la Figura 8, el

tratamiento con NS-398 o PD98059 disminuyo significativamente la producción

de PGE<sub>2</sub>. Lo mismo pudo observarse al silenciar la expresión de vGPCR mediante siRNA, mientras que las mECK36 con el vector control de siRNA no mostraban cambios significativos comparada con las celulas parentales (Fig. 24). Así, este resultado completa las observaciones de la activación de COX-2 por vGPCR y refuerza la idea de los alcances de nuestro nuevo modelo y del modelo de NIH3T3 utilizado en la primera parte.

Todos estos resultados convergen a señalar el rol de vGCPR en la etiopatogenia viral por KSHV y la importancia del control de las vías de señalización que vGPCR dispara para el contexto patogénico de KS.

### DISCUSIÓN

La primera parte de este trabajó se focalizó en el estudio de los mecanismos moleculares de patogénesis del sarcoma de Kaposi mediados por el oncogén vGPCR.

La identificación de nuevos blancos basada en la patogénesis ha ido cambiando la manera en que nuevas drogas son diseñadas. En el caso de KS, el descubrimiento de KSHV y la identificación de vGPCR como su oncogén angiogénico sugirieron el primer blanco molecular y varios blancos dentro de la cascada de señalización de vGPCR para KSHV y KS. A partir de esta premisa hemos identificado a COX-2 como nuevo blanco dentro de la cascada de señalización que lleva a la angiogénesis que pueden inhibirse con drogas de prescripción como Celecoxib.

Este descubrimiento es importante dado que aún no se conocen terapias aprobadas que actúen inhibiendo vGPCR directamente y es por eso que interesa encontrar terapias que actúen sobre la cascada de señalización inducida por este oncogén. En este sentido COX-2 proveería un blanco de fácil tratamiento. Por otro lado, tratamientos quimioterapéuticos que afecten el crecimiento de células de KS son todavía difíciles de tolerar, especialmente por pacientes inmunodeprimidos y/o en estados avanzados de KS (Kedes 1997; Antman 2000; Toschi 2002) mientras que el uso de AINEs es universalmente

aceptado. En particular, los AINEs específicos para COX-2 muestran mejor tolerancia y menos efectos colaterales.

La sobreexpresión de COX-2 ha sido documentada en varios tipos tumorales (Williams 2000; Muller-Decker 2002; Sales 2002) donde se comprobó su participación en angiogénesis (Tsujii 1998; Masferrer 2000). En este trabajo hemos utilizado un modelo en células NIH3T3 que mostró como la alteración oncogénica por expresión de vGPCR pudo activar COX-2 como evento dentro del cambio al fenotipo angiogénico. Ya se demostró que COX-2 juega un rol en la replicación y carcinogenicidad (Mockarsi 2002; Zhu 2002) de citomegalovirus (CMV); así como en la angiogenicidad del carcinoma nasofaringéo inducido por el gen LMP-1 del virus Epstein Barr (EBV) (Murono 2001). Nuestros resultados mostrando que el gen lítico temprano de KSHV, vGPCR, activa COX-2, sugieren que esta enzima podría jugar un papel en la patobiología de KSHV y por lo tanto en la progresión de KS.

El modelo en células NIH3T3 ha resultado especialmente útil para el estudio de las cascadas de señalización por vGPCR (Bais 1998). En este trabajo ha sido la herramienta utilizada para los estudios de la regulación de la patogenicidad de vGPCR por COX-2. La principal ventaja del modelo es que es una línea fibroblástica de ratón fácilmente manipulable y transfectable. Otra ventaja es que la línea resulta ser eficaz para los estudios de angiogénesis y tumorigénesis en animales. Esto es importante dado que existen otras líneas celulares como la de células endoteliales humanas HUVEC que si bien son eficaces para estudios *in vitro* no fueron capaces de reproducir los efectos

patogénicos en ratones. Las células NIH3T3 presentan la limitación de no ser representativas de los blanco fisiológicos de infección con KSHV generalmente aceptados tales como las células endoteliales y linfocitos B. Sin embargo, actualmente no se conoce completamente el origen de las células ahusadas y aunque se sospecha más de linajes endoteliales células mesenquimales como los fibroblastos no están del todo descartados como posible blanco para KSHV.

En nuestro modelo encontramos que la actividad de COX-2 juega un papel esencial en la angiogénesis intradérmica como así también en la intratumoral inducida por vGPCR. Dado que vGPCR es altamente homólogo al receptor CXCR2 de las quemoquinas angiogénicas IL-8 y Gro- $\alpha$ , este resultado sugiere que COX-2 podría ser uno de los eslabones entre la señalización por receptores de quemoquinas y la regulación angiogénica.

Es conocida la capacidad de COX-2 de regular la proliferación angiogénica a nivel de las células endoteliales (Jones 1999; Leahy 2002). En nuestro trabajo existen varias evidencias que sugieren que la regulación de la angiogénesis *in vivo* mediante la regulación de la actividad de COX-2 operaría directamente en células transformadas por vGPCR.

En el modelo de angiogénesis intradérmica son las células las que son tratadas con los inhibidores y no los animales portadores de esas células. Por lo tanto resulta útil para evaluar los efectos de los inhibidores en la potencialidad angiogénica de las células transformadas por vGPCR sin inhibir las células del huésped (que incluirían a las endoteliales). Por otro lado, este

modelo presenta la ventaja de imitar las condiciones fisiológicas en que la acción de vGPCR dispararía una respuesta angiogénica dado que las células se inoculan en la dermis, sitio de crecimiento de las células que infectadas con KSHV expresarían este oncogén.

