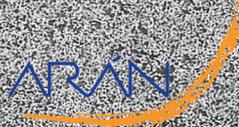
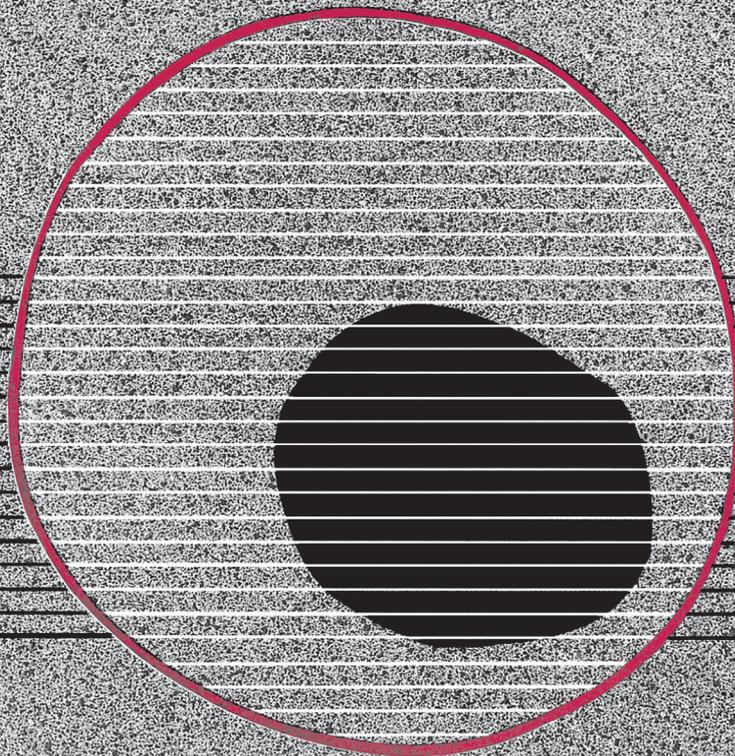


revisiones en

CANCER

ONCOGENES Y CÁNCER

VOL. 13, NÚM. 1, 1999



revisiones en

CANCER

SUMARIO

VOL. 13

NÚM. 1

Introducción a los métodos utilizados en Biología Molecular P. Iniesta	1
Terapia génica M. Izquierdo	9
Efectos moleculares de las proteínas ras L. Lucas, J. C. Lacal	16
Oncogenes nucleares C. Caelles, A. Muñoz	27
El modelo experimental de la carcinogénesis de piel de ratón. Una visión integrada del cáncer M. Quintanilla, P. Frontelo, J. F. Santibáñez, F. G. Scholl, M. García-Gallo, M. Iglesias	41

Introducción a los métodos utilizados en Biología Molecular

P. INIESTA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN

El objetivo fundamental de la Biología Molecular consiste en llegar a comprender todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos. Actualmente, son pocas las áreas de la Biología Molecular que han permanecido inalteradas con la aparición de una serie de técnicas, englobadas dentro del término genérico de Ingeniería Genética o Tecnología del ADN recombinante. Estas técnicas permiten la caracterización de los ácidos nucleicos y también proporcionan métodos para mantener en una misma unidad replicativa genes procarióticos y eucarióticos, crecer grandes cantidades de estas unidades noveles e integrar estos genes en el genoma de otro individuo (1).

Sería prácticamente imposible desarrollar con detalle, en un único capítulo, todas las herramientas metodológicas de las que dispone actualmente la Biología Molecular. Por ello y dada la naturaleza de la publicación, seguidamente se comentarán los aspectos más generales de esta metodología, haciendo especial mención de aquellas técnicas que hoy día se emplean en los laboratorios de diagnóstico molecular del cáncer.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. ASPECTOS GENERALES

Los procedimientos empleados para llevar a cabo la extracción de ADN y de ARN, aunque son similares, difieren en algunos puntos como consecuencia de la dificultad que entraña la obtención de moléculas de ARN libres de degradación. En ambos casos es necesario el empleo de agentes quelantes de iones divalentes, con objeto de inhibir la actuación de las

nucleasas degradativas; también se hace imprescindible el uso de detergentes iónicos que actúan ayudando a que se produzca la lisis de las membranas celulares, así como de enzimas proteolíticas que intervienen en la separación de los ácidos nucleicos de las proteínas a las que se encuentran unidos en el interior de las células (2,3).

En el caso de las moléculas de ARN, y debido a la presencia en los tejidos de enzimas muy activas con poder degradativo sobre este ácido nucleico, los métodos empleados para su obtención deben incluir el uso de productos que desnaturalicen las ribonucleasas (4). El aislamiento de ARNm, a partir de ARN total, se lleva a cabo por cromatografía de afinidad utilizando columnas que contienen resinas unidas a ligandos de desoxitimidilato o de uridilato que, por complementariedad de bases, se unen específicamente a las colas de poliadenilato características del extremo 3' de las moléculas de ARNm de eucariotas.

Una vez extraídos, a partir de cultivos celulares o de tejidos, tanto el ADN como el ARN se purifican, generalmente por procedimientos que incluyen extracciones con disolventes orgánicos, y se concentran por precipitación en frío utilizando alcoholes y sales de cationes monovalentes (5).

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para proceder al análisis y caracterización de los ácidos nucleicos por cualquiera de las técnicas que se considerarán a continuación, es necesario, en la mayor parte de los casos, realizar una separación de estas moléculas por procedimientos electroforéticos (6).

Los soportes empleados, en estas electroforesis, son geles de agarosa y geles de poliacrilamida. Las moléculas a separar migran, en el seno del campo

eléctrico aplicado, a una velocidad que es proporcional a la intensidad de corriente aplicada; al tamaño, carga y conformación de las moléculas objeto de estudio; y a la concentración de la sustancia empleada para llevar a cabo la separación.

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN. SU UTILIDAD EN LA TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE

El descubrimiento de las enzimas de restricción ha sido considerado como un hecho clave para el desarrollo de la Ingeniería Genética. Estas enzimas son endonucleasas específicas que forman parte del sistema de defensa de las bacterias frente a la invasión por bacteriófagos. Se caracterizan porque reconocen secuencias específicas en el ADN produciendo cortes en la doble cadena. La ruptura del ADN duplex, tras el reconocimiento de las secuencias "blanco", permite obtener fragmentos de menor tamaño y que son más fáciles de manipular para llevar a cabo los análisis de caracterización posteriores. Una de las aplicaciones más comunes de las enzimas de restricción es su uso en la elaboración de mapas físicos, también llamados *mapas de restricción*. El mapeo físico consiste simplemente en la localización sobre una molécula de ADN de los blancos de una serie de endonucleasas de restricción. La posición de los blancos es de utilidad para referenciar la posición de elementos genéticos y facilitar manipulaciones sobre la molécula de ADN (1,7-9).

Además, aprovechando la especificidad de las endonucleasas de restricción, se han desarrollado técnicas, muy empleadas en los laboratorios de diagnóstico molecular, que permiten llevar a cabo el análisis de alteraciones genéticas. Estos métodos se basan en el polimorfismo creado en la longitud de los fragmentos de restricción como consecuencia de la aparición de cualquier anomalía que afecte a las secuencias concretas reconocidas por estas enzimas. Así, la técnica de *RFLP* (*Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción*) proporciona marcadores para la caracterización de genes. Concretamente, se aprovecha la creación o eliminación de sitios de restricción para endonucleasas concretas por efecto, bien de mutaciones en el ADN características de determinadas patologías, o bien por efecto de diferencias genéticas en cromosomas homólogos de individuos de la misma especie. Tanto en un caso como en otro, seleccionando endonucleasas de restricción que tengan su secuencia de reconocimiento en el sitio donde puede aparecer la alteración, podremos identificar ésta por la diferente longitud de los fragmentos de restricción generados, es decir, por el polimorfismo en la longitud de estos (10-12). En relación con el cáncer, es frecuente la aparición, en tejidos tumorales, de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción asociados al desarrollo del tumor y que no se observan en la mayoría de los individuos sanos.

Sin embargo, el uso más generalizado de las enzimas de restricción hay que considerarlo en relación con los experimentos de *clonación génica* (1,7-9). Estos procedimientos permiten, en la actualidad, realizar combina-

ciones de genes y elementos genéticos procedentes de organismos diversos que pueden ser introducidos en células aisladas, animales o plantas, para ser incorporados al patrimonio genético del huésped y aprovechar sus productos de expresión. Con todo ello, la curación de algunas enfermedades por transferencia génica está dejando de ser ficción, y la obtención de productos farmacológicos a partir de animales transgénicos es una realidad.

La clonación satisfactoria de un gen requiere varios elementos básicos. En primer lugar, es necesario disponer de un fragmento de ADN que contenga el gen de interés. Generalmente se trata de un fragmento de restricción, aunque a menudo se utilizan otros medios de ruptura del ADN, como la oscilación sónica, cuando existe la posibilidad de que una enzima de restricción produzca un corte en el interior del gen diana. Los extremos cohesivos pueden generarse también mediante síntesis. En segundo lugar es necesario disponer de un vector, es decir, una molécula de ADN a la que quedará ligado el gen diana. Un vector puede ser cualquier ADN que tenga un origen de replicación y que pueda replicarse tras su entrada en una célula apropiada. En tercer lugar es necesario disponer de una técnica de detección apropiada, es decir, de un método para identificar las células que contienen el gen clonado, en presencia de una enorme cantidad de células que no lo tienen.

TÉCNICAS BASADAS EN PROCEDIMIENTOS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

HIBRIDACIÓN. CONTROL DEL PROCESO

La hibridación de ácidos nucleicos consiste en el proceso por el cual dos cadenas sencillas de igual o de diferente origen (dos cadenas de ADN, dos cadenas de ARN o una cadena de cada tipo) se unen entre sí por establecimiento de puentes de hidrógeno entre bases complementarias. Las moléculas así formadas se denominan híbridos. Todas las técnicas de análisis de ácidos nucleicos que derivan de procesos de hibridación se basan en el apareamiento del ácido nucleico objeto de estudio con otra molécula de ADN o de ARN, de cadena sencilla, de secuencia conocida y que se denomina sonda.

La estabilidad del híbrido formado aumenta cuanto mayor sea el grado de complementariedad así como el tamaño de la sonda. Otros factores a considerar en el control del proceso de hibridación son la temperatura y la concentración de agentes desnaturizantes empleados. Conforme se incrementen ambos parámetros se irá favoreciendo la ruptura de los enlaces por puentes de hidrógeno que están estabilizando el híbrido. Por último hay que considerar la fuerza iónica del medio. Cuanto mayor sea ésta más estable será el híbrido, ya que estarán neutralizadas en mayor medida las fuerzas de repulsión electrostática de las cadenas de ácido nucleico que están interviniendo en el proceso. El rigor o astringencia de una hibridación se varía

modificando todos estos parámetros, pudiendo de esta forma discriminar entre híbridos perfectos y aquellos que no lo son.

PROCEDIMIENTOS DE MARCAJE DE SONDAS

Para reconocer la cadena de ácido nucleico que ha hibridado con la sonda utilizada, normalmente es esta última molécula la que se marca por diferentes procedimientos. Dentro de los métodos de marcaje de sondas podemos distinguir los procedimientos que incluyen el uso de isótopos radiactivos y aquellos que incluyen el uso de sustancias no radiactivas.

Entre los primeros procedimientos citados en el párrafo anterior cabe citar el *marcaje con polinucleótido quinasa*, enzima que cataliza la transferencia del grupo fosfato situado en posición g del ATP radiactivo al extremo 5' de la molécula de ácido nucleico que se utiliza como sonda. Este método se emplea fundamentalmente para marcar oligonucleótidos (5). Para sondas de mayor tamaño es muy utilizado el *procedimiento de primado al azar (random primer)*, el cual incluye la utilización de una ADN polimerasa que cataliza la síntesis de una sonda radiactiva. Esta enzima generalmente es el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y lleva a cabo su actividad copiando la cadena de ADN, que se emplea como molde, incorporando desoxinucleótidos marcados que se encuentran presentes en la mezcla de reacción. Como cebador, para iniciar la síntesis de la cadena que va a ser empleada como sonda, esta ADN polimerasa utiliza una mezcla de hexanucleótidos con todas las secuencias posibles, de tal forma que alguno de ellos hibrida con el ADN molde, previamente desnaturizado (13,14). Otro método radiactivo, también empleado en el marcaje de sondas de gran tamaño, es el *marcaje por traslado de la "mella" (nick translation)*. En este caso intervienen en la reacción una ADNasa y la ADN polimerasa I de *E. coli*. La ADNasa produce cortes al azar en las dos cadenas de la molécula de ADN que se va a marcar, es decir, actúa provocando la aparición de "mellas" en el ADN; seguidamente la ADN polimerasa va sintetizando nuevos fragmentos en los lugares donde se han producido las "mellas", incorporando desoxinucleótidos marcados al mismo tiempo que degrada el ADN previo gracias a su actividad 5' 3' exonucleasa (5,9). Por último, en cuanto a los procedi-

mientos de marcaje radiactivos, hay que citar la *síntesis de ribosondas*, técnica que difiere de las citadas hasta el momento porque, en este caso, la sonda marcada es de ARN. Para llevar a cabo este proceso se utilizan vectores plasmídicos con promotores para la ARN polimerasa de determinados fagos. En el extremo 3' del promotor se inserta el fragmento de ADN cuyo transcrito quiere utilizarse como sonda. Al incubar el plásmido con la ARN polimerasa correspondiente al promotor, en presencia de nucleótidos radiactivos, se obtiene la sonda de ARN (9).

En el momento actual y debido a los inconvenientes que conlleva el uso de isótopos radiactivos, cada vez se está extendiendo más el empleo de técnicas no radiactivas para el marcaje de sondas. Entre éstas, las más utilizadas son las que se basan en la incorporación de nucleótidos marcados con Digoxigenina. Las nucleótidos unidos a esta sustancia de naturaleza esteroídica pueden incorporarse en la síntesis de sondas de ADN o de ARN que, después de la hibridación, van a ser detectadas por ensayos inmunoenzimáticos. Para realizar estos ensayos se utilizan anticuerpos antidigoxigenina conjugados a una enzima que generalmente es la fosfatasa alcalina. En presencia de un sustrato de la enzima se da lugar, posteriormente, a una reacción de quimioluminiscencia o a una reacción coloreada que permite la detección del híbrido (9).

TÉCNICAS DERIVADAS DE PROCESOS DE HIBRIDACIÓN

Southern-blot

El método de Southern-blot tiene utilidad en la detección de secuencias específicas contenidas en una determinada molécula de ADN. En general, este ADN forma parte de una mezcla de fragmentos generados por digestión con endonucleasas de restricción a partir de ADN genómico. Los fragmentos obtenidos en esta digestión son separados por procedimientos electroforéticos, desnaturizados y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon o de nitrocelulosa a la cual se fijan. Posteriormente se lleva a cabo la hibridación con una sonda específica de la secuencia que se quiere analizar y el híbrido formado se identifica generalmente por medio de una autorradiografía (15) (Fig. 1).