La contribución de la angiogénesis mediada por COX-2 a la tumorigenicidad y angiogenicidad de vGPCR fue a su vez recalcada por la inhibición de crecimiento tumoral debido al tratamiento de los animales con Celecoxib, mostrando un decrecimiento en la formación de neovasculatura intratumoral a la vez que se observó en los tumores una disminución de la producción de VEGF. En este ensayo observamos reducción en el tamaño de los tumores frente al tratamiento con Celecoxib a lo largo de todos los días de tratamiento. El modelo resultó eficaz para observar la tendencia de crecimiento y analizar los cambios histológicos así como fue útil para obtener muestras que nos permitieron realizar ensayos de citoquinas e inmunohistoquímica. La limitación principal de este ensavo es no poder hacer un seguimiento a largo plazo dado que una vez que los tumores alcanzan el tamaño máximo permitido compatible con condiciones dignas de vida para los ratones es necesario sacrificarlos y en el caso de las células transformadas por vGPCR los tumores que generan presentan un crecimiento rápido con inminentes ulceraciones lo cual impide continuar el tratamiento en el tiempo más allá de los 2 cm<sup>3</sup> de volumen. Otra limitación es que el tratamiento es sistémico y por lo tanto no permite discernir sobre si el efecto de Celecoxib es por inhibición de COX-2 expresada en células tumorales transformadas por vGPCR, en células del estroma o en células endoteliales. Otra limitación de este experimento es la

posibilidad que Celecoxib ejerza efectos sobre las células tumorales que no son estrictamente dependientes de su efecto inhibitorio de COX-2. Existen ciertas evidencias de que Celecoxib podría también actuar mediante vías apoptóticas independientes de COX-2 en pulmón (Sánchez-Alcazar 2003). Sin embargo, el hecho que un inhibidor mucho más específico de COX-2 como el NS398 inhiba la respuesta angiogénica por parte de las células transformadas con vGPCR (Fig. 10) sustenta la posibilidad que la inhibición de la angiogénesis observada en los tumores provenientes de ratones tratados con Celecoxib estubiese debida a la inhibición de la contribución de COX-2 a las vías de señalización de vGPCR que activan angiogénesis.

La disminución de la secreción de VEGF causada *in vitro* por NS398 y en los tumores por Celecoxib sugiere que COX-2 y sus mediadores podrían ser parte de un componente inflamatorio gatillado por vGPCR que llevaría a la activación de la secreción de VEGF y a la respuesta angiogénica. La relación entre prostaglandinas y VEGF es conocida desde hace un tiempo (Fujii 1997). El hecho que COX-2 regule la expresión de VEGF sugiere un mecanismo autócrino y parácrino a través del cual la unión de las prostaglandinas secretadas a su receptor afectarían la expresión de VEGF. Esta posibilidad es consistente con la existencia de mecanismos angiogénicos parácrinos muy potentes gatillados por vGPCR que no pueden explicarse sólo por secreción directa de VEGF (Yang 2000).

El hecho de mostrar que la respuesta angiogénica de vGPCR es mediada, al menos en parte, por la activación de COX-2 provee el primer

indicio de que COX-2 podría estar involucrado en la iniciación y progresión de KS. Los intentos actuales de intervenir la oncogénesis de KS mediada por KSHV están limitados al uso de inhibidores de la polimerasa de ADN viral tales como Ganciclovir (Kedes 1997; Antman 2000; Toschi 2002). La identificación de determinantes oncogénicos de KSHV y sus aliados moleculares en las células huésped proveen de nuevos blancos y oportunidades terapéuticas. Si bien este modelo se limita a los efectos de la expresión de vGPCR en la activación de COX-2, los resultados obtenidos son un incentivo para continuar con nuevos estudios acerca del papel de COX-2 en el contexto de KS. Nuestro laboratorio ha demostrado, en colaboración con el laboratorio de la Dra Cesarman, la expresión de COX-2 en lesiones humanas de KS (Mutlu et al 1) y en la segunda parte de este trabajo hemos observado *in vitro* como células expresando el genoma completo de KSHV secretaron grandes cantidades de PGE<sub>2</sub> lo que sugiere que nuestros resultados serían relevantes a la infección con KSHV y a las lesiones humanas de KS.

Los resultados mostrados en este trabajo probando que la inhibición de COX-2 bloquea la angiogénesis y tumorigénesis inducida por el oncogén vGPCR constituyen un punto de partida para estudiar el impacto de la inhibición de COX-2 en la patogenicidad de vGPCR. En conjunto con los resultados que muestran que las células infectadas con KSHV en las lesiones sobreexpresan COX-2 (Mutlu et al 1) identifican a COX-2 como un posible blanco para la prevención y tratamiento de la oncogénesis liderada por KSHV. La quimioprevención en poblaciones de riesgo para KS es un tema delicado debido sobretodo a que muchos pacientes suelen estar inmunodeprimidos y/o
recibiendo otros tratamientos que limitan la capacidad de asimilación por parte de su organismo. Otros tipos de drogas antiinflamatorias como los glucocorticoides no pueden ser indicados en estos pacientes por sus efectos inmunosupresivos. Inhibidores inespecíficos de COX también resultarían contraproducentes ya que debilitarían aún más una mucosa gastrointestinal expuesta posiblemente a quimioterápicos y/o antivirales sistémicos. Las drogas que se administren a estas poblaciones en el futuro deben ser lo suficientemente seguras y probada su eficiencia para la prevención y tratamiento de KS. Nuestros resultados sugieren la posibilidad de comenzar a utilizar inhibidores específicos de COX-2 clinicamente probados de alta tolerancia como Celebrex® en la quimioprevención y el tratamiento de KS.

En la segunda parte del trabajo desarrollamos un nuevo modelo animal para el estudio de la patogénesis mediada por KSHV. A partir de células progenitoras de células endoteliales transfectadas con KSHV logramos lesiones tipo KS en ratones.

La generación de una célula progenitora endotelial portadora de todo el genoma de KSHV que reproduce las características patogénicas de KS es un paso fundamental para el delineamiento de modelos celulares y animales para el estudio de KS. En este trabajo describimos las características de este nuevo modelo mostrando:

1- Que el genoma de KSHV es angiogénico, tumorigénico y metastásico en células del linaje hematopoiético endotelial, lo que sugiere que estos tipos celulares serían un posible blanco de KSHV y un posible progenitor de células ahusadas de KS. El método con el que se abordó la transfección nos permitió identificar un tipo celular susceptible de ser infectado por KSHV dentro del grupo de tipos de células endoteliales que se encuentran en médula ósea. Si bien esto no nos permite identificar inequívocamente la célula blanco de KSHV las determinaciones fenotípicas llevadas a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr Rafii determinaron que las células infectadas expresan VEcaderina, VEGF-R1 y SCA1 lo que indicaría que se trata de linajes hematopoieticos/ endoteliales usualmente denominadas "células hematopoieticas pro-angiogénicas" (Rafii 2003). Como consecuencia de la transfección con Bac36-KSHV en estas células de linajes hematopoiéticos endoteliales normales (mEC) obtuvimos una población que expresa todos los genes líticos y latentes que semeja un patrón de expresión lítico abortivo que resultó poseer características patogénicas típicas de KS.

2- Que los tumores generados a partir de la inoculación de células conteniendo el genoma de KSHV son sarcomas de células ahusadas y expresan los marcadores fenotípicos de KS. Esto indica que las lesiones conseguidas son cercanas fenotípica, fisiológica y molecularmente a las lesiones de KS en humanos. Esto apuntaría a este modelo como una herramienta valiosa en el

seguimiento de la biología de KSHV y en la experimentación de intervenciones anti-KSHV y anti-KS angiogénico.

3- Que las células mECK36 expresan el genoma completo de KSHV abriendo la posibilidad de su manipulación genética para el estudio de la funcionalidad de sus genes, como por ejemplo del oncogén candidato vGPCR. El patrón de expresión de KSHV fue consistente con un alto porcentaje de células expresando transcriptos líticos. A pesar que en los tumores de KS humano la mayoría de las células ahusadas se encuentran infectadas latentemente mientras la minoría expresa genes líticos, tanto las células mECK36 como los tumores generados por estas presentaron subpoblaciones con niveles de expresión lítica mayores de lo normal para este tipo de lesiones.

4- Que las células inoculadas intravenosamente crean lesiones multifocales en pulmón características KS avanzado invasivo (Safai 1985). Esto indica que el genoma de KSHV recrea en animales la fisiología completa de KS incluyendo invasividad visceral.

Para completar de caracterizar nuestro modelo incursionamos en la técnica de silenciamiento de la expresión génica utilizando siRNA. Elegimos como blanco de silenciamiento el gen vGPCR porque nuestros propios datos señalaban que podía ser responsable de fenotipos angiogénicos de mECK36. en el contexto de infección por KSHV. En las mECK36 comprobamos que la

expresión de vGPCR disminuyó en más de un 90% pero sin llegar a la inhibición total. Aunque en el futuro será necesario abordar otras formas de anular vGPCR mediante el desarrollo de modelos con mutantes u otras tecnologías, la inhibición por siRNA nos ha resultado útil para comprender los efectos de la expresión de vGPCR en el contexto de KSHV. Los datos de silenciamiento de vGPCR podrían no ser concluyentes debido a que existe la posibilidad de que se anule en parte también la expresión de K14, un homólogo al receptor de CD200 (Nicholas 2003), que se coexpresa en mensajeros bicistrónicos con vGPCR. Sin embargo nuestros datos en tumorigénesis son consistentes con la supresión de la secreción de VEGF y la reducción de la angiogenicidad y tumorigenicidad previamente adjudicados a vGPCR (Bais 1998, Bais 2003). Más aún, los estudios de expresión global del genoma de KSHV por RT-PCR en tiempo real llevados a cabo por el grupo colaborador del Dr Dirk Kittmer han mostrado que los niveles de K14 no se afectan sugiriendo que la expresión de este gen en mensajeros monocistrónicos compensaría su silenciamiento en mensajeros bicistrónicos (Mutlu et al 2). Nuestros datos sugieren que al inhibir la expresión de vGPCR en el contexto de expresión de KSHV se inhibe al menos en parte la capacidad angiogénica del virus sobre las células blanco. El hecho de que los tumores no se han podido desarrollar más allá de los 4 mm<sup>3</sup> a pesar de que las células inoculadas continuaban vivas tal como pudimos comprobar durante su disección (células fluorescentes por expresión de EGFP) sugiere que la capacidad tumorigénica de KSVH dependería de la actividad angiogénica de vGPCR y que al inhibirse la expresión de vGPCR se impediría el cambio hacia el fenotipo angiogénico necesario para la evolución y el crecimiento tumoral (Figs. 22 y 23).

Una limitación de nuestro modelo es que recrea un contexto de infección y patogénesis preponderantemente lítico, pero aún así resulta ser una buena herramienta para demostrar la relevancia de genes como vGPCR en patogénesis y para estudiar aplicaciones terapéuticas. El hecho que la población mECK36 no genere viriones infecciosos de KSHV y exprese un patrón de transcripción lítico abortivo con bloqueo de los eventos replicación es a la vez una limitación y una ventaja. Resulta una limitación debido a que muchos estudios de patogénesis por infección mediante viriones de KSHV se ven impedidos y una parte de la biología replicativa del virus no puede ser abordada por este modelo. Por otro lado es una ventaja que los cultivos no sean infectivos dado que disminuye el riesgo de contagios para los operarios y definen un modelo seguro y de manejo más fácil y económico. Pero en definitiva la ventaja principal sigue siendo que la imposibilidad del virus de completar el ciclo productivo permite el estudio de genes patogénicos líticos tempranos como el vGPCR.