La técnica de RFLP, citada en un apartado anterior, es

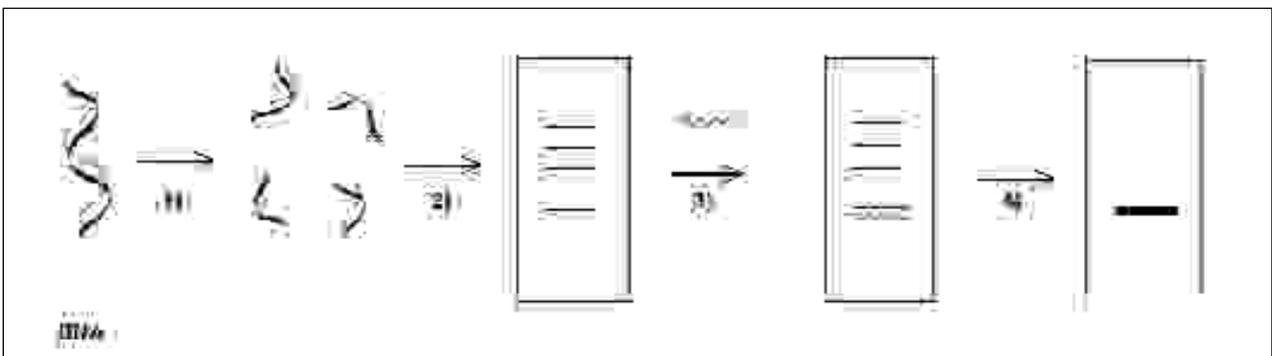


Fig. 1: Esquema del Southern-blot

considerada por muchos autores como una técnica derivada del Southern-blot, ya que en ella se lleva a cabo una separación electroforética de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción. Existe también una variante del RFLP acoplada a la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), muy utilizada actualmente en laboratorios de diagnóstico molecular, que se comentará en un apartado posterior dedicado íntegramente a la PCR y métodos derivados de la misma.

Asimismo, derivada del Southern-blot y del RFLP es la técnica del *análisis de la huella dactilar del ADN (DNA fingerprinting)*. Con este método es posible la identificación de regiones hipervariables que aparecen en el genoma humano y que son características de cada individuo. En este procedimiento se detectan cambios de secuencias que afectan a dianas de restricción y que originan, por tanto, diferencias en los tamaños de ciertos fragmentos del ADN.

Northern-blot

El Northern-blot es una técnica equivalente al Southern-blot, pero referida a ARN. El conjunto de ARNs, extraídos a partir de un material biológico, se separa por electroforesis teniendo en cuenta la tendencia que tienen estas moléculas a formar estructuras secundarias, razón por la cual es necesario incorporar al gel agentes desnaturizantes. El análisis por Northern-blot se usa fundamentalmente para detección y cuantificación de ARN mensajeros específicos (16,17).

Protección a nucleasas

La técnica de protección a nucleasas se utiliza para identificar secuencias de un fragmento de ADN que se transcriben a ARN. Las moléculas de ARN, extraídas a partir de una muestra biológica, se hibridan en solución con un fragmento de ADN marcado, de tamaño conocido, que se utiliza como sonda. Los híbridos formados, después de ser digeridos con nucleasas para eliminar las regiones de cadena sencilla, son separados electroforéticamente. Finalmente, se lleva a cabo la detección de los híbridos, lo cual nos permite conocer los transcritos específicos del fragmento de ADN marcado que ha sido utilizado. Existen variantes de este método en las que se utiliza una sonda de ARN en lugar de ADN (18).

Run-on

En el estudio de caracterización de moléculas de ARN, el ensayo de run-on nos informa acerca del nivel de síntesis de un determinado ARN mensajero, a diferencia del Northern-blot o del ensayo de protección a nucleasas que son técnicas que proporcionan información sobre el nivel de un determinado ARN mensajero, en un momento dado. Es decir, el run-on nos permite medir la tasa de transcripción de un gen. En la

práctica, los núcleos celulares, previamente extraídos, se incuban con nucleótidos marcados de tal forma que se va obteniendo el ARN marcado "in vivo". El ARN marcado recién sintetizado se hibrida con las secuencias de ADN cuya transcripción se desea estudiar (9).

Slot/Dot-blot

Este método es útil tanto en el análisis de ADN como en el de ARN. Consiste en la fijación de las moléculas objeto de estudio a membranas de nylon o de nitrocelulosa para posteriormente realizar la identificación de secuencias específicas. En este caso no se lleva a cabo una separación electroforética previa, razón por la cual la técnica de Slot/Dot-blot puede considerarse menos específica que las citadas anteriormente (19-21).

Hibridación "in situ"

La hibridación "in situ" nos permite identificar y cuantificar secuencias específicas de ADN o de ARN en cortes histológicos o en células en cultivo. De forma previa al proceso de hibridación, con objeto de que la molécula empleada como sonda pueda llegar al lugar donde se encuentra su secuencia complementaria en el interior de las células, es necesario permeabilizar éstas por tratamiento con proteasas (9).

MÉTODOS BASADOS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de la PCR, descrita por Mullis y cols (22) en 1987, ha revolucionado el análisis del ADN desde su introducción en los laboratorios, tanto a nivel de investigación básica como de diagnóstico clínico (23,24). Esta reacción, en principio preparativa, consiste en la síntesis enzimática "in vitro" de un elevado número de copias de un determinado fragmento de ADN, y se basa en la hibridación y extensión de dos oligonucleótidos que actúan como "primers" o cebadores de la ADN polimerasa que cataliza la síntesis. Estos cebadores flanquean la región objeto de amplificación en la doble cadena del ADN.

El primer paso de la reacción consiste en la desnaturización del ADN que va a ser amplificado, con objeto de que los cebadores puedan hibridar con la región de la que son complementarios en el segundo paso de la reacción. En el tercer paso se lleva a cabo la extensión o copia de las nuevas cadenas a partir de los grupos hidroxilo situados en el extremo 3' de los cebadores, sobre los que la polimerasa va incorporando los nucleótidos complementarios a los de las cadenas que actúan como moldes (Fig. 2). Los tres pasos descritos: desnaturización, hibridación y extensión o elongación se realizan a diferentes temperaturas que

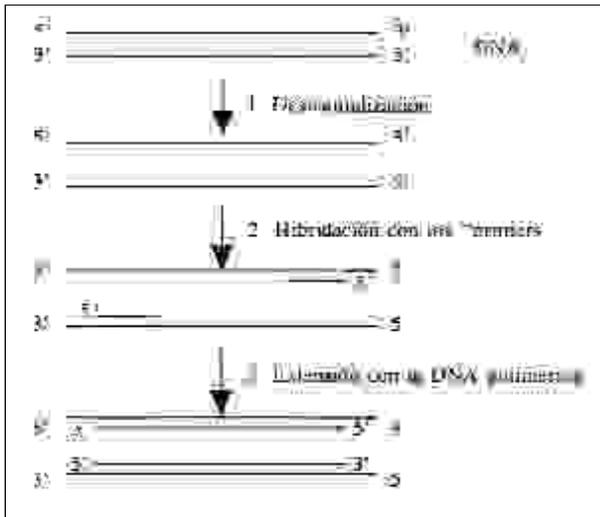


Fig. 2: Esquema de las reacciones que conforman un ciclo de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

deben ajustarse en cada caso y los tres constituyen un ciclo de la reacción. Ciclos repetitivos traen como consecuencia la acumulación exponencial del fragmento que se está amplificando y que se define por los extremos 5' de los cebadores que se están utilizando.

La enzima empleada en la PCR es la Taq ADN polimerasa, la cual se obtiene a partir del *Thermophilus aquaticus* y presenta la característica de ser resistente a las altas temperaturas a las que se realiza el proceso de desnaturalización (25).

En los últimos años se han puesto a punto una serie de técnicas, basadas en la PCR, que presentan gran utilidad en el estudio del polimorfismo genético causado por la presencia de mutaciones puntuales, pérdidas alélicas o pequeñas deleciones o inserciones ocasionadas en genes que aparecen como responsables del desarrollo tumoral (26-29).

VARIANTES DE LA PCR

RT-PCR (Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa)

Esta metodología permite amplificar por PCR secuencias de ADN que han sido obtenidas a partir de moléculas de ARN mensajero. La transcriptasa inversa copia las secuencias de ARNm, dando lugar a moléculas de ADNc, las cuales pueden ser seguidamente amplificadas por PCR. Estos ensayos permiten obtener fragmentos amplificados libres de secuencias intrónicas.

Multiplex-PCR (Amplificación múltiple)

Por medio de esta variante de la PCR es posible amplificar, en la misma reacción, varios fragmentos

génicos. Como resultado se obtienen amplificados varios fragmentos de ADN, tantos como pares de cebadores se hayan utilizado. En esta estrategia se seleccionan cebadores con temperaturas de hibridación similares y, a ser posible, que amplifiquen productos de diferentes tamaños, con objeto de verificar todas y cada una de las amplificaciones (30).

Nested PCR (PCR anidado)

Consiste en la realización de dos amplificaciones sucesivas de la misma secuencia de ADN. En la primera PCR se utiliza una pareja de cebadores localizados externamente con respecto a los que van a ser empleados en la segunda PCR. Esta estrategia se emplea para amplificar secuencias de copia única que son minoritarias en la población analizada (31).

Reacción en cadena de la polimerasa aplicada al estudio del polimorfismo conformacional del ADN monocatenario (PCR-SSCP)

Es un método desarrollado por Hayashi y cols. en 1989. La técnica se basa en la estructura secundaria del ADN de cadena sencilla (32). Se trata de un procedimiento sensible para la detección de cambios puntuales que tienen lugar en secuencias de ADN (33-35,26-29). El método incluye el marcaje y amplificación simultánea de fragmentos específicos de ADN. Seguidamente, por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, en los cuales la movilidad del ADN depende de su tamaño y de su carga, es posible llevar a cabo la separación de fragmentos que difieran en su composición en un único nucleótido.

Esta técnica se utiliza con frecuencia, como método de "screening", en laboratorios de diagnóstico molecular del cáncer (Fig. 3).

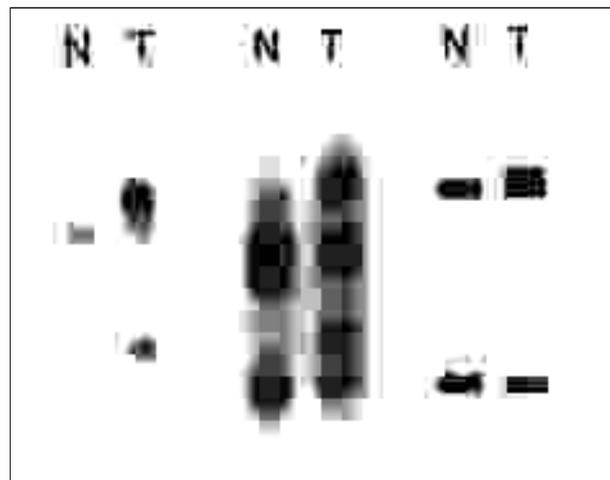


Fig. 3: PCR-SSCP aplicada a la detección de mutaciones en células tumorales. La figura muestra tres patrones de bandas procedentes de ADN obtenido a partir de células tumorales de tejido colorrectal (T) que son diferentes a los obtenidos en los correspondientes controles de tejido normal (N). Los productos amplificados corresponden al exón 7 del gen p53.

Reacción en cadena de la polimerasa utilizando "primers" arbitrarios (AP-PCR)

En este procedimiento la PCR se lleva a cabo empleando "primers" o cebadores que hibridan arbitrariamente a lo largo del ADN genómico. De esta forma es posible amplificar "al azar" y de forma simultánea diferentes locus de cualquier genoma. En cada reacción se emplea un único cebador que actúa como "sense" y como "antisense" para la PCR que inicialmente se desarrolla en condiciones de baja astringencia, lo cual permite la hibridación del cebador en múltiples locus; posteriormente, variando las condiciones de la reacción, se seleccionan algunas de las secuencias con las que el "primer" ha hibridado inicialmente. Esta técnica permite identificar una gran variedad de alteraciones genéticas (36).

Aplicada al diagnóstico molecular del cáncer, la técnica de AP-PCR hace posible, comparando el patrón de fragmentos amplificados en ADN procedente de tejidos tumorales con el correspondiente patrón de amplificaciones en el tejido no tumoral, detectar diversas alteraciones que se traducen en variaciones en la intensidad o en la movilidad de los fragmentos separados por electroforesis (37,38).

Reacción en cadena de la polimerasa utilizada para el estudio del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP)

La ventaja derivada de la combinación de ambas metodologías radica en la posibilidad de crear o eliminar, de manera artificial, sitios de restricción para endonucleasas específicas, lo cual se logra diseñando cebadores apropiados. De esta forma se han establecido protocolos en los que, de forma bastante sencilla, es posible detectar mutaciones puntuales en genes relacionados con la aparición de diversas patologías moleculares (39) (Fig. 4a).

Identificación de polimorfismos en el ADN por electroforesis en geles con gradientes desnaturizantes

La separación electroforética se basa, en este caso, en que moléculas de ADN amplificadas por PCR que presentan entre sí pequeñas diferencias en su secuencia nucleotídica, van a diferir sensiblemente en sus propiedades de fusión. Este hecho provoca que migren de forma ligeramente distinta en un gel de poliacrilamida que contenga un gradiente lineal de algún agente desnaturizante (40,41). Entre los agentes desnaturizantes utilizados es frecuente el empleo de sustancias químicas o bien gradientes de temperatura (42).