Al preguntarnos por qué los intentos anteriores para obtener un modelo de KS habían fallado hasta ahora encontramos como posibles explicaciones:

1-La falta de definición en cuanto al o a los tipos celulares progenitores de las células ahusadas ha sido un impedimento a la hora de desarrollar nuevos

modelos, tanto para la creación de ratones transgénicos como para la obtención de células que contuviesen el genoma de KSHV (Yang 2000, Montaner 2003). En este trabajo nosotros utilizamos cultivos celulares a partir de médula ósea murina enriquecida con factores de crecimiento para los linajes endoteliales. Así se favoreció la presencia de tipos celulares sospechados de ser los progenitores de las células ahusadas tales como células endoteliales, progenitores endoteliales y angiocitos. Posteriormente se confirmó que nuestras células blanco presentan los marcadores característicos para líneas progenitoras de células endoteliales tales como Sca1 y VEGF-R1 a las vez que expresan otros marcadores de linajes endoteliales como VE-caderina, VEGF-R2 y VEGF-R3 (Mutlu et al 2). Por otro lado los tumores generados a partir de mECK36 expresaron marcadores fenotípicos típicos de KS tales como VEGF-R2 y R3 así como CD34. Dado que KS es multifocal y las células de tipo ahusado suelen expresar el marcador de célula madre hematopoiética CD34, ya había sido propuesto por otros autores la posibilidad de que entre las células progenitoras de KS se encontrasen células circulantes del linaje hematopoiético sugiriendo así una población alternativa para la infección patogénica por KSHV (Browning 1994; Boshoff 1995). Si bien la mera expresión de KSHV podría inducir la expresión de marcadores hematopoiéticos en las células infectadas, la presencia de estos marcadores sugieren que la población mECK36 se compone de células de linajes endoteliales que pueden ser consideradas entre células hematopoíeticas proangiogénicas (Raffi 2003). El hecho que las células mEC sean provenientes de médula ósea de ratones sanos abre también la posibilidad de nuevos ensayos de transfección en diferentes contextos tales

como *knock-outs* o *knock-outs* condicionales para establecer determinantes genéticos de patogénesis de KSHV.

2- Debido a que KSHV es un virus humano sin contrapartida en animales, la infección productiva de células animales se encuentra obstacularizada y las células humanas suelen ser difícil de transplantar en ratones para el estudio de la patogénesis de KSHV. En este sentido nuestros cultivos fueron capaces de ser transfectados con el genoma de KSHV y expresar sus genes mediante la utilización de la tecnología de Cromosomas Artificiales Bacterianos (BAC), esto permitió crear células murinas transformadas que fueron fácilmente transplantables y tumorigénicas en ratones pero no infecciosas. Posteriormente se observó que los tumores derivados de mECK36 expresaban también la totalidad del genoma de KSHV y nuestro laboratorio además confirmó la inducción de la expresión de telomerasa en correlación con la expresión del gen LANA (Mutlu et al 2; Knight 2001).

3- Otro punto que ha sido motivo de controversias desde que se conoció que KSHV era cofactor para KS (Chang 1994) es el estadio de su ciclo biológico en que KSHV es patogénico y cuales de sus genes ejercen su acción. El arraigo del paradigma de que genes líticos no tendrían capacidad para inmortalizar células ha obstacularizado estudios con genes líticos tempranos tales como vGPCR a pesar de la vasta evidencia de que este tipo de genes podrían ejercer efectos patogénicos (Bais 1998, Yang 2000, Montaner 2003, Bais 2003). Si bien aún hoy día existe cierta reticencia nuevos estudios apuntan a mostrar que los genes líticos pueden jugar un rol importante en la patogénesis (Grundhoff

2004). Los roles patogénicos de genes líticos también se han visto enmascarados debido a que normalmente en las lesiones de KS humano se suele observar una alta proporción de células infectadas en estadio latente con sólo una pequeña proporción (generalmente periférica) expresando genes líticos. Entre los roles aceptados para los genes líticos se encuentran los de ejercer efectos parácrinos sobre las poblaciones latentes y células estromales y endoteliales adyacentes; roles que en el caso de vGPCR pudieron ser comprobados (Yang 2000, Montaner 2003). Por estas razones, el desarrollo de un modelo que expresase la totalidad de los genes y pudiese ser manipulado genéticamente es fundamental para una comprensión más profunda de los efectos de KSHV y sus genes. Nuestra población celular muestra un patrón de expresión génica reminicente de inducción lítica (Mutlu et al 2). El hecho de que no ha sido posible obtener viriones infectivos de los sobrenadanes celulares sugiere la posibilidad de una selección con higromicina de células inmortalizadas por KSHV en un estadio patogénico de ciclo lítico abortivo con un bloqueo de los eventos tardíos de maduración y replicación. Entonces aunque se expresen todos los genes de KSHV si la célula huésped no provee del ambiente necesario para la síntesis de proteínas virales tardías involucradas en el ensamblaje y producción de viriones los eventos de replicación se encuentran limitados. Esto es consistente con reportes previos de infección de células de ratón con KSHV en los que virus episomales podían ser encontrados en forma circular pero no lineal (Bechtel 2003). De todas formas la controversia aún se mantiene y aunque nuestro modelo presenta la limitación de no ser infectivo brinda la posibilidad de analizar los efectos patogénicos de la mayoría de los genes de KSHV.

En este trabajo hemos demostrado por primera vez que varios efectos patogénicos de KSHV se redujeron por la inhibición específica de la expresión de vGPCR. Si bien muchas investigaciones serán necesarias tanto con este gen como con los demás genes candidatos de KSHV nuestro trabajo ofrece un modelo útil para el estudio de la patogénesis de KSHV y abre un sin número de nuevas posibilidades de experimentación en este campo de investigación.

En resumen, nuestros resultados:

1- MUESTRAN UN ROL DE COX-2 EN LA ACTIVACIÓN DE ANGIOGÉNESIS MEDIADA POR VGPCR

2- IDENTIFICAN A COX-2 COMO POSIBLE BLANCO MOLECULAR PARA PREVENIR Y TRATAR KS UTILIZANDO AINES TALES COMO CELECOXIB

3- DEFINEN UN MODELO CELULAR Y ANIMAL GENÉTICAMENTE MANIPULABLE DE KS VIRAL ÚTIL PARA EL TESTEO DE DROGAS

4- SEÑALAN A VGPCR COMO UN DETERMINANTE ANGIOGÉNICO Y ONCOGÉNICO DE KSHV DEFINIENDO A ESTE ONCOGÉN Y SUS MEDIADORES COMO POTENCIALES BLANCOS TERAPÉUTICOS.



Cup Sh Um

Dr. Enrique A. Mesri

Autora

Director

## **BIBLIOGRAFÍA**

Albini A, Paglieri I, Orengo G, Carlone S, Aluigi M, De Marchi R, et al. The betacore of human chorionic gonadotrophin inhibits growth of Kaposi's sarcoma cells and a new immortalized Kaposi's sarcoma cell line. AIDS 1997; 11: 713-21.

Antman K, Chang Y. Kaposi's sarcoma. N Engl J Med 2000;342(14):1027-38.

Aoki Y, Jaffe ES, et al. Angiogenesis and hematopoyesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encode interleukin-6. Blood 1999; 93 (12): 4034-43.

Arvanitakis L, Mesri EA, Nador RG, Said JW, Asch AS, Knowles DM, Cesarman E. Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. Blood 1996; 88(7): 2648-54

Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC, Cesarman E. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. Nature 1997; 385(6614): 347-50.

Augustin HG. Antiangiogenic tumor therapy: will it work? TiPS 1998; 216-222.

Bais C, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, Asch AS, Cesarman E, Gershengorn MC, Mesri EA and others. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. Nature 1998; 391(6662):86-9.

Bais C, Van Geelen A, Eroles P, Mutlu A, Chiozzini C, Dias S, Silverstein R, Rafii S, Mesri EA. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus G protein coupled receptor immortalizes human endothelial cell by activation of the VEGF receptor-2/KDR. Cancer Cell 2003; 3:131-143.

Ballestas ME, Chatis PA, Kaye KM. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. Science 1999; 284 (5414): 641-4.

Barozzi P, Luppi M, Facchetti F, Mecucci C, Alu M, Sarid R, Rasini V, Ravazzini L, Rossi E, Festa S, Crescenzi B, Wolf DG, Schulz TF, Torelli G. Posttransplant Kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors. Nat Med. 2003; 9(5):554-61.

Bechtel JT, Liang Y, Hvidding J, Ganem D. Host range of Kapos's sarcomaassociated herpesvirus in cultured cells. J Virol 2003; 77(11): 6474-81. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. Journal of Clinical Investigation 1999; 103(2):159-65.

Bley KR et al. The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. TIPS 1998; 19: 141-47.

Boshoff C, Schulz T, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. Nature Medicine 1995; 1: 1274-78.

Boshoff C, Endo Y, et al. Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHVencoded chemokines. Science 1997; 278 (5336): 290-4.

Boshoff C, Weiss RA. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Adv Cancer Res 1998; 75:57-86.

Brown LF, Tognazzi K, Dvorak HF and Harrist Tj. Strong expression of kinase insert domain-containing receptor, a vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor receptor in AIDS-associated Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. Am. J. Pathol. 1996; 148(4): 1065-74.

Browning PJ, Sechler JMG, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yarchoan R, Ensoli B and Gallo RC. Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human

immunodeficiency virus-1 individuals and normal controls. Blood 1994; 84: 2711-2720.

Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW and Knowles DM. Kaposi's sarcomaássociate herpes virus-like DNA sequences are present in AIDS-related body cavity B-cell lymphomas. N. Engl. J. Med. 1995; 332: 1186-91.

Cesarman E, Nador R, Aosasa K, Delsoi G, Said J and Knowles D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in non-AIDS related lymphoma ocurring in body cavities. Am. J. Pathol. 1996; 149(1): 53-7.

Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G proteincoupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. Journal of Virology 1996b;70(11):8218-23.

Cesarman E, Mesri EA, Gershengorn MC. Viral G protein-coupled receptor and Kaposi's sarcoma: a model of paracrine neoplasia? J Exp Med 2000; 191(3): 417-22.

Cornali E, Zietz C, Benelli R, Weninger W, Masiello L, Breier G, Tschchler E, Albini A and Sturzl M. Vascular endotelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. Am. J. Pathol. 1996; 149 (6): 1851-69

Couty JP, Geras-Raaka E, Weksler BB and Gershengorn MC. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor signals through múltiple pathways in endothelial cells. J. Biol. Chem. 2001; 276 (36): 33805-11.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles D, Moore P. Identification of Herpesvirus-Like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's Sarcoma. Science 1994;266:1865-1869.

Cheng EH, Nicholas J, Bellows DS, Hayward GS, Guo HG, Reitz MS and Hardwick JM. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits aposptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997; 94 (2): 690-4.