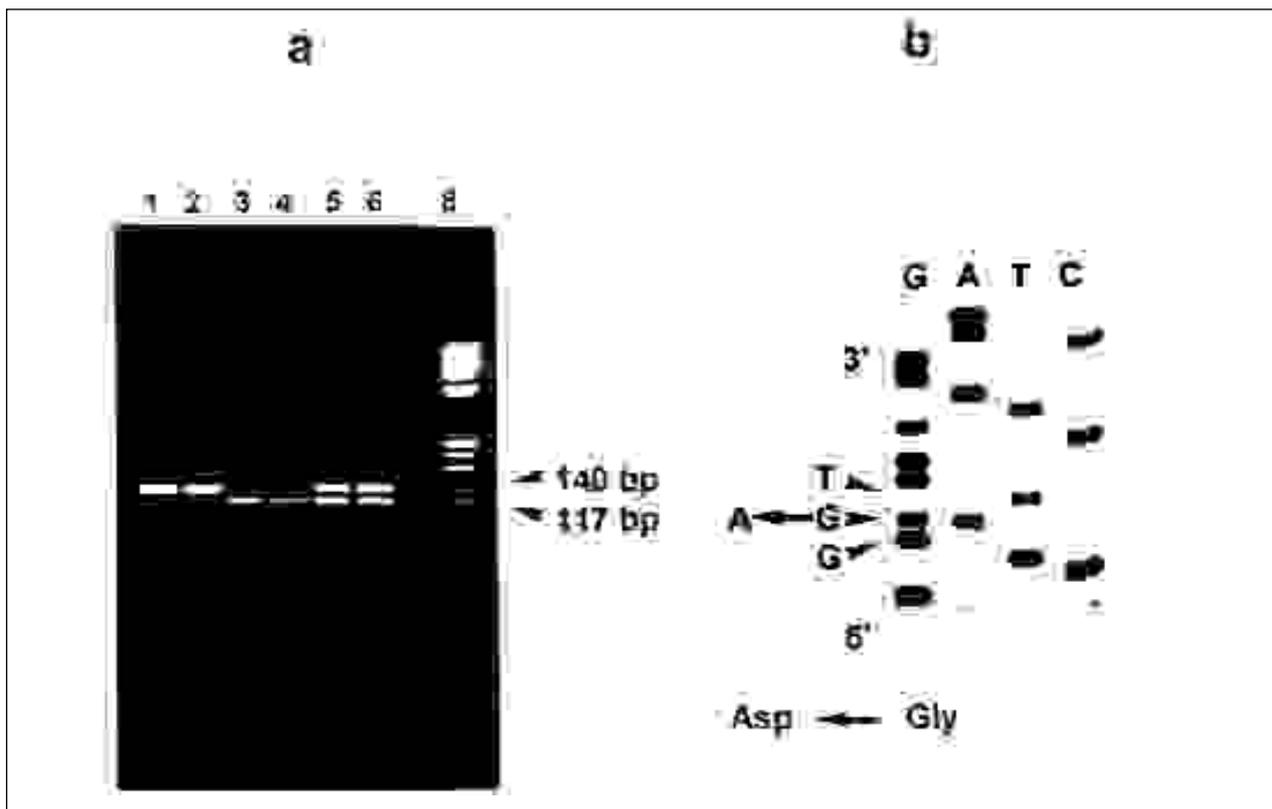


Fig. 4: a) PCR-RFLP aplicada a la detección de mutaciones en el codón 12 del gen *K-ras* en muestras de tumores no microcíticos de pulmón. En los carriles 1 y 2 aparecen las bandas correspondientes a la amplificación por PCR de la región génica que contiene la mencionada secuencia; en las muestras de los carriles 3 y 4 del gel se ha llevado a cabo una digestión del producto de PCR con la enzima *BstNI* y corresponden a casos negativos para la mutación; las muestras localizadas en los carriles 5 y 6 han sido asimismo digeridas y presentan una mutación monoalélica en el codón 12 de *K-ras*. En el carril 8 aparecen un conjunto de fragmentos de tamaño conocido (patrón). b) caracterización por el método de secuenciación de Sanger de la mutación detectada en el estudio a).

PCR-hibridación "in situ"

La técnica de PCR acoplada a la hibridación "in situ" permite la localización, en preparaciones histológicas, de células aisladas afectadas de una determinada alteración (43).

Protocolo TRAP (Protocolo de amplificación de las repeticiones teloméricas)

El método TRAP (44) permite detectar los niveles de actividad telomerasa presentes en las células tumorales (Figura 5). El protocolo se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, la telomerasa presente en los extractos proteicos añade repeticiones teloméricas TTAGGG al extremo 3' de un cebador sintético marcado. En un segundo paso, los productos de elongación de la telomerasa son amplificados por PCR empleando cebadores específicos. Como resultado se obtienen productos amplificados de distinta longitud que contienen las repeticiones hexaméricas añadidas por la telomerasa. Las diferencias en tamaño entre los diferentes productos de PCR obtenidos son, por tanto, de 6 pb y pueden visualizarse por electroforesis en geles de poliacrilamida. Estas diferencias son indicativas del nivel de actividad de la enzima.

SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos son las que permiten una mejor caracterización de estas moléculas. De todos los métodos existentes, los más empleados actualmente en los laboratorios son el método químico descrito por Maxam y Gilbert y, sobre todo, el método enzimático del terminador de cadena descrito por Sanger.

Método de secuenciación de Maxam y Gilbert

Con esta técnica se lleva a cabo la secuenciación de una cadena de ADN que ha sido previamente marcada en su extremo 5' (45). El molde marcado se somete a cuatro reacciones, incluyendo en cada una de ellas diferentes reactivos químicos; de esta forma, en cada caso se corta químicamente la cadena de ADN a nivel de un determinado nucleótido y, como consecuencia, se generan fragmentos marcados de distintos tamaños que pueden ser separados en geles de poliacrilamida que contengan urea como agente desnaturizante (46).

BIBLIOGRAFÍA

1. Ingeniería Genética. Pirámide, S.A (Ed). Izquierdo Rojo M. Madrid 1993.
2. Blin N, Stafford DW: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucl Acids Res, 1976; 3: 2303-2308.
3. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: Chelex 100 as a medium for



Fig. 5: Detección de actividad telomerasa, por el método TRAP, en extractos procedentes de tumores no microcíticos de pulmón (T) y en muestras de tejido normal (N).

Comparando los fragmentos obtenidos, en cada una de las reacciones, se podrá llegar al conocimiento de la secuencia del ADN del que se ha partido.

Método de secuenciación del terminador de cadena o método de los didesoxinucleótidos

Este método descrito por Sanger en 1977 (47) es un método enzimático que utiliza una ADN polimerasa que, a partir de un cebador complementario del extremo 3' de la cadena de ADN que se pretende secuenciar, sintetiza copias de esta cadena. El nombre del método deriva del empleo de los cuatro posibles didesoxinucleótidos que, en diferentes reacciones, provocan la terminación de las cadenas que están siendo sintetizadas por la polimerasa. Ajustando convenientemente las concentraciones de desoxi y de didesoxinucleótidos e incluyendo algún nucleótido marcado, será posible obtener, en cada una de las cuatro reacciones, una mezcla de fragmentos marcados de distintos tamaños y terminados, todos ellos, por el mismo didesoxinucleótido. Al igual que en el método anterior, estos fragmentos pueden separarse en geles de poliacrilamida/urea y comparando los fragmentos obtenidos, en cada caso, se obtienen la secuencia de la cadena de ADN complementaria a la de partida (Fig. 4b).

simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Bio Techniques, 1991; 10 (4): 506-513.

4. Chomczynski K, Sacchi N: Single-step method for RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987; 162: 156-159.
5. Molecular Cloning. A laboratory manual. Nolan C (ed.). Sam-

- brook J, Fritsch EF, Maniatis T. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y. 1989.
6. Gel electrophoresis of nucleic acids. A practical approach. Rickwood and Hames (eds.). IRL Press, Oxford 1982.
 7. Recombinant DNA, 2nd ed. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Scientific American Books, New York 1992.
 8. Recombinant DNA Methodology. Wu R, Grossman L, Moldave K, eds. Academic Press, San Diego 1989.
 9. Manual de Genética Molecular. Síntesis (Ed). León Serrano J, García Lobo JM. España 1990.
 10. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 1980; 69: 201-205.
 11. Jiang N, Kahn SM, Guillem JG, Lu S-H, Weinstein IB: Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal and gastric cancer. *Oncogene*, 1989; 4: 923-928.
 12. Lin SY, Chen P-H, Wang Ch-K, Lin JD, Siau Ch-P, Chen Y-P, Yang M-J, Lin M-H, Chen T-Ch, Chang J-G: Mutation analysis of K-ras oncogenes in gastroenterologic cancers by the amplified created restriction sites method. *Am J Clin Pathol*, 1993; 100: 686-689.
 13. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 1983; 132: 613.
 14. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Addendum Anal Biochem*, 1984; 137: 266-267.
 15. Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975; 98: 503-517.
 16. Alvine JC, Kemp DJ, Stark GR: Method for detection of specific RNAs in agarose4 gels by transfer to diazobenzyloxymethyl paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 5350-5354.
 17. Alvine JC, Kemp DJ, Parker BA, Reiser J, Renart J, Stark GR, Wahl GM: Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol*, 1979; 68: 220-242.
 18. Winter E, Yamamoto F, Almoguera C, Perucho M: A method to detect and characterize point mutations in transcribed genes; amplification and overexpression of the mutant c-Ki-ras allele in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 7575-7579.
 19. Bos JL, Verlaan de Vries M, Jansen AM, Veeneman GH, van Boom JH, van der Eb AJ: Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res*, 1984; 12: 9155-9163.
 20. Verlaan de Vries M, Bogaard ME, van den Elst H, van Boom JH, van der Eb A, Bos JL: A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. *Gene*, 1986; 50: 313-320.
 21. Wood WI, Gistschier J, Lasky LA, Lawn RM: Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: A method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 1585-1588.
 22. Mullis KB, Faloona FA: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987; 155: 335-350.
 23. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ: Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 1991; 252: 1643-1651.
 24. PCR. A Practical Approach. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR (eds.). Oxford University Press, Oxford 1991.
 25. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988; 239: 487-491.
 26. Vega FJ, Iniesta P, Caldés T, SánchezA, López JA, de Juan C, Diaz-Rubio E, Torres A, Balibrea JL, Benito M: p53 exon 5 mutations as a prognostic indicator of shortened survival in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 1997; 76: 44-51.
 27. Caldés T, Iniesta P, Vega FJ, de Juan C, López JA, Diaz-Rubio E, Fernández C, Cerdán J, Balibrea JL, Benito M: Comparative survival analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in colorectal cancer. *Oncology*, 1998; 55(3): 249-257.
 28. Iniesta P, de Juan C, Caldés T, Vega FJ, Cerdán J, Massa MJ, Sánchez A, López JA, Fernández C, Torres AJ, Balibrea JL, Benito M: Genetic abnormalities and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Det Prev*, 1998; 22(5): 383-395.
 29. Iniesta P, Vega FJ, Caldés T, Massa MJ, de Juan C, Cerdán J, Sánchez A, López JA, Torres AJ, Balibrea JL, Benito M: p53 exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Lett*, 1998; 130: 153-160.
 30. The Polymerase Chain Reaction. Mullis KB, Ferré F, Gibbs RA (eds.). USA, 1994.
 31. Lleonart ME: Métodos de diagnóstico molecular basados en la técnica de la PCR y su aplicación en patología. *Oncología*, 1998; 21(2): 53-57.
 32. Glavac D, Dean M: Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum mutation*, 1993; 2: 404-414.
 33. Orita M, Iwahama H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 2766-2770.
 34. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989; 5: 874-879.
 35. Spinardi L, Mazars R, Theillet Ch: Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 4009.
 36. Welsh J, McClelland M: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990; 18: 7213-7219.
 37. Peinado MA, Malkhosyan, S, Velázquez A, Perucho M: Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 10065-10069.
 38. De Juan C, Iniesta P, Vega FJ, Peinado MA, Fernández C, Caldés T, Massa MJ, López JA, Sánchez A, Torres AJ, Balibrea JL, Benito M: Prognostic value of genomic damage in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 1998; 77: 1971-1977.
 39. Vega FJ, Iniesta P, Caldés T, Sánchez A, López JA, de Juan C, Diaz-Rubio E, Torres A, Balibrea JL, Benito M: Association of K-ras codon 12 transversions with short survival in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*, 1996; 9: 1307-1311.
 40. Myers RM, Lumelsky N, Lerman L, Maniatis T: Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature*, 1985; 313: 495-498.
 41. Hamelin R, Jego N, Laurent-Puig P, Vidaud M, Thomas G: Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis in colorectal tumors. *Oncogene*, 1993; 8: 2213-2220.
 42. Yamamura Y, Satonaka K, Fujimori T, Maeda S, Chiba T: p53 mutations in flat and polypoid type colorectal tumors detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Digest Dis Sci*, 1994; 39: 2043-2048.
 43. PCR in situ hybridization. Protocols and applications. Nuovo GJ. Raven Press (Ed.). New York: 169-213, 1994.
 44. Kim N, Piatyzscek M, Prowse K, Harley C, West M, Ho P, Coviello G, Wrigth W, Weinrich S, Shay J: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994; 266: 2011-2015.
 45. Maxam AM, Gilbert W: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol*, 1980; 65: 499-560.
 46. Sanger F, Coulson AR: The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett*, 1977; 87: 107-110.
 47. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 5463-5467.

Terapia génica

M. IZQUIERDO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Autónoma. Cantoblanco. Madrid

INTRODUCCIÓN

Entendemos por terapia génica en humanos la transferencia de un ácido nucleico (ADN o ARN) a un paciente con fines curativos. Los distintos tipos de cáncer constituyen una enfermedad compleja y multigénica producida por la combinación de alteraciones (mutaciones) en oncogenes y genes oncosupresores. El origen de las mutaciones puede ser por herencia o por adquisición a lo largo de la vida del individuo. El componente hereditario en el desarrollo de un cáncer es limitado, siendo la gran mayoría de los tumores sólidos el resultado de alteraciones acumuladas a lo largo de varios años y que afectan de manera directa o indirecta a genes implicados en la proliferación celular (tumores benignos), así como genes que intervienen en la adhesión y movilidad de las células (tumores malignos). Los cánceres con un componente hereditario son aquellos en los que el individuo nace con alguna alteración en un oncogén o gen oncosupresor. En estos casos, la enfermedad se manifiesta a edades más tempranas y en varios miembros de una misma familia. Un mínimo de cuatro o cinco alteraciones acumuladas parecen ser necesarias para que la célula revoque la decisión de quiescencia e inicie una proliferación no programada.

Las técnicas de biología molecular e ingeniería genética han permitido el aislamiento y caracterización de un gran número de oncogenes y genes oncosupresores que contribuyen en el desarrollo de un tumor. La aplicación de una terapia génica precisa de un diagnóstico genético-molecular del cáncer. Estamos en los comienzos de diagnósticos personalizados en los que la utilización de "microchips" portadores de todos los oncogenes y genes oncosupresores descritos permite el conocimiento de cuales de ellos están presentes, amplificadas o ausentes

* (Nota aclaratoria: En esta revisión los genes se denominan en minúscula y cursiva, las proteínas correspondientes con la inicial en mayúscula).

en la célula tumoral *versus* la célula normal de un individuo. Esto permitirá una terapia génica personalizada en la que se utilice la estrategia más acorde al tipo de alteraciones observadas a nivel molecular (1,2).

Los genes terapéuticos se introducen y amplifican en vectores virales por técnicas de ingeniería genética. La terapia génica ha de contar además con un sistema eficaz de entrega del producto génico al lugar donde es requerido y de un mecanismo eficiente de entrada en la célula tumoral. La expresión del transgén (gen transferido) una vez dentro de la célula debe asimismo estar garantizada.

En la actualidad se están llevando a cabo varias estrategias de terapia génica para el tratamiento de tumores, la mayoría de ellas han pasado de la fase experimental en animales a la fase de ensayos clínicos. No está siendo fácil adaptar el sistema animal al humano y las causas pueden ser triviales o profundas. Los resultados obtenidos hasta el momento son en general buenos y capaces de erradicar tumores en animales de experimentación, pero no son excesivamente fáciles de extrapolar a los casos clínicos humanos. No se pretende en esta revisión ser exhaustivos; analizaremos solamente algunas de las estrategias que han tenido éxito en animales de experimentación y que aún no han logrado una respuesta antitumoral contundente en el ser humano.

ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA CONTRA EL CÁNCER

El análisis de las distintas terapias génicas que en la actualidad se están empleando contra el cáncer nos permite establecer seis categorías. Primera: mecanismos para impedir la expresión de oncogenes cuya activación haya contribuido al desarrollo del tumor. Este tipo de terapias va estrechamente ligado a un diagnóstico genético-molecular eficaz y personalizado que permita conocer

los oncogenes que se sobre-expresan en la célula tumoral. Segunda: utilización del gen oncosupresor *p53*(*) como diana de la terapia. *p53* es uno de los genes que con mayor frecuencia se encuentra alterado en tumores sólidos humanos y cuyas funciones son múltiples. Además de ser un factor de transcripción, *p53*(*) puede detectar daños infringidos en el ADN y paralizar la división celular hasta que el daño sea reparado. Puede asimismo inducir apoptosis si los daños estimados son considerables. Se le ha comparado con un policía molecular que vela por la integridad física del ADN y es capaz de inducir mecanismos correctores o mortales. En cultivos celulares que carezcan de P53 funcional, las propiedades neoplásicas pueden revertirse con la llegada de una copia normal del gen. La tercera categoría está representada por las terapias que incrementan la inmunogenicidad tumoral. Los tumores por su propia idiosincrasia no son inmunogénicos ya que de haberlo sido no hubieran prosperado, pero hay maneras de convertir la célula tumoral en diana de las células T citolíticas y estimular un rechazo inmunológico. La introducción de los genes correspondientes a las citoquinas: interleuquinas 2 ó 4, así como el factor de la necrosis tumoral α , son ejemplos de ello. Una cuarta estrategia es la destrucción de la célula tumoral con vectores portadores de genes asesino-suicidas condicionales. Estos vectores, una vez dentro de la célula, provocan la muerte de la misma en presencia de un compuesto, en principio inocuo, que es modificado hacia una versión tóxica por el producto del gen "terapéutico". Muchos de estos sistemas provocan además un efecto mortal "colateral" en células próximas a la que produce el compuesto tóxico. La quinta estrategia consiste en terapias antiangiogénicas que impiden el desarrollo de un tumor de modo indirecto interfiriendo con las neovascularizaciones asociadas a todo tumor y eliminando su suministro de oxígeno y nutrientes. La angiogénesis se produce como respuesta a un aumento de factores de diversa índole (angiogénicos) que superan la presencia de otros (antiangiogénicos) que, normalmente mantienen la proliferación de las células endoteliales, que forman los vasos sanguíneos, bajo un estricto control. En la célula tumoral, que produce ambos tipos de factores, los niveles de determinados factores angiogénicos superan los antiangiogénicos iniciándose una proliferación y migración de células endoteliales que culminará con la formación de nuevos vasos arrojando la masa tumoral. La terapia génica consiste en entregar en tumores incipientes genes productores de proteínas antiangiogénicas capaces de subir los niveles de estos factores por encima de los angiogénicos inclinando la balanza hacia la no vascularización del tumor. La sexta y última categoría la constituyen las terapias combinadas en las que un mismo vector puede entregar a una célula genes capaces de estimular una respuesta inmune, genes antiangiogénicos y un gen asesino-suicida condicional.

ESTRATEGIAS CONTRA ONCOGENES CONCRETOS

Tanto los tumores sólidos como las leucemias y linfomas, exhiben una sobre-expresión de algunos onco-

genes mutados; la malignidad de las células podría desaparecer impidiendo la expresión del/los oncogenes por administración de pequeños oligodesoxinucleótidos complementarios a los ARNm y ADN correspondientes. Estos oligonucleótidos son moléculas de ADN o ARN de banda simple sintetizados *in vitro* y modificados químicamente en el grupo fosfodiéster para hacerlos resistentes a las nucleasas; tienen un tamaño de entre 15 y 20 nucleótidos, pudiendo introducirse por simple difusión en las células de un organismo. El oligonucleótido actúa a nivel de ARNm y ADN, impidiendo por una parte la traducción en el citoplasma del mensajero y por otra interfiriendo con la transcripción en el núcleo. Han tenido éxito en cultivos celulares *in vitro* oligonucleótidos contra *ras*, *raf*, *myc*, *myb*, *bcr-abl*, *bcl-2*, y contra el factor de crecimiento semejante a la insulina, entre otros. En humanos se han utilizado construcciones que expresan un ADN antisentido respecto al factor de crecimiento similar a insulina (FCI-1 o IGF-1 en versión anglosajona) que va asociado al desarrollo de tumores cerebrales malignos (glioblastomas) (3) y contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (rFCE o EGFr en versión anglosajona) que se sobre-expresa en muchos tumores humanos entre los que se encuentran los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello. En este último caso, se construyeron plásmidos recombinantes que expresaban la hebra de ADN antisentido (y complementaria al ARNm del rFCE) bajo el control de un potente promotor constitutivo (ARN-U6). El ADN recombinante arrojado por liposomas, se inyectó *in situ* en tumores humanos crecidos subcutáneamente en ratones desnudos. El resultado fue una inhibición total de la expresión del rFCE, una inducción de apoptosis y total regresión tumoral (4). También han sido desarrollados métodos de inhibición del oncogén *ras*, así como mezclas de oligonucleótidos contra quinasas.

TERAPIAS BASADAS EN EL GEN ONCOSUPRESOR *p53*

Dos de las modalidades más interesantes descritas son, por una parte, la entrega de una copia normal del gen oncosupresor *p53* a células tumorales que tienen el gen alterado y por otra, la llegada de adenovirus delecionados en *e1a* a tumores deficientes en *p53*. Ambas modalidades se han probado en pacientes con cánceres de diversos tipos y muy especialmente en cáncer de pulmón. Las estrategias y vectores han sido variados por lo que se analizarán algunos casos concretos.

En células en cultivo deficientes para *p53* (línea celular 9L, gliosarcoma), se ha observado que la entrada de adenovirus recombinantes portadores del gen mutado, induce apoptosis en 24 horas (5). En un estudio (6) se trataron nueve pacientes aquejados de cáncer de pulmón, "de células no pequeñas" y que no respondieron a tratamientos convencionales, con retrovirus portadores de *p53* funcional bajo el control del promotor de la α -actina. La terapia se aplicó por inyección directa y tres de los pacientes mostraron una disminución del tumor

asociada a una supervivencia de 20-22 semanas después del tratamiento. En otros tres pacientes se estabilizó el proceso de crecimiento con supervivencias de 9-17 semanas, mientras que tres más, no superaron las 3, 4 y 6 semanas de vida. Se verificó la presencia del transgén (en algunas regiones del tumor), hasta en un 20% de las células, siendo mayoritario no obstante, el porcentaje de células que no recibieron una copia del gen terapéutico. En un estudio posterior (7) se trataron 21 pacientes con el mismo tipo de cáncer (de las células no pequeñas de pulmón) utilizando en este caso un vector adenoviral por tener los adenovirus tropismo por las mucosas de las vías respiratorias. Los pacientes no se curaron pero toleraron bien hasta seis inyecciones intratumorales mensuales y se indujo apoptosis evidenciada en las biopsias analizadas. En un tercer estudio (8) se trataron 15 pacientes con alteraciones en *p53*, administrando una sola inyección de adenovirus defectivos portadores de una copia normal del gen dañado. En seis de los pacientes se detectó expresión de P53 normal y en ningún caso se observó toxicidad clínica apreciable. Aunque en todos los casos analizados se observa la inducción de apoptosis ocasionada probablemente por la expresión de *p53*, ninguno de estos resultados son suficientemente definitivos para poder generalizar la terapia. La limitación más acusada es la incapacidad de los vectores para infectar todas las células neoplásicas.

Una terapia alternativa, que también tiene como objetivo tumores deficientes en *p53*, es la mediada por adenovirus que carecen del gen *e1b*. E1B es una proteína que inactiva P53 para poder así replicarse en las células que infecta. Un adenovirus que carezca de *e1b* podrá infectar y destruir (lisar) células tumorales que no posean el oncosupresor, pero será inactivado por células vecinas al tumor que expresen P53. La inyección del virus mutante en carcinomas cervicales humanos, crecidos en ratones desnudos, causó una notable reducción del tamaño del tumor y la completa desaparición en el 60% de los tumores (9).

TERAPIAS BASADAS EN AUMENTAR LA INMUNOGENICIDAD DE LA CÉLULA TUMORAL

La mayoría de los tumores son sólo marginalmente inmunogénicos, en muchos casos se pueden detectar células T citotóxicas contra el tumor en pacientes que fallecen a causa de la enfermedad. La inmunoterapia génica se basa en la introducción de genes en células del paciente que potencien la respuesta antitumoral. En la mayoría de los casos se utiliza la técnica *ex vivo*, en la que células del propio paciente son extraídas del tumor por cirugía, crecidas y manipuladas introduciendo genes terapéuticos y por fin devueltas (subcutáneamente o intradérmicamente) al organismo de partida, en algunos casos previa irradiación para evitar su proliferación. Genes correspondientes a distintas citoquinas (interleuquinas 2, 4 o el factor de la necrosis tumoral) se pueden introducir en linfocitos infiltrantes de tumores (LIT, o TIL en versión anglosajona) o en linfocitos T citotóxicos (LTC, o CTL en versión anglosajona) para obtener

una secreción constitutiva de citoquinas y estimular la actividad antitumoral. También se pueden introducir genes responsables de la presentación de antígenos en los sistemas de incompatibilidad de tipos I y II (MHC) que con frecuencia no operan en muchos tumores, así como genes que codifican proteínas de co-estimulación (B7) que tampoco suelen estar presentes en las células neoplásicas. Las células tumorales del paciente pueden, asimismo, ser sustituidas por otras células presentadoras de antígenos como fibroblastos, macrófagos o células dendríticas, también extraídas del paciente, pero más fáciles de cultivar *ex vivo*. Sin embargo, a pesar de los numerosos ensayos clínicos realizados hasta el momento con estas estrategias, especialmente en melanomas, no se ha logrado un efecto antitumoral realmente significativo.

Un método alternativo es la construcción de receptores quiméricos compuestos por un anticuerpo específico contra el tumor, fusionado a una región de señalización intracelular de un receptor de la célula T citotóxica (10). La mayoría de los adenocarcinomas humanos exhiben un mucosacárido (TAG-72) que puede utilizarse para la obtención de anticuerpos murinos humanizados (CC49) contra este antígeno. Estos anticuerpos son de una sola cadena y sólo poseen de ratón la parte variable de la molécula para evitar un rechazo del organismo humano. El anticuerpo está fusionado a la región de señalización intracelular del receptor CD3 de las células T. En animales de experimentación se observó una protección del 75 al 100% frente a tumores inducidos en la cavidad intraperitoneal, siempre que las células T manipuladas y portadoras del receptor quimérico, se coinyectaban con las células tumorales, la protección fue mínima en tumores pre-establecidos. La terapia se probó en pacientes con cánceres de colon avanzados. Cada paciente recibió tres inyecciones espaciadas cada dos semanas, que contenían 10^{10} células T propias portadoras del receptor quimérico CC49/ CD3. Algunos pacientes respondieron bien al tratamiento con una notable disminución de los niveles de TAG-72 en el suero, pero la presencia de células T modificadas en la sangre de los pacientes no superó las 10 semanas. El efecto antitumoral de estas terapias sigue siendo limitado y se prevee la necesidad de repetir el tratamiento con una cierta frecuencia. Células troncales hematopoyéticas pueden sustituir a las células T como portadoras de los receptores quiméricos dando origen a células mieloides y citotóxicas NK (del inglés natural killer) que también muestran *in vivo* actividad antitumoral.

ESTRATEGIAS CON GENES ASESINO-SUICIDAS CONDICIONALES

Existen numerosas modalidades en las que un vector que se hace llegar a la célula tumoral es portador de un gen que causa la muerte de la célula huésped en presencia de un sustrato adecuado. Vectores retrovirales o adenovirales portadores del gen de la quinasa de timidinas del virus *Herpes simplex (tk Hs)* se pueden hacer llegar por mediación de inyecciones intratumorales a tumores

de diversa índole preferentemente aquellos que presenten una actividad mitótica elevada, como los glioblastomas (11-18). La enzima posee una gran afinidad por determinados nucleósidos, análogos tóxicos de la guanina, como el ganciclovir o el aciclovir. Las células de mamíferos también poseen quinasas de timidinas pero éstas sólo fosforilan nucleótidos monofosfato, no siendo sustrato de las mismas los nucleósidos. Una vez en la forma trifosfato, todos estos compuestos son introducidos en la molécula de ADN, pero al ganciclovir le falta el anillo de ribosa imprescindible para que la cadena en formación prosiga con normalidad, por lo que se bloquea la replicación desencadenando la muerte celular. Sea cual sea el vector empleado en este tipo de terapia (retrovirus o adenovirus) sólo será efectivo en células en división, característica fundamental de la célula neoplásica. El sistema va asociado además a un efecto colateral por el que células vecinas a las que han adquirido el transgén pueden recibir ganciclovir ya fosforilado a través de las uniones en hendidura (*gap junctions*) que conectan unas células con otras y por tanto morir también. Se ha estimado que sería suficiente para eliminar un tumor que el 25% de las células tumorales recibieran y expresaran el transgén (19), el resto correría a cargo del efecto colateral. Este sistema denominado *tkHs/ganciclovir* ha permitido la erradicación de glioblastomas en la rata utilizando como inóculo células de las líneas celulares C6 ó 9L y siempre que el tamaño del tumor no excediera los 150 mm³ (20). Cuando se utiliza este sistema en humanos, no se obtienen remisiones totales del tumor, pero en algunos casos, se observan disminuciones significativas en el tamaño del tumor probablemente asociadas a un aumento de la supervivencia en estos pacientes. El primer ensayo clínico para el tratamiento de tumores cerebrales malignos, se realizó con 15 pacientes a los que se les inyectaron en múltiples sitios del tumor células murinas productoras de retrovirus portadores del gen *tkHs* (21). Al cabo de 7 días se les trató con 5 mg/kg de ganciclovir, durante 14 días. El resultado de este ensayo, que comprendía 12 glioblastomas recidivados, dos metástasis de melanomas y una de carcinoma de mama mostró una reducción del tumor en 5 de los pacientes con tumores más pequeños según se estimó por imágenes de resonancia magnética (IRM) de 1,4 + 0,5 ml a 0,4 + 0,5 ml. Cuatro de los pacientes mostraron una respuesta parcial o completa sobreviviendo durante 21, 13, 11 y 7 meses. El porcentaje de células tumorales infectadas no llegó al 1% y se observaron como efectos secundarios inflamación meníngea y dolores de cabeza en algunos pacientes (22). En otro de los ensayos clínicos realizados con el método *tkHs/ganciclovir* (Tabla I), se trataron 9 pacientes con recidivas de glioblastoma multiforme y diversos tamaños de tumor (más de 50 cm³), de los cuales 5 lograron superar las expectativas de supervivencia (3 meses) y en los 2 pacientes con mayor supervivencia (2 años), se combinó la cirugía con la terapia génica con el fin de reducir artificialmente el tamaño del tumor (23). En estos pacientes además de la resección del tumor, se dejó un depósito Omayá (intradérmico) unido a un catéter que comunica con la cavidad tumoral por el que se

TABLA I

SUPERVIVENCIA DE UN ENSAYO CLÍNICO EN EL QUE PARTICIPARON 9 PACIENTES CON RECIDIVAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME DE DIVERSOS TAMAÑOS TRATADOS POR TERAPIA GÉNICA CON EL SISTEMA *tkHs/GANCICLOVIR*

Paciente	Número de células inyectadas y número de inyecciones	Casos de supervivencia superior a la esperada (3 meses)
1	7x10 ⁸ células/una inyección	8 meses
2	7x10 ⁸ células/una inyección	5 meses
4	2x10 ⁸ células/una inyección	5 meses
8	5x10 ⁸ células/4 inyecciones	2 años
9	5x10 ⁸ células/3 inyecciones	2 años

realizan tratamientos de células productoras de retrovirus seguidos de administración de ganciclovir intravenosa en varias ocasiones. No se observaron efectos secundarios o de toxicidad importantes en ninguno de los pacientes.