Davel L, D'Agostino A, Español A, Jasnis MA, Lauria de Cidre L, de Lustig ES, Sales ME. Nitric oxide synthase-cyclooxygenase interactions are involved in tumor cell angiogenesis and migration. Journal of Biol Regul Homeost Agents 2002; 16(3):181-189.

Dupin N, Gorin I, Deleuze J, Agut H, Huraux J and Escande J. N. Engl. J. Med. 1995; 333: 798-99.

Dupin N, Grandalam M, Calvez V. Lancet 1995b; 345: 761-62.

Dupin N, Fisher C, Kellam P, Ariad S, Tulliez M, Franck N, van Marck E, Salmon D, Gorin I, Escande JP, Weiss RA, Alitalo K and Boshoff C. Distribution

of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease and primary efusión lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999; 96 (8): 4546-51.

Elbashir SM, Martinez J, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 2001; 411: 494-98.

Endo T, Ogushi F, Sone, Ogura T, Taketani Y, Hayashi Y, Ueda N, Yamamoto S. Induction of cyclooxygenase-2 is responsible for interleukin-1b-dependent prostaglandin E2 synthesis by human lung fibroblast. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995; 12: 358-365.

Ensoli B, Barillari g and Gallo RC. Cytokines and Growth Factors in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Immunol. RE. 1992; 127: 147-155.

Ensoli B, Nakamura S, Salahuddin S, Biberfeld P, Larsson L, Beaver B et al. AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells express cytokines with autocrine and paracrine growth effects. Science 1989; 243: 223-6

Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, Cafaro A, Chang HK, Brady JN and Gallo RC. Synergy between basic fibrobalst growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. Nature 1994; 371: 674-680

Ensoli B, Sturzl M. Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. Cytokine & Growth Factor Reviews 1998;9(1):63-83.

Fields B, Knipe M Howley P, et al. Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia 1996.

Flore O, Rafii S, et al. Transformation of primary human endotelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Nature 1998; 394 (6693): 588-92.

Franceschi S and Geddes M. Epidemiology of classic Kaposi's sarcoma, with special reference to mediterranean population. Tumori. 1995 Sep-Oct; 81(5):308-14

Friborg J, Kong W, et al. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. Nature 1999; 402 (6764): 889-94.

Fujii E, Irie K et al. Role of nitric oxide, protaglandins and tyrosine kinase in VEGF-induced increase in vascular permeability in mouse skin. Naunym-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.1997; 356: 475-80.

Gallo RC. The enigmas of Kaposi's sarcoma. Science 1998; 282(5395):1837-9.

Ganem D. KSHV and Kaposi's sarcoma: the end of the beginning? Cell 1998; 91(2): 157-60.

Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, Newton R, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. Nature Medicine 1996; 2 (8): 925-8.

Gao SJ, Boshoff C, et al. KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogen which inhibits the interferon signaling pathway. Oncogene 1997; 15 (16): 1979-85.

Gershengorn MC, Geras-Raaka E, Varma A and Clark-Lewis. Chemokines activate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor in mammalian cells in culture. J. Clin. Inv. 1998; 102 (8): 1469-72.

Giraldo G, Beth E, Haguenau F. Herpes-type virus particles in tissue culture of Kaposi's sarcoma from different geographic regions. J Natl Cancer Inst 1972; 49 (6): 1509-26.

Godden-Kent D, Talbot SJ, et al. The cyclin encoded by Kaposi's sarcomaassociated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. J. Virology 1997; 71 (6): 4193-8.

Grundhoff A, Ganem D. Inefficient establisment of KSHV latency suggest an additional role for continued lytic replication in Kaposi Sarcoma pathogenesis. J Clin In 2004; 113 (1): 124-36.

Guo HG, Sadowska M, Reid W, Tschachler E, Hayward GS, Reitz M. Kaposi's Sarcoma-Like Tumors in a Human Herpesvirus 8 ORF74 Transgenic Mouse. Journal of Virology 2003; 77(4): 2631-2639.

Hamberg M, Svenson J, Wakabayashi T, Samuelson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1974; 71: 345-49.

Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, Bland KI, Cobbs CS. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. Lancet 2002;360(9345):1557-63.

Hayward GS. Initiation of Kaposi's sarcoma lesions. Cancer Cell 2003;3:1-3.

Hong YK, Foreman K, Shin JW et al. Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. Nat. Genet. 2004; 36(7): 683-5.

Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y and Dong Z. p38 kinase mediates UVinduced phosphorylation of p53 protein at serine 398. J. Biol. Chem. 1999; 274 (18): 12229-35.

Jie C, Tulpule A, Zheng T, Masood R, Espina B, Gill PS. Treatment of epidemic (AIDS-related) Kaposi's sarcoma. Curr Opin Oncol 1997;9(5):433-9.

Jimenez-García L, Spector DL. Cell 1993; 73: 47-59.

Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing.[comment]. Nature Medicine 1999; 5(12):1418-23.

Kaposi M. Arch. Dermatol Syphillis 1872; 4, 265-273

Kedes DK, Operskalski E, busch M, Kohn R, Flood J and Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. Nature Medicine 1996; 2 (8): 918-24.

Kedes D, Ganem D. Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy. J Clin Invest 1997;99:2082-2086.

Kirschner JR, Staskus K, Haase A, Lagunoff M and Ganem D. Expression of the open reading frame 74 (G-protein-coupled receptor) gene of Kaposi's sarcoma (KS)-associated herpesvirus: implications for KS patogénesis. J. Virology 1999; 73 (7): 6006-14.

Knight JS, Cotter MA 2<sup>nd</sup>, Robertson ES. THe latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus transactivates the

telomerase reverse transcriptase promoter. J Biol Chem 2001; 276 (25): 22971-8.