El sistema *tkHs/ganciclovir* es el más popular y el mejor estudiado (24) pero no es el único que utiliza un gen potencialmente asesino-suicida en combinación con un compuesto tóxico condicional. La citosina deaminasa de bacterias u hongos no es un gen presente en las células de mamíferos, convierte el tóxico condicional 5-fluorouracilo en 5-fluorouracilo que se incorpora en ARNs y ADNs bloqueando su síntesis. Tiene un efecto tóxico tanto en células que se dividen como quiescentes y ha sido utilizado en el tratamiento de gliomas, cáncer de mama y carcinomas colorectales humanos (25-27). Este sistema también exhibe un efecto colateral, menor que el observado para *tkHs/ganciclovir*, pero que no depende de uniones en hendidura, lo cual es interesante ya que muchas células tumorales pierden la capacidad de conectarse con sus vecinas vía uniones en hendidura al tener alteradas las conexinas, proteínas responsables de dichas uniones.

Otros sistemas asesino-suicida condicionales son: el del citocromo P450 activador de ciclofosfamida (28); la guanina, xantina fosforribosil transferasa de *E.coli*, que sensibiliza con respecto al compuesto 6-tioxantina (29); la desoxicitidina quinasa, que confiere sensibilidad contra los compuestos citarabina y gemcitabina (30) y el sistema linamarasa/linamarina que utiliza un gen vegetal (*lin*) responsable de la enzima linamarasa, que descompone el compuesto cianoglucósido linamarina en glucosa y cianuro (31). Este último sistema es particularmente interesante porque va asociado a un amplio efecto colateral mediado por la producción de cianuro en la célula portadora del gen *lin* y en presencia de linamarina. El efecto colateral del sistema linamarasa/linamarina no depende de uniones en hendidura ya que el cianuro es volátil y bastaría con que el 10% de las células de un tumor se convirtieran en productoras de cianuro para eliminar la totalidad del tumor. El sistema ha permitido la erradicación de tumores cerebrales de gran tamaño en la rata mediante la inoculación en el seno del tumor de células murinas productoras de retrovirus portadores del

gen *lin*. La administración de linamarina es local y tiene lugar a través de una cánula de infusión cerebral anclada en el cráneo del animal y conectada vía catéter con una bomba osmótica que libera el compuesto.

Hasta el momento, los diversos sistemas con entrega de genes asesino-suicidas condicionales han tenido éxitos más o menos espectaculares en animales de experimentación y más bien moderados en pacientes. En algunos casos (el 30% aproximadamente) se consigue una reducción del tumor y un aumento de las expectativas de vida, la curación aún no se ha conseguido en ningún caso en humanos.

ANTIANGIOGÉNESIS

Ningún tumor sería capaz de crecer por encima de 1 mm³ sin desarrollar un nuevo aporte de sangre. Los vasos migran hacia el tumor y el tumor lo hace hacia los vasos. La angiogénesis, es decir el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros próximos ya existentes, es un fenómeno íntimamente ligado a todos los tipos de cánceres, inclusive a las leucemias, en donde se observa un incremento de densidad vascular en la médula. El proceso de angiogénesis es complejo y se han elaborado terapias contra cada uno de los 4 pasos secuenciales que intervienen en su ejecución: digestión de la membrana basal por proteasas; migración de las células endoteliales; su proliferación y la formación de los capilares. Recientemente la transferencia génica se ha sumado a las terapias que controlan la angiogénesis (32) especialmente en tumores muy vascularizados como son los glioblastomas (33-40). La célula tumoral secreta factores que inducen el crecimiento endotelial, muy en particular el factor de crecimiento endoteliovascular (FCEV o VEGF en versión anglosajona) y algunas de las terapias se basan en la inhibición concreta de este factor, por tratamiento directo con vectores que expresan un ARN antisentido causando su bloqueo (41). El FCEV se une a sus receptores con actividad quinasa de tirosinas, iniciando así un proceso de transmisión de señales que induce a la proliferación celular. Una terapia alternativa a la reseñada se basa en la llegada al entorno tumoral de retrovirus portadores de una forma mutada del receptor que carezca del componente intracelular y por tanto no pueda transmitir la señal de proliferación al unirse con el ligando (42). Una variante de esta última terapia es la utilización de un adenovirus que expresa un receptor FCEV soluble y que administrado localmente en el momento de la escisión quirúrgica del tumor primario en ratones, provoca una notable supresión tumoral (aunque no inhibición total) en las metástasis en hígado o pulmón (43).

Las terapias antiangiogénicas pueden estar basadas alternativamente, en potenciar la presencia de inhibidores de la angiogénesis en las cercanías del tumor. La transferencia mediada por liposomas del gen oncosupresor *p53* a tumores de mama murinos ha logrado que aproximadamente el 5% de las células tumorales adquieran el gen, produciéndose una reducción del 60% en el número de vasos sanguíneos en los tumores tratados (44). El efecto antiangiogénico fue el resultado de

un aumento en la producción de trombospondina-1, un inhibidor de la angiogénesis bajo el control de *p53* (46-46). Inhibir la trombospondina de manera sistémica en un organismo podría tener efectos secundarios en el ciclo menstrual femenino o en la cicatrización de heridas, pero hay otros factores antiangiogénicos como la angiostatina y endostatina que no parecen interferir con estos procesos. La angiostatina es un producto (críptico) del plasminógeno. Hay tumores primarios que inhiben la angiogénesis de sus metástasis por producción de angiostatina o trombospondina, manteniendo unos niveles sanguíneos elevados del inhibidor. El aumento de los niveles de factores antiangiogénicos, mediada por vectores portadores de estos genes, puede ser una terapia interesante ya que hay mucha evidencia sugerente de que el balance entre factores angiogénicos y antiangiogénicos puede ser el "interruptor" angiogénico por el que se decida si un tumor incipiente va a ser neovascularizado o no. Existe sin embargo el riesgo, teórico e impredecible, de que la célula tumoral, dada su inestabilidad genética, produzca variantes celulares que expresen nuevos factores antiangiogénicos o más de los mismos.

TERAPIAS COMBINADAS

Puede ser necesario la combinación de varias terapias que, por separado, no son capaces de erradicar un tumor. Una terapia convencional como es la cirugía puede estar íntimamente ligada a las de radioterapia y/o quimioterapia. La gran mayoría de los tumores benignos son erradicados con una única técnica quirúrgica, pero un porcentaje elevado de los tumores malignos precisan de una combinación de técnicas a las que podemos sumar en la actualidad las distintas variedades de terapias génicas.

Una única estrategia de terapia génica quizá no sea suficiente para eliminar un tumor humano por lo que la exploración hacia las terapias combinadas se hace necesario. Se pueden asociar varias terapias génicas o unir a otras más convencionales como la radioterapia y/o cirugía. La cirugía en combinación con la terapia génica permite una disminución artificial del tamaño del tumor y una administración local del gen terapéutico, condiciones que ya se han utilizado en alguno de los ensayos clínicos descritos (23). Otra asociación interesante es la del gen que confiere resistencia múltiple a antibióticos (*mdr*, del inglés multidrug resistance) con la quimioterapia. El gen *mdr* origina un alto nivel de protección en células no neoplásicas de un paciente al ser introducido dentro de un retrovirus en células de la médula ósea (47). La transferencia de dos o más genes de citoquinas en un mismo vector o dos o más genes antiangiogénicos tienen más posibilidades de éxito que uno solo y debe ser explorado. Terapias combinadas de angiostatina y endostatina erradicaron tumores en ratón y no inducen resistencia en el animal (48). La transferencia de los genes correspondientes evitaría el suministro continuado de las proteínas durante largos periodos de tiempo.

PROBLEMAS Y PERSPECTIVAS

La terapia génica ha pasado de los laboratorios a la clínica y es quizá el momento oportuno de hacer balance de los resultados obtenidos hasta el momento para planear nuevas estrategias que hagan uso de la experiencia adquirida y, en la medida de lo posible corrijan y mejoren las nuevas terapias.

No hemos entrado en la caracterización detallada de los distintos vectores que se emplean en la actualidad para la entrega del gen terapéutico, porque las diferencias que existen entre ellos no parecen ser la causa del éxito o fracaso de la terapia. Los retrovirus tienen la ventaja, en las terapias contra el cáncer, de que sólo infectan células en división, característica fundamental y diferencial de la célula neoplásica; son de pequeño tamaño y fácil manejo. Los adenovirus por el contrario tienen la ventaja de que se pueden obtener títulos de 10^{11} partículas por mililitro de cultivo (frente a 10^6 en retrovirus) lo que permite usarlos directamente en el paciente sin necesidad de utilizar células murinas empaquetadoras/productoras cómo es el caso de las terapias en las que intervienen retrovirus. Los adenovirus provocan una respuesta inflamatoria y de rechazo inmune que pudiera ser beneficiosa en el caso de la erradicación de tumores pero tienen como inconvenientes un tamaño grande (36 kilobases, $1\text{ kb} = 1000$ pares de bases), de difícil manejo y la infección indiscriminada de células en división o quiescentes. Este último punto es irrelevante en la terapia basada en el sistema quinasa de timidina de *Herpes simplex (tk HS)* -ganciclovir ya que el ganciclovir fosforilado no ejercerá su acción mortal si la célula no entra en la replicación del ADN previa a la división. Otros vectores como los adenoasociados, derivados de *Herpes* (amplicones) o simplemente el ADN desnudo también tienen sus ventajas e inconvenientes. No existe en la actualidad un vector ideal para terapias

contra el cáncer que cumpliera las siguientes características: 1) pequeño y de fácil manejo; 2) sin riesgo de producir por él mismo una patología; 3) posibilidad de obtener un gran número de partículas infectivas *in vitro*; 4) alto grado de infectividad sólo en la célula neoplásica; 5) posibilidad de inoculación vía sistémica; 6) expresión controlable del gen terapéutico.

Las terapias de tipo destructivo siguen siendo las más prometedoras contra el cáncer. La estimulación del propio sistema inmunitario para destruir la célula tumoral sigue siendo muy atractivo. El sistema *tk HS* -ganciclovir da paso al de la linamarasa-linamarina que es más potente y tiene un efecto colateral de mayor alcance, contrarrestando así las estimaciones tan pobres en cuanto al porcentaje de células tumorales que se infectan con el vector portador del gen terapéutico. Las terapias antiangiogénicas en las que un solo vector porta varios genes antiangiogénicos ha de ser evaluada y las terapias combinadas pueden dar bastante juego. Se tiende a tratamientos personalizados iniciándose con un diagnóstico molecular a base de hibridaciones en "microchips" que nos facilite el estado genético de los diversos oncogenes y genes oncosupresores del paciente. Se utilizarán terapias combinadas en las que la terapia génica puede jugar un papel fundamental ya que sus efectos secundarios parecen ser menores que los de otras terapias más convencionales.

La terapia génica no está aún en condiciones de generalizarse como tratamiento ya que los resultados obtenidos de los primeros ensayos clínicos ofrecen mucha información valiosa para el investigador pero poco beneficiosa para los pacientes. Es en un futuro inmediato cuando, vistas las limitaciones y problemas que presenta esta terapia, son necesarias soluciones y mejoras que nos aproximen a un grado de éxitos que justifiquen su utilización masiva y general.

BIBLIOGRAFÍA

- Lander, E.S. Array of hope Nature genetics 1999; 21: 3-4.
- Cole, K.A, Krizman, D.B, Emmert-Buck, M.R, The genetics of cancer, a 3D model Nature genetics 1999; 21: 38-41.
- Resnicoff, M. et al. Rat glioblastoma cells expressing an antisense DNA to the insulin-like growth factor (IGF-I) are non-tumorigenic and induce regression of wild type tumors. Cancer res. 1994; 54: 2218-2222.
- He, Y. et al. Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter J Natl. Cancer Inst 1998; 90: 1080-1087.
- Badie, B. et al. Adenovirus-mediated p53 gene delivery potentiates the radiation-induced growth inhibition of experimental brain tumors J. Neurooncol. 1998; 37: 217-22.
- Roth, J.A. et al. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. Nature Medicine 1996; 2: 985-991.
- Roth, J.A. et al. Gene therapy for non-small cell lung cancer: a preliminary report of a phase I trial of adenoviral p53 gene replacement. Semin Oncol 1998; 25 (Supl. 8): 33-37.
- Schuler, M. et al. A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer. Hum. Gene Therapy 9 2075-82 (1998).
- Bischoff, J.R. et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science 1996; 274: 373-376.
- McGuinness, R.P. et al. Anti-tumor activity of human T cells expressing the CC49-z chimeric immune receptor. Hum. Gene Therapy 1999; 10: 165-173.
- Moolten, F.L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: Paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res 1986; 46: 5276-5281.
- Moolten, F.L. & Wells, J.M. Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transfected by retroviral vectors. Journal of the National Cancer Institute 1990; 82: 297-300.
- Moolten, F.L. et al. Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. Hum. Gene Ther 1990; 1: 125-135.
- Short, M.P. et al. Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line Journal of Neuroscience Research 1990; 27: 427-433.
- Takamiya, Y. et al. Gene therapy of malignant brain tumors: a rat glioma line bearing the herpes simplex virus type 1-thymidine kinase gene and wild type retrovirus kills other tumor cells. Journal of Neuroscience Research 1992; 33: 493-503.
- Culver, K. et al. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors Science 1992; 256: 1550-1552.

17. Ram, Z. et al. In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats *Cancer research* 1993; 53: 83-88.
18. Izquierdo, M, et al. A. Long-term rat survival after malignant brain tumor regression by retroviral gene therapy. *Gene Therapy*; 1995; 2: 66-69.
19. Namba, H. et al. Evaluation of the bystander effect in experimental brain tumors bearing HSV-TK gene by serial MRI. *Hum. Gene Therapy* 1996; 7: 1847-1852.
20. Izquierdo, M. et al. Gene therapy in brain tumors: Implications of the size of glioblastoma on its curability. *Acta Neurochirurgica* 1997; 68: 111-117.
21. Oldfield, E.H, et al. Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Human gene therapy*; 1993; 4: 39-69.
22. Ram Z et al. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nature Medicine* 1997; 3: 1354-1361.
23. Izquierdo, M, et al. Human malignant brain tumor response to Herpes Simplex thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir gene therapy. *Gene Therapy* 1996; 3: 491-495.
24. Culver K et al. Gene therapy for the treatment of malignant brain tumors with *in vivo* tumor transduction with herpes simplex thymidine kinase gene/ganciclovir system. *Human gene therapy*; 1994; 5: 343-379.
25. Mullen, C.A. et al. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selective system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 8: 33-37.
26. Huber, B.E. et al. *In vivo* antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer research* 1993; 53: 4619-4626.
27. Dong, Y. et al. *In vivo* replication-deficient adenovirus vector-mediated transduction of the cytosine deaminase gene sensitizes glioma cells to 5-fluorocytosine. *Hum. Gene Therapy* 1996; 7: 713-720.
28. Wei, M.X, Tamiya, T, Chase, M. Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene. *Human Gene Therapy* 1994; 5: 969-978.
29. Ono, Y. et al. Regression of experimental brain tumors with 6-Thioxanthine and *Escherichia coli* gpt gene therapy. *Human Gene Therapy* 1997; 8: 2043-2055.
30. Manome, Y. et al. Viral vector transduction of the human deoxycytidine kinase cDNA sensitizes glioma cells to the cytotoxic effects of cytosine arabinoside *in vitro* and *in vivo*. *Nature Medicine* 1996; 2: 567-573.
31. Cortés, M. et al. Successful use of a plant gene in the treatment of cancer *in vivo* *Gene Therapy* 1998; 5: 1499-1507.
32. Folkman, J. Antiangiogenic gene therapy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 9064-9066.
33. Denekamp, J. Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 1993; 66: 181-196.
34. Fidler, I.J. & Ellis, L.M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79: 185-188.
35. Baillie, C.T, Winslet, M.C. & Bradley, N.J. Tumor vasculature-a potential therapeutic target. *Br. J. Cancer* 1995; 72: 257-267.
36. Hanahan, D. & Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
37. Fan, T-P.D, Jaggar, R. & Bicknell, R. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *TiPs* 1995; 16: 57-66.
38. Kerbel, R.S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 1991; 13: 31-36.
39. Christofori, G. The role of fibroblast growth factors in tumor progression and angiogenesis. In *Tumor angiogenesis*. R. Bicknell, C.E, Lewis, and N. Ferrara eds. (Oxford: Oxford University Press) 1996.
40. Brown, L.F. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. In *Control of angiogenesis*, I.D. Goldberg & E. Rosen, eds (Berlin: Birkhauser Verlag) (1996).
41. Cheng, S-Y. et al. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 8502-8507.
42. Millauer, B. et al. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994; 367: 576-579.
43. Kong, H.L. et al. Regional suppression of tumor growth by *in vivo* transfer of a cDNA encoding a secreted form of the extracellular domain of the flt-1 vascular endothelial growth factor receptor. *Hum. Gene Therapy* 1998; 9: 823-833.
44. Xu, M, et al. Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors *in vivo* through a bystander mechanism without evidence of toxicity. *Hum. Gene Therapy* 1997; 8: 177-185.
45. Good, D.J. et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 6624-6628.
46. Van Meir, E.G. et al. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nature genetics* 1994; 8: 171-176.
47. Sorrentino, B.P. et al. Selection of drug-resistance bone marrow cells *in vitro* after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 257 99 (1992).
48. Boehm, T, Folkman, J, Browder, T. O'Reilly, M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance *Nature* 1997; 390: 404-407.

Efectos moleculares de las proteínas ras

L. LUCAS, J. C. LACAL

Unidad de Biología Molecular y Celular del Cáncer. Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid

INTRODUCCIÓN

La superfamilia de proteínas Ras comprende un conjunto de proteínas monoméricas de bajo peso molecular, con capacidad de unir e hidrolizar GTP (1), por lo que también se las denomina GTPasas. En esta superfamilia se incluyen miembros muy diversos con diferentes funciones biológicas que abarca desde el control de la transmisión de señales por Ras (2), Rap (3), Rho (4), Rac (5), y Ral (6); inducción de apoptosis debido a las proteínas R-ras (7) y Rho (8), la regulación del tráfico intracelular de vesículas por parte de las proteínas ARF y Rab (9), la regulación del citoesqueleto por proteínas Rho, Rac y Cdc42 (10, 11), la regulación de la transcripción génica por proteínas Ras y Rho (12, 13), o el tráfico de proteínas y RNA dentro y fuera del núcleo por la proteína Ran (14). Sin embargo, la función de algunos miembros de esta importante superfamilia es aún desconocida.

Los genes *ras* han sido objeto de intensa investigación. Fueron primeramente aislados de retrovirus causantes de tumores murinos y posteriormente redescubiertos a partir de tumores humanos e identificados como los primeros oncogenes humanos (15). Se han encontrado genes *ras* activados en una amplia variedad de tumores, si bien la incidencia varía mucho de unos tipos de tumores a otros (16). Se estima que aproximadamente un 30% de los tumores humanos presentan un gen *ras* activado, siendo el oncogén más importante descubierto hasta la fecha.

La familia de genes *ras* incluye tres variantes [Harvey-ras (H-ras), Kirsten-ras (K-ras) y N-ras] (1) que codifican para proteínas de 21 kD y se caracterizan por su capacidad de unir nucleótidos de guanina (GDP o GTP). Las proteínas Ras y las GTPasas en general se encuentran en estado basal inactivo, unidas a GDP, mientras que varios estímulos las activan produciéndose un intercambio del GDP por GTP (Fig. 1). La proteína

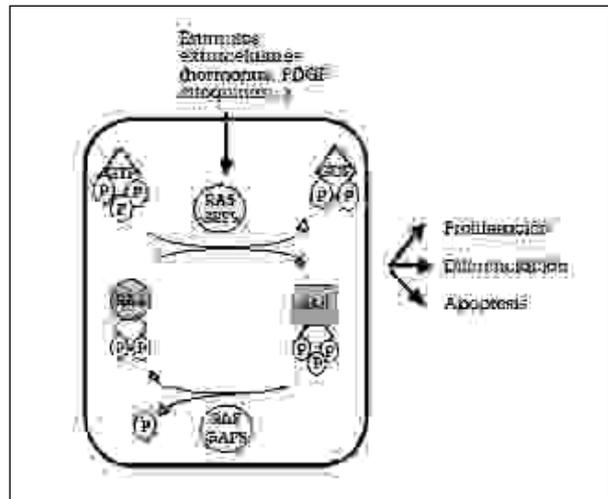


Fig. 1. Mecanismo de activación de las proteínas Ras. El ciclo de activación consiste en la sustitución del GDP unido a la proteína Ras mediante factores de intercambio específicos (GEFs), regulados a través de receptores de factores externos. La inactivación se produce por la hidrólisis del GTP unido mediante la catálisis mediada por factores específicos (GAPs).

Ras permanece unida a GTP hasta que su actividad GTPasa lo hidroliza dando lugar a GDP, volviendo al estado basal (2). Este ciclo se encuentra regulado por proteínas GAP (proteína activadora de la actividad GTPasa) que aumentan la actividad GTPasa de Ras favoreciendo su paso a la forma inactiva. La reacción inversa, es decir el intercambio de GDP por GTP, está catalizada por factores de intercambio específicos o GEFs (17), a su vez regulados por señales externas.

Mutaciones puntuales de las proteínas Ras en los aminoácidos de diversas posiciones (frecuentemente en residuos 12, 13 y 63) hacen que Ras sea insensible a la

acción de GAPs, quedando constitutivamente activa. Estas mutaciones son las más frecuentemente encontradas en tumores humanos aunque pueden verse variaciones dependiendo del tipo de tumor. Son más frecuentes en tumores de colon, pulmón, tiroides y carcinomas pancreáticos (18). A pesar de ello se cree que la frecuencia de mutaciones de Ras es probablemente una infravaloración sobre como contribuyen estas señales aberrantes a la formación de tumores humanos ya que puede darse una regulación crónica de la vía de Ras sin necesidad de tener un Ras mutado (19).

Las proteínas Ras se encuentran asociadas a la cara interna de la membrana plasmática y esta localización es esencial para su función biológica. La asociación a la membrana se produce tras la farnesilación en la cisteína de la posición 186 (20). Este proceso es seguido por proteólisis de los tres últimos residuos de la molécula (C-AAX) en la región carboxiterminal, región conservada en todas las proteínas Ras. Todas las proteínas, excepto *K-ras* se palmitoilan en un segundo residuo de cisteína próximo a la cisteína 186, localizada en el dominio hipervariable (20). Los mutantes incapaces de localizarse en la membrana son biológicamente inactivos y cuando se sobreexpresan interfieren con la función de las proteínas Ras endógenas.

Estudios bioquímicos, genéticos y moleculares en *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* y células de mamíferos han demostrado que las proteínas Ras juegan un papel central en rutas de transmisión de señales. Ras está implicada en transmisión de señales inducidas por receptores tirosina quinasa (21). Son muchos los estímulos externos (factores de crecimiento, citoquinas y hormonas) que llevan a cabo su función a través de receptores con actividad intrínseca tirosina quinasa o asociados a proteínas quinasas con esta actividad. En fibroblastos y células epiteliales la activación de receptores por factores de crecimiento induce crecimiento celular (21), además, si la señal proliferativa se mantiene ya sea como resultado de una respuesta autocrina (*v-sis*), por amplificación del receptor (receptor de EGF en carcinoma de mama) o por activación del receptor en ausencia de ligando (*neu*, *v-fms*, *trk*) las células adquieren fenotipo transformado (21, 22).

Por tanto, las proteínas Ras funcionan como mediadores en la transmisión de señales que van desde el exterior hasta el citoplasma, interaccionando con un amplio número de reguladores y efectores para controlar rutas que influyen el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (23). En este papel mediador de las proteínas Ras radica la complejidad de las redes de transmisión de señales en las que están implicadas.

AF: EFECTOR CLAVE DE PROTEÍNAS RAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA CASCADE DE QUINASAS CITOPLÁSMICAS

Las proteínas Raf constituyen una familia de proteínas quinasas con especificidad por residuos de serina y treonina que juegan un papel relevante en la regulación

de las señales mitogénicas. Existen varias isoformas (Raf1, A-Raf, B-Raf) y posiblemente cada una de estas isoformas presenta sistemas de regulación diferentes (24). Sin embargo, son muchas las evidencias que dan a Raf y a su cascada de activación un papel fundamental en la función de Ras. Entre ellas se ha visto que mutantes dominantes negativos de Raf-1, MEKs y MAPKs bloquean la transformación por Ras (6). Mutaciones constitutivas de Raf-1 producen un fenotipo transformado y tumorigénico semejante al que producen mutaciones en Ras (25), de igual forma mutaciones activantes de MEKs van a dar lugar a un crecimiento y morfología transformadas en células NIH3T3 (26). Además, la activación constitutiva de Raf-1 puede obviar la inhibición de Ras bien por un dominante negativo (Ras N17) o por bloqueo con un anticuerpo monoclonal específico (Y13-259) (27).

Señales extracelulares como factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y neurotransmisores activan a las proteínas Ras a través de algún tipo de receptor de la superficie celular, fundamentalmente receptores tirosina quinasa (RTKs), aunque también pueden ser receptores asociados a no-RTKs, y receptores acoplados a proteínas G (SRs) (23). Una de las rutas mejor caracterizadas que involucra la activación de Ras implica al receptor para EGF (EGFR) (23, 28) (Fig. 2). Tras la fosforilación del receptor en residuos específicos de Tyr de su dominio citoplasmático se crean sitios de fosforilación para el dominio SH2 de Shc y Grb2 y/o dominios de unión fosforilados para Shc y/o Grb2 (29). Shc se autofosforila tras la asociación con RTKs lo que a su vez produce sitios de reconocimiento para el dominio SH2 de Grb2, que como se encuentra establemente asociado a Sos (GEF específico de Ras) produce la traslocación de Sos a la membrana, sitio en donde se encuentra Ras, dando lugar a una elevación transitoria de los niveles de Ras-GTP (30). Por tanto, Shc, Grb2 y Sos son el punto de

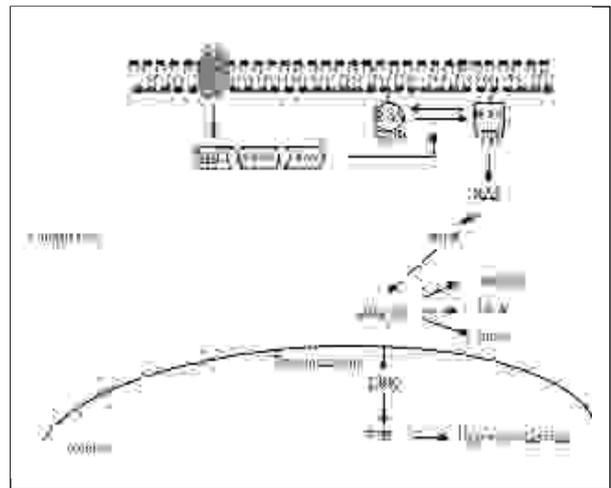


Fig. 2. Participación de Ras en la transmisión de señales del exterior al núcleo. Ciertos receptores de factores de crecimiento inducen la activación de Ras, produciendo a su vez la activación de la cascada de quinasas Raf/MEK/ERK. Las quinasas ERK se translocan al núcleo donde fosforilan y activan factores de transcripción como Elk1, que regulan la expresión génica.

unión entre muchos tipos de activadores de la superficie celular y Ras.

Ras unido a GTP se une directamente a Raf y tras esta asociación se produce la traslocación de Raf a la membrana plasmática desde donde va a fosforilar y activar las quinasas MEK1/2, responsables de la fosforilación y activación de otra quinasa citoplásmica, las ERKs. Las MEKs se unen directamente al dominio catalítico de Raf, y como resultado son fosforiladas y en consecuencia activadas (31). Las MEKs a su vez fosforilan residuos de tirosina (Tyr) y treonina (Thr) de las ERKs (ERK1/2), también llamadas MAPKs o p44^{MAPK} y p42^{MAPK} (32).

Tras su activación, las MAPKs se traslocan al núcleo provocando la fosforilación de una serie de sustratos. Entre éstos destaca Elk-1 (Factor de transcripción nuclear) (33) que se asocia con el factor de respuesta a suero (SRF) y ambos se unen a las secuencias específicas del ADN denominadas SRE (elemento de respuesta a suero), presentes en un gran número de promotores, como c-fos (34). Alternativamente, la activación de la MAPKs induce la activación de otras quinasas como la p90-rsk, una Serina/Treonin quinasa con un importante papel en la regulación de la síntesis de proteínas (35). También puede activar la fosfolipasa A2 y dianas citoplasmáticas como Rsk (36) y Mnk (37). Por tanto, la cascada Ras-Raf-MEK-ERK tiene la capacidad de llevar la señal al núcleo celular, regulando transcripción.