Lagunoff M, Bechtel J, Venetsanakos E, Roy AM, Abbey N, Herndier B, Mc Mahon M and Ganem D. De novo infection and serial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured endotelial cells. J. Virology 2002; 76:2440-48.

Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. Cancer Research

Lee H, Veazey R, et al. Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Nature Medicine 1998; 4 (4):435-40.

Li M, Lee H, Ion DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F and Jung JU. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. J Virology 1997; 71 (3): 1984-91.

Lunardi-Iskandar Y, Gill P, Lam V, Zerman R, Michaels F, Mann D, et al. Isolation and characterization of an immortal neoplastic cell line (KS Y-1) from AIDS-associated Kaposi's sarcoma. J. Natl. Cancer Inst. 1995; 87: 974-81

Maisonpierre P et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie 2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science 1997; 277: 55-59.

Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. Cancer Research 2000;60(5):1306-11.

Masood R, Cai J, Zheng T, Smmith DL, Naidu Y and Gill PS. Vascular endotelial growth factor vascular permeability factor is an autocrine growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma. Proc. Natl Acad Sci USA 1997; 94 (3): 979-984.

McGeoch DJ, Cook S, Dolan A, Jamieson FE, Telford EA. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesvirus. J Mol Biol. 1995; 247 (3): 443-58.

Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, Knowles DM and Asch AS. Isolation of the Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) and transmisión to B-cells. Blood 1995; 86 (S1): 124.

Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett Dn, Knowles DM and Asch AS. Human herpesvirus-8/ Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmisible virus that infects B cells. J. Exp. Med. 1996; 183 (5): 2385-90.

Mesri EA. Targeting AIDS-Kaposi's sarcoma. Nature Medicine 1999;5(7):738-739.

Miles SA, Rezar AR, Salazar Gonzalez JF, Steven RH, Vander A, Medien M, Mitsuyasu RT, Taga Ta, Hirano T, Kishimoto T, et al. AIDS-Kaposi's sarcoma derived cells produce and respond to Interleukin-6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87: 4068-72

Mocarski E, Jr. Virus self-improvement through inflammation: no pain, no gain. [letter; comment.]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99(6):3362-4.

Monini P, Colombini S, Sturzl M, Goletti D, Cafaro A, Sgadari C, Butto S, Franco M, Leone P, Fais S, et al. Reactivation and persistence of human herpesvirus –8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. Blood 1999; 93 (12): 40044-58.

Montaner S, Sodhi A, Molinolo A, Bugge TH, Sawai ET, He Y, Li Y, Ray PE, Gutkind JS. Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that *vGPCR* initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. Cancer Cell 2003; 3(1):23-36.

Monte M, Davel LE, Sacerdote de Lustig E. Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. European Journal of Cancer 1997;33(4):676-682.

Moore PS, Boshoff C, Weiss RA and Chang Y. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. Science 1996; 274 (5293): 1739-44.

Moore PS and Chang Y. Deterction of Herpesvirus-like KNA sequences in Kaposi's sarcoma lesions from persons with and without HIV infection. N. Engl. J. Med. 1995; 332: 1181-85.

Muller-Decker K, Neufang G, Berger I, Neumann M, Marks F, Furstenberger G. Transgenic cyclooxygenase-2 overexpression sensitizes mouse skin for carcinogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99(19):12483-8.

Muralidhar S, Pumfery AM, et al. Identification of kaposin (open reading frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene. J Virology 1998; 72 (6): 4980-8.

Murono S, Inoue H, Tanabe T, Joab I, Yoshizaki T, Furukawa M, Pagano JS. Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(12):6905-10.

Murphy PM. Pireated genes in Kaposi's sarcoma. Nature1997; 358 (6614): 296-7, 299.

Mutlu AM, Eroles P, Hyjeks E, Chiozzini C, Cesarman E and Mesri E. Cyclooxygenase-2 mediates KSHV G protein coupled receptor angiogenesis and it is expressed in Kaposi's sarcoma. Unpublished 1 (adjunto).

Mutlu AM, Vincent Loic, Chiozzini C, Eroles P, Hooper A, Gao SJ, Dittmer D, Raffi S and Mesri EA. Human herpesvirus-8/ KSHV transforms angiogenic hematopoietic cells: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma. Unpublished 2. (adjunto)

Nair B, de Vico A, Nakamura S, copeland T, Chen Y, Patel A, et al. lentification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M. Science 1992; 255: 1430-2.

Nicholas J, Ruvolo VR, et al. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. Nature Medicine 1997; 3 (3): 287-92.

Nicholas J. Human herpesvirus-8-encoded signalling ligands and receptors. J Biomed Sci 2003; 10 (5): 475-89.

Nickoloff BJ and Griffiths CE. Am. J. Pathol. 1989; 135: 793-800.

O'Banion MK, Winn VD, Young DA. cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxigenase. Proc. Natl. Acad. JSci. USA 1992; 89: 4888-92.

Oettle AG. Geographical and racial differences in the frecuency of Kaposi's sarcoma as evidence of enviromental or genetic causes. Acta Unio Int Contra Cancrum 1962; 18: 330-363.

Pati S, Cavrois M, Guo HG, Foulke JS, Kim J, Feldman A and Reitz M. Activation of NF-kappaB by the human herpesvirus 8 chemokine receptor ORF74: evidence for a paracrine model of Kaposi's sarcoma patogénesis. J. Virology 2001; 75 (18): 8660-73.

Rabkin C, Bedi G, Musaba E, Sunkutu r, Mwanza N, Sindranski D, et al. AIDSrelated Kaposi's sarcoma is a clonal neoplasm. Clin Cancer Res 1995; 1: 257-60.