A pesar de la aparente linealidad Ras-Raf, existen evidencias que indican que la activación de Raf es un mecanismo complejo. Las proteínas Ras se unen a dos regiones del dominio amino terminal de Raf, concretamente en las regiones llamadas RID/RBS1 (residuos 51-131) y Raf-CRD (38). Mediante la interacción de Ras con este segundo sitio de unión de Raf, rico en cisteínas, se produce la activación de otras moléculas. Esto sugiere que Ras además de regular la traslocación de Raf a la membrana, podría participar en eventos que conduzcan a su activación (39). Otros componentes que pueden estar influyendo en la activación de Raf son al menos dos isoformas de las proteínas 14-3-3, los chaperonas Hsp90 y p50, ciertos fosfolípidos (fosfatidilserina), ser/treonin quinasas, tirosin quinasas y KSR (quinasa supresora de Ras) (40). Las proteínas 14-3-3 pueden existir como homodímeros y forman complejos con diferentes proteínas (BCR, CDC45, A20, PKC, y otras), sugiriendo que pueden funcionar como adaptadores (41) de modo que podrían acercar proteínas que activen Raf o incluso podrían promover la dimerización Raf-Raf (42). Además, estas proteínas interactúan con múltiples regiones de Raf pudiendo actuar como reguladores negativos. Por otro lado, Raf también puede ser activado por mecanismos que no dependen de Ras como es el caso de la activación directa de PKC sobre Raf, o la activación por la tirosina quinasa Src (43). Recientemente se han propuesto otras proteínas como Ksr y Cnk como importantes componentes en el mecanismo de activación de Raf mediada por Ras (44, 45).

De igual forma, MAPKs pueden activarse por mecanismos mediados por integrinas en los que no participa Ras (46). Sin embargo, la actividad transformante de

MEKs es aún dependiente de Ras (47). También, se sabe que las MAPKs pueden fosforilar MEKs y activarlas, aunque las consecuencias funcionales no están muy claras (48). Por tanto, la interacción Ras-Raf no es exactamente lineal y precisa de la formación de multicomplejos para completar la activación de Raf. Además, cada proteína de señalización tiene varias dianas en la cascada y cada componente va a poder ser activado por otros componentes situados por encima de él en la misma ruta. Existen sistemas de retroalimentación y mecanismos autocrinos con cierta frecuencia. Podemos deducir por tanto, que Raf no es el único efector de Ras y que vamos a necesitar la asociación de probablemente un elevado número de efectores para obtener una función completa de Ras (49).

CONTRIBUCIÓN DE RUTAS INDEPENDIENTES DE RAF EN LA TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR RAS

Estudios realizados con mutaciones en Ras que discriminan entre distintos efectores sugieren que hay múltiples efectores implicados para establecer y mantener el fenotipo transformado por Ras (36, 50). Raf es una importante diana de Ras con un papel fundamental en su señalización en condiciones normales. Sin embargo, la interacción de Ras con otros efectores parece ser crítico para mediar la transformación por Ras. Además de Raf, han sido descritos varios efectores con sus consiguientes rutas de activación. Aunque se están haciendo grandes progresos en conocer todos los componentes de estas rutas, la complejidad de las mismas hace que no todas ellas estén identificadas en la actualidad. A continuación se describen los candidatos a efectores de Ras que se han descrito hasta la fecha.

P¹²⁰RAS-GAP Y NF1/NEUROFIBROMIN

Son GAPs para Ras, es decir catalizan la hidrólisis del GTP unido y por tanto presentan una clara función negativa en la regulación de Ras (49). Aunque p¹²⁰Ras-GAP fue el primer candidato a efector de Ras (51), posteriormente se han generado evidencias por las que podían no ser considerados efectores de Ras. Entre las que apoyan su condición de no efectores para Ras se encuentran, además de su función negativa en la regulación de Ras, trabajos en los que tras realizar mutaciones en el dominio efector de Ras, que impedian la unión de p¹²⁰Ras GAP o NF1, Ras seguía manteniendo una fuerte capacidad de transformación (52). Por otra parte, se ha visto que ratones deficientes en uno u otro gen no son viables y mueren durante la embriogénesis (59).

Resultados de otros laboratorios apoyan la posible función efectora de las proteínas GAPs de Ras. Las evidencias para p¹²⁰Ras GAP estaban basadas en estudios que evalúan la actividad del fragmento amino terminal, que no tiene el sitio de unión a Ras ni capacidad de estimulación de la actividad catalítica GTPasa. Este fragmento amino terminal está formado por un dominio SH3 flanqueado por dos dominios SH2, un dominio

homólogo a pleckstrina (PH), un dominio de unión a Ca^{2+} y un sitio de interacción para fosfolípidos. En un estudio se vio que se requería el complejo Ras-p¹²⁰GAP para inhibir la apertura del canal de K^+ activado por receptores muscarínicos, más tarde se determinó que un fragmento del extremo amino terminal podía causar el mismo efecto de forma independiente a Ras (53). Además, tras bloquear el dominio SH3 con un anticuerpo se impidió la ruptura de vesículas germinales inducida por Ras en oocitos de *Xenopus*, pero no se bloqueó la activación de MAPK (54). La coexpresión de un fragmento NH2 terminal bloqueó la actividad transformante de H-Ras (55). Este fragmento bloqueó además la activación de JNK por Ras pero no las MAPK. También se encontraron alteraciones en la morfología celular y en la organización del citoesqueleto de actina tras sobreexpresar este fragmento amino terminal (56).

Todos estos resultados sugieren que p120GAP puede tener un papel dual como regulador negativo de Ras y como proteína de conexión para promover la formación de complejos entre Ras y rutas de señalización dependientes de Ras-GTP. Un modelo propuesto hace algunos años, pero que aún permanece vigente, sería que tras la unión de Ras-GTP al dominio catalítico terminal carboxílico de p120GAP quedarían expuestos motivos de unión proteína-ligando de la región amino terminal. La posterior unión de componentes a este dominio amino terminal activaría una ruta de señalización. Moléculas como p190Rho-GAP, p62 dok y G3BP se unen a p120GAP, apoyando esta hipótesis (55) (Fig 3).

También se han encontrado funciones para NF1 como efector de Ras. Los indicios sugieren que esta función efectora esta más relacionada con la supresión

del crecimiento que con la promoción (58). De forma semejante a p¹²⁰GAP una porción de 220 KD no está relacionada con su función catalítica, por tanto podría estar implicada en una función efectora. En tumores deficientes en NF1 se ha visto que no están elevados los niveles de Ras-GTP, y cuando se introdujo la secuencia completa de NF1 en estas células se vieron reducciones en el crecimiento (59). Esto sugeriría que la pérdida de funcionalidad de NF1 contribuye al desarrollo de estos tumores. Además, la sobreexpresión de NF1 inhibió el crecimiento transformante de células que expresaban mutantes de Ras constitutivamente activos, reduciendo tres veces la capacidad transformante de H-ras, pero no de Raf (59). En estas condiciones también se redujo la activación de MAPK, fenómeno que fue revertido con la introducción de Raf activado (60). Por último, la introducción de la secuencia completa de NF1 en células de carcinoma de colon (con K-ras mutado y por tanto insensible a la actividad GAP de NF1) inhibió el crecimiento de estas células en agar blando y la formación de tumores en ratones desnudos (60). Por tanto podría pensarse en un papel de NF1 como efector de Ras para funciones distintas a la transformación, lo que en parte explicaría por qué mutaciones en el dominio de Ras que impiden su unión a NF1 siguen manteniendo su capacidad transformante.

RAL-GDS (ESTIMULADOR DE LA DISOCIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS DE GUANINA PARA RAL)

Originalmente fue identificada como una proteína relacionada con CDC45 (GEF para Ras en levaduras),

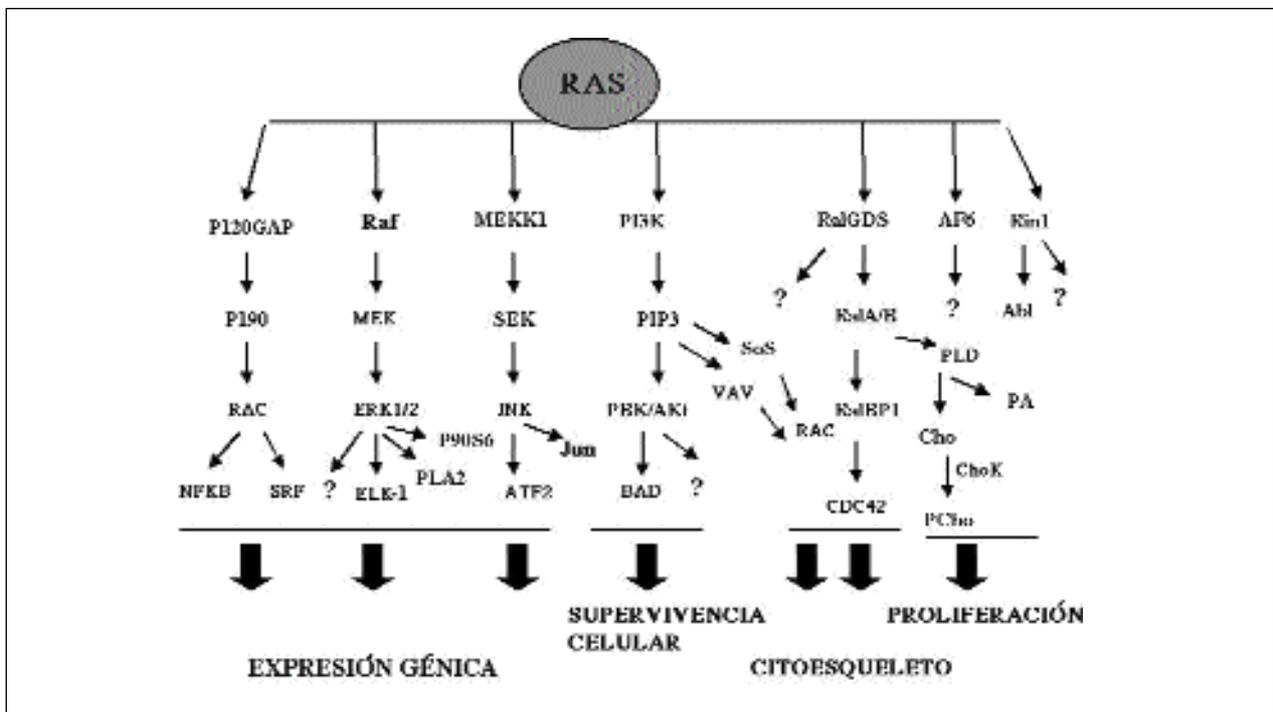


Fig. 3. Se representan esquemáticamente las rutas alternativas que se activan como resultados de la interacción con la proteína Ras. Ver texto para más detalles.

más tarde se vio que ejercía su función de GEF para Ral A y Ral B (61). Algunos autores encontraron que Ral A cooperaba con Ras para producir transformación (62), sin embargo, esta cooperación no ha podido ser reproducida por otros autores (63). Quizá Ral-GDS se una a otras proteínas que influyan en el fenotipo transformado por Ras pues existen precedentes de moléculas GEFs que tienen múltiples funciones, como es el caso de Sos, que además de ser un GEF para Ras hace que Ras se acople a Rac a través de sus dominios Dbl y PH de forma dependiente de PI3K (64).

Ral-GDS, y dos miembros de su familia, RGL y RGL2 son posibles efectores para Ras y moléculas relacionadas con Ras como Rap, R-Ras y TC21/R-Ras2 (65). En ensayos *in vitro*, se ha visto que el dominio COOH terminal no catalítico de estas moléculas interacciona con el dominio efector de Ras de forma dependiente de GTP y que estas moléculas compiten con Raf-1 por la unión al dominio efector de Ras. También se ha observado asociación entre Ras y Ral-GDS en células COS (66). Además la actividad GTPasa de los Ras-GAP (p¹²⁰GAP y NF1) se inhibe por Ral-GDS, lo que sugiere que Ral-GDS, igual que Raf-1, interacciona con Ras a través de su dominio efector de manera dependiente de GTP.

Por otro lado, aunque Ral-GDS y otras proteínas de esta familia también se unen a proteínas relacionadas con Ras, se ha visto que en ensayos de expresión transitoria sólo Ras y no Rap o R-Ras2 es capaz de incrementar la actividad Ral-GEF de Ral-GDS (62). Esta observación pone de manifiesto la habilidad de una proteína en particular para unirse *in vitro*. Si esta unión se produce *in vivo* y si ello conduce a la estimulación de alguna función queda aún por establecerse.

Otras evidencias apoyan un papel de Ral-GDS como regulador positivo en la transformación por Ras. La coexpresión en NIH3T3 de dominios aislados de unión a Ras procedentes de RGL y RGL2 inhiben la actividad transformante de Ras pero no la de Raf-1 (65). Aunque Ral constitutivamente activo de forma aislada no es suficiente para inducir la transformación, su coexpresión con Ral-GDS incrementa la transformación por Ras y es inhibida con un dominante negativo de Ral (62). A pesar de ello, otros estudios no encontraron una regulación significativa de la actividad transformante de Ras por proteínas mutantes de Ral A o Ral B (67). Por último, Ral-GDS y Raf-1 activado cooperan de forma sinérgica para inducir transformación en NIH3T3 (36, 67).

Por tanto, no está aún establecido si el crecimiento o promoción del crecimiento vistos con Ral-GDS se debe a que activan las proteínas Ral, ya que se sabe que éstas a su vez pueden activar otras moléculas como Cdc42, Rac y la fosfolipasa D (68). Por otra parte podría ser que Ral-GDS sea capaz de realizar otras funciones además de su actividad Ral-GEF (Fig 3).

FOSFATIDILINOSITOL (3) QUINASA (PI3K)

El enzima PI3K una quinasa lipídica que fosforila

fosfoinosítidos con preferencia por la posición 3 del anillo de inositol (69). Está formada por una subunidad catalítica (p110) y una reguladora (p85) (70). Al menos dos isoformas de la subunidad p110 (a y b) tienen afinidad por unirse a la forma Ras-GTP del dominio efector de Ras (69). La activación de PI(3)K por una gran variedad de estímulos extracelulares conduce a la producción de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), un importante segundo mensajero que interacciona con el dominio PH de la ser/treonin quinasa Akt/PKB, y la fija a la membrana plasmática induciendo su activación parcial (71). PDK1 (kinasa reguladora de lípidos) es capaz de fosforilar y activar Akt/PKB (72). No está totalmente definido que es lo que ocurre tras la activación de esta molécula, pero se sabe que Akt/PKB fosforila e inactiva la proteína pro-apoptótica BAD (73) (Fig 3). PIP3 también tiene la capacidad de unirse a los dominios PH de Vav (74), Sos (64) y GRP1 (75). Además, la activación de PI3K por interacción directa entre Ras y la subunidad catalítica p110 es necesaria para que se produzca la reorganización del citoesqueleto de actina como consecuencia del fenotipo transformado (63).