Rabkin C, Janz S, Lash A, Coleman A, Musaba E, Liotta L, et al. Monoclonal origen of multicentric Kaposi's sarcoma lesions. N. England J. Med. 1997; 336: 988-93

Radkov SA, Kellam P, et al. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcomaassociated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. Natrue Medicine 2000; 6 (10): 1121-7.

Rafii S and Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. Nat Med 2003; 9 (6): 702-12.

Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D and Ganem D. Lytic growth of Kaposi's sarcomaássociated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. Nature Medicine 1996; 2 (3): 342-6.

Risau W. Nature 1997; 386: 671-4

Russo JJ, Bohenzky RA, et al. Nucleotide séquense of the Kaposi saromaassociated herpesvirus (HHV8). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996; 93 (25): 14862-7.

Safai B, Johnson KG, Myskowski PL, Koziner B, Yang SY, Winningham-Ruddles S, Godbold JH, Dupont B. The Natural History of Kaposi's Sarcoma in Acquired Immuno Deficiency Syndrome. Ann. Int. Med. 1985;103:744-750.

Salahuddin S, Nakamura S, Biberfeld P, Kaplan M, Markham P, Lrson L, et al. Angiogenic properties of Kaposi's sarcoma-derived cells after long term culture in vitro. Science 1998; 242: 430-3

Sales KJ, Katz AA, Howard B, Soeters RP, Millar RP, Jabbour HN. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. Cancer Res 2002;62(2):424-32.

Samaniego F, Markham P, Gallo R, Ensoli B. Inflammatory cytokines induce AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells to produce and release basic fibroblast growth factor and enhance Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. J Immunol. 1995; 154: 3582-92.

Samaniego F, Markham P, Gendelman H, Gallo r, Ensoli B. Inflammatory cytokines induce endotelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lessions in the skin. J Immunol. 1997; 158: 1887-94.

Sanchez-Alcazar JA, Bradbury DA, Pang L, Knox AJ. Cyclooxygenase (COX) inhibitors induce apoptosis in non-small cell lung cancer through cyclooxygenase independent pathways. Lung Cancer. 2003; 40(1): 33-44.

Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ and Chang Y. Kaposi's sarcomaassociated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. Nature Medicine 1997; 3 (3): 293-8.

Schwarz M, Murphy PM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G proteincoupled receptor constitutively activates NF-kappa B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. J Immunol 2001; 167(1): 505-13.

Shepard LW, Yang M, Xie P, Browning DD, Voyno-Yasenetskaya T, Kozasa T and Ye RD. Constitutive activation of NF-kappa B and secretion of interleukin-8

by the G protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus involve G alpha (13) and RhoA. J. Biol. Chem. 2001; 276 (49): 45979-87.

Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. Journal of Clinical Investigation 1997; 99(9):2254-9.

Siegal B, Leventon-Kriss F, Shiffer A, Sayar J, Engelberg I, Vonsover A, et al. Kaposi's sarcoma in immunossuppresion. Posibly the result of a dual viral infection. Cancer 1990; 65: 492-8

Siriani A, Uccini S, Angeloni A, Faggioni A, cottoni F, Ensoli B. Lancet 1997; 349: 255

Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor upregulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. Cancer Res 2000; 60(17):4873-80.

Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer JL, Koki A. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. Cancer 2000;89(12):2637-2645.

Staskus KA, Zhong W, , Renne R, Beneke J, Pudney J, Anderson DJ, Ganem D and Hasse AT. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. J. Virology 1997; 71 (1): 715-9.

Sun R, Lin SF, Staskus K. Gradoville L, Grogan E, Hasse and Miller G. Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. J Virology 1999; 73 (3): 2232-42.

Taniguchi T. IRF-1 and IRF-2 as regulators of the interferon system and cell growth. Indian J Biochem Biophys 1995; 32 (5): 235-9.

Toschi E, Sgadari C, Monini P, Barillari G, Bacigalupo I, Palladino C, Baccarini S, Carlei D, Grosso G, Sirianni MC and others. Treatment of Kaposi's Sarcomaan update. Anti-Cancer Drugs 2002;13:977-987.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998;93(5):705-16.

Vane JR and Botting RM. Mediators from the endothelial cell. Adv. Prot. Thromb. Leukot. Res. 1991; 21B: 627-36.

Vieira J, O'Hearn P, Kimball L, Chandran B and Corey L. Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human citomegalovirus. J. Virology 2001; 75 (3): 1378-86.

Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Makinen T, Elliman S, Flanagan AM, Alitalo K, Boshoff C. Kaposi sarcoma herpesvirusinduced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma.Nat Genet. 2004;36(7):687-93.

Whitby D, Howard MR, et al. Detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progresión to Kaposi's sarcoma. Lancet 1995; 346: 799-802.

Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. J Clin Invest 2000;105(11):1589-94.

Yang TY, Chen SC, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, Sullivan L, Jenh CH, Narula SK, Chensue SW and others. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. J Exp Med 2000;191(3):445-54.

Zhuo FC, Zhang YJ, Deng JH, Wang XP, Pan HY, Hettler E and Gao SJ. Efficient infection by a recombinant Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cloned in a bacterial artificial chromosome: application for genetic analysis. J Virology 2002; 76 (12): 6185-96.

Zhu H, Cong JP, Yu D, Bresnahan WA, Shenk TE. Inhibition of cyclooxygenase 2 blocks human cytomegalovirus replication. [see comments.]. Proceedings of

the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99(6):3932-7.

Zur Hausen H. Viral Oncogenesis. Microbes and Malignancy: Infection as a cause of human cancers. J. Parsonnet. Oxford, Oxford University Press: 107-130.

Zweifel BS, Davis TW, Ornberg RL, Masferrer JL. Direct evidence for a role of cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 in human head and neck xenograft tumors. Cancer Research 2002;62(22):6706-11.