Existen observaciones que sitúan a PI3K tanto por encima como por debajo de Ras en la cascada de activación. Podría estar situada tras Ras pues en células COS transfectadas con Ras activado se produce un incremento en los niveles de inosítoles fosfato derivados de la PI3K, a diferencia de la transfección con Raf que no afecta sus niveles. Por tanto, podría existir convergencia de las rutas de Raf y PI3K a nivel de Ras (70). Además se ha visto que igual que Ras, R-Ras pero no Rap1A se une y activa PI3K (76).

Entre los indicios que sitúan a la PI3K por encima de Ras, la activación de Ras por PDGF requiere que el receptor de PDGF se fosforile en sitios que son de reconocimiento y unión para la subunidad p85 (77). Además la forma activada de p110 induce la elevación en los niveles de Ras-GTP *in vivo* (78). Esta aparente contradicción en los papeles de PI3K respecto a Ras puede explicarse teniendo en cuenta que dependiendo del tipo de estímulo extracelular o bien del tipo celular, la PI3K va a poder actuar por encima como un activador o por debajo como un mediador de la función de Ras.

MEKK1

El enzima MEKK1 es una Serina/treonina quinasa que se ha demostrado puede unirse directamente a la proteína Ras mutada expresada en bacterias. Esta interacción es dependiente de GTP, se produce a través del dominio quinasa del extremo carboxilo terminal y es bloqueada por un péptido efector de Ras (79). Si bien estos resultados han sido la base para considerar a la MEKK1 como un efector de Ras, no se ha conseguido demostrar su interacción en condiciones fisiológicas, por lo que su papel como efector de Ras está cuestionado. MEKK1 se activa en respuesta a distintos estímulos extracelulares incluyendo una gran variedad de factores,

radiaciones UV y Ras activo. Como consecuencia de la activación de la MEKK1, se produce la activación SEK (MAPKK), que a su vez activaría otra quinasa relacionada con la puesta en marcha de la muerte celular programada, JNK/SAPK (80). La sobreexpresión de MEKK1 produce apoptosis por lo que parece improbable que sea un efector positivo importante en la transformación por Ras (81) (Fig 3).

AF6/RSB1

Fue identificado por el sistema de los dos híbridos de levadura como una de las proteínas que se unen a Ras y también por afinidad cromatográfica con proteínas que se unen a Ras-GTP (82). Se expresa en una gran variedad de tejidos y tiene un alto grado de similitud en el gen *canoe* de *Drosophila* cuya función se ha identificado con rutas de señalización por debajo del receptor Notch, actuando como regulador de la diferenciación celular (83). Mediante ensayos *in vitro* se ha visto que el dominio amino terminal de AF6 y *canoe* interactúan específicamente con la forma Ras-GTP y que esta interacción interfiere en la unión de Ras con Raf-1 (82). A pesar de ello aún no se ha determinado una función para AF6. Algunos autores, debido a su interacción con uno de los mutantes del dominio efector de Ras, RasV12C40, no descartan un posible papel de AF6/*canoe* de coordinación de eventos en la membrana plasmática para remodelar el citoesqueleto de actina (46) (Fig 3).

RINI (RAS INTERFERENCE GENE 1)

Fue identificado por ser capaz de suprimir el fenotipo asociado a una activación constitutiva de Ras en *S. Cerevisiae* (85). Rin1 interactúa directamente con Ras-GTP y se localiza en la membrana plasmática (86). Rin1 puede acelerar la actividad transformante de Abl y rescatar la transformación por mutantes defectivos de Abl (87). No se ha identificado la función de esta proteína respecto a Ras pero probablemente coordine señales desde Ras a Abl (Fig 3).

PROTEÍNAS RHO

Una de las primeras evidencias que relacionaron a las proteínas Rho como posibles efectores de Ras fue la asociación entre la proteína p190 (GAP para Rho, Rac y CDC42) y p120RasGAP (88), un efector de Ras como ya se ha descrito. Varios estudios han demostrado el requerimiento de miembros de la familia de proteínas Rho para la actividad transformante por Ras (5), pero los mecanismos exactos por los que las señales procedentes de Ras se transmiten para activar Rho no han sido aún caracterizados. Además, no ha sido demostrado si en células transformadas por Ras existen niveles elevados de algún miembro de la familia de proteínas Rho unido a GTP.

CONTRIBUCIÓN DE LOS EFECTORES DE RAS A LA TRANSFORMACIÓN CELULAR

Como norma general, todos los candidatos a efector de Ras reconocen Ras unido a GTP y al menos un dominio efector intacto (residuos 32-40). Una característica común a todas estas proteínas es que mutaciones en este dominio efector tienen como consecuencia la pérdida de unión a Ras. Por tanto, esta región es imprescindible y compartida por todas las moléculas efectoras de Ras.

La interacción de Ras con sus efectores es generalmente directa (observada mediante ensayos *in vitro* con proteínas purificadas). Todos ellos tienen preferencia por Ras-GTP. Los dominios que abarcan los residuos 30-37 (Switch I) y 59-76 (Switch II), que definen las diferencias de conformación entre Ras-GDP y Ras-GTP, están implicados en el reconocimiento del efector por tanto, no es de extrañar que mutaciones en regiones próximas o incluso superpuestas al dominio efector impidan la unión de algunos efectores (36, 50) (Fig 4). Recientemente se ha propuesto otra secuencia de unión a efectores, denominada dominio RA (89), pero hasta el momento no se ha demostrado si este dominio es un sitio de unión para Ras. Queda por determinarse si los candidatos a efector de Ras presentan una estructura primaria o terciaria común que defina sus propiedades de unión a Ras.

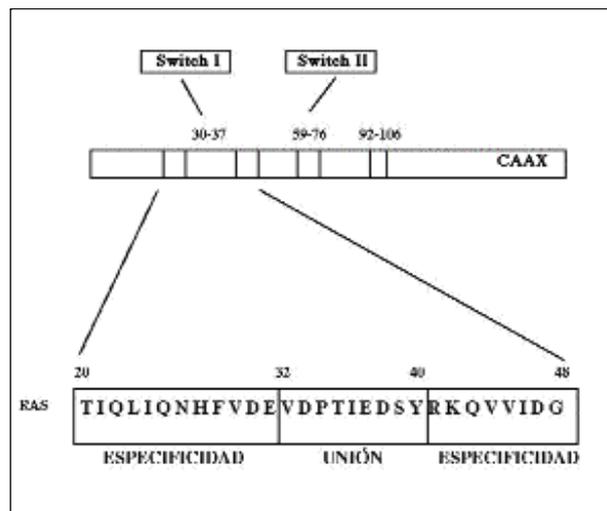


Fig. 4. Esquema de la secuencia primaria de la proteína Ras donde se indican las regiones efectoras Switch I (aminoácidos 30-37) y Switch II (aminoácidos 59-76). En la parte inferior se expande la región Switch I con indicación de los residuos comunes que participan en la unión de diversos efectores y las regiones adyacentes que confieren especificidad.

El descubrimiento de las regiones efectoras de las proteínas Ras en la que diferentes mutaciones puntuales permitían la interacción selectiva con efectores conocidos, ha permitido establecer la contribución relativa de cada uno de ellos a la transformación celular inducida por proteínas Ras (36, 50). Este sistema se ha convertido sin duda en uno de los procedimientos más elegantes para estudiar la contribución de cada uno de los efectores

a las diferentes rutas de señalización mediada por Ras. Estos estudios han permitido definir que existen diferentes combinaciones de los tres efectores mejor estudiados de Ras (Raf, Ral-GDS y PI3K) que presentan capacidad transformante, y que ninguno de estos efectores es absolutamente necesario para la transformación. También se ha podido implicar a otros posibles efectores con funciones específicas atribuidas a las proteínas Ras. Así, el uso de mutantes del dominio efector de Ras tales como RasV¹²C⁴⁰ que está impedido para unirse a Raf-1 y a Ral-GDS, mantiene su capacidad de interacción con PI3K, dando lugar a rizamientos en la membrana (90). Además, puede intervenir en la modulación del citoesqueleto de actina por interacción con AF6 (46). Por otro lado la capacidad de este mutante, en combinación con el mutante RasV¹²G³⁷, capaz de interactuar con Ral-GDS pero no con Raf o PI3K, para producir transformación tumorigénica demuestra que vías independientes de Raf-1 son suficientes para producir transformación por Ras (36).

Estrategias alternativas, como la sobreexpresión o unión a la membrana de efectores específicos de Ras también permiten responder a la pregunta sobre su capacidad transformante. Como ejemplo, la ubicación en la membrana mediante la incorporación del dominio de unión a membrana de Ras, como en el caso de Raf-CAAX o PI3K-CAAX. Ambas construcciones presentan capacidad transformante por sí solos, demostrando su importancia en las rutas de señalización mitogénicas. Por último, una tercera vía es estudiar si existe transformación por el oncogén *ras* en fibroblastos procedentes de ratones deficientes en un efector específico. En resumen, las proteínas identificadas hasta la fecha como posibles efectores de las funciones de Ras pueden ser mediadores críticos de su función normal o de su capa-

cidad transformante. En algunos casos, su papel preciso sigue siendo una incógnita.

CONTROL DEL CICLO CELULAR POR RAS

Las proteínas Ras interactúan con un espectro de efectores dando lugar a diferentes respuestas fisiológicas que incluyen fundamentalmente, aunque no de forma exclusiva, la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. La activación de Ras en condiciones normales regula diferentes moléculas que intervienen en la progresión del ciclo celular. Estas moléculas pueden ser reguladores positivos como las ciclinas dependientes de kinasas (CDK) y negativos como los inhibidores de CDK. La mayoría de las características conocidas de la transformación mediada por Ras resultan de una señalización inapropiada o desregulada que afecta el control normal del ciclo celular.

SEÑALES INHIBITORIAS

Recientemente dos estudios han apuntado el mecanismo molecular por el que las células primarias son resistentes a la transformación por Ras. En este tipo de células la activación de la cascada Ras/Raf/MAPK induce la activación de p53 y ésta a su vez activa la proteína inhibidora de CDK (CDKI) p21 cip1 dando lugar a la parada del ciclo celular (94). Por otro lado, se ha visto que en fibroblastos primarios de roedores y mamíferos esta parada de ciclo celular se asocia a la inducción de p21 cip1 y p16INK4a (95) (Fig. 5). Además, los fibroblastos normales en donde ha habido parada del ciclo celular por Ras presentan un fenotipo indistingui-

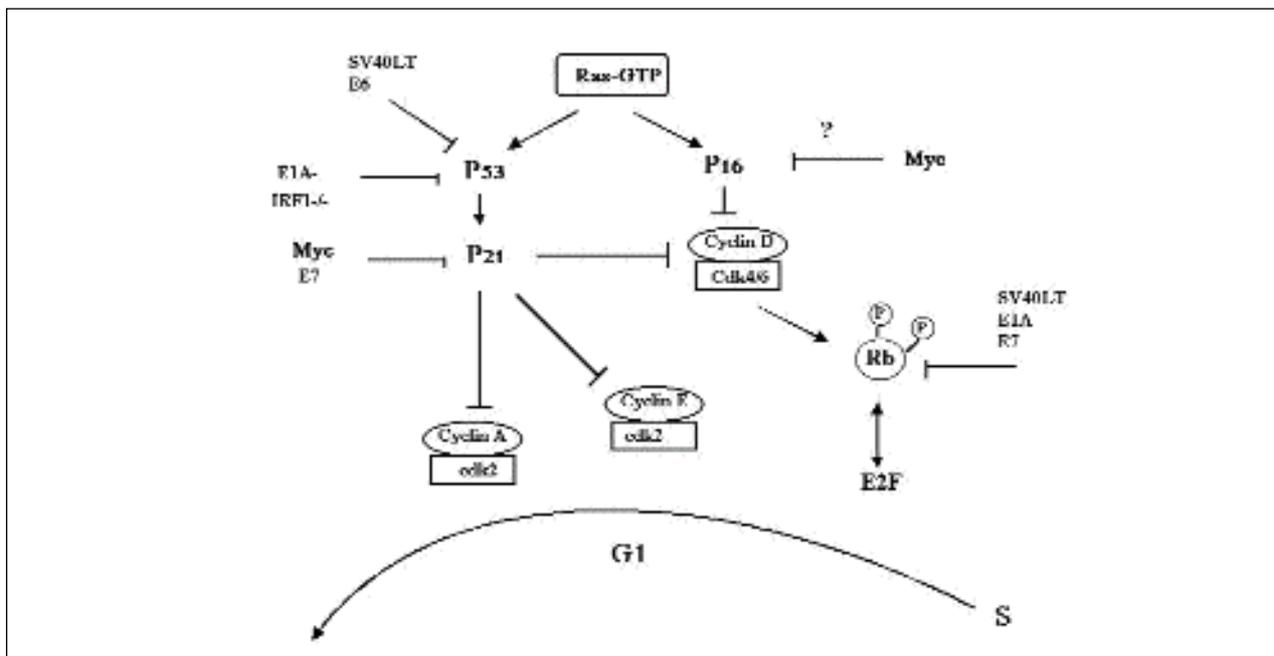


Fig. 5. Participación de proteínas Ras en la regulación de diversos componentes reguladores del ciclo celular como p53 y p16, y sus efectos en los elementos críticos como las quinasas dependientes de ciclinas, Rb y el factor de transcripción E2F.

ble de la senescencia (95) asociado a la inducción de CDKI como p21^{cip1} y p16^{INK4a} (95).

COOPERACIÓN CON RAS

En células primarias de Schwann la atenuación de p21^{cip1} ya sea por inhibición de p53 o por inducción de la expresión antisentido, produce la pérdida de la inhibición del crecimiento por Ras. Del mismo modo, la expresión de Ras activado en células deficientes en p16 (p16^{+/−}) o p53 (p53^{+/−}) no presenta inhibición del crecimiento (95).

En fibroblastos humanos la situación es más complicada ya que la inactivación tanto de p53 como de la vía Rb/p16 de forma independiente, no es suficiente para producir la parada de ciclo celular por Ras, mientras que la expresión del adenovirus E1A, que es capaz de bloquear ambas vías, puede sobreponer la inhibición del crecimiento por Ras (95).

Estos resultados estarían de acuerdo con las observaciones de que la inactivación de p16 o p53 es suficiente para sobreponer la senescencia en fibroblastos de roedores, y que la inhibición de ambas es necesaria en células humanas (96). Una explicación para estas diferencias entre células de roedor y humanas podría ser que en fibroblastos murinos los niveles de p53/p21^{cip1} o p16 inducidos por Ras o durante la senescencia son insuficientes de forma individual para detener el crecimiento celular. Otra diferencia es que las células primarias de roedores transformadas por Ras y E1A son inmortales, mientras que fibroblastos humanos que sobreexpresan ambos entran en un estado de crisis inducido por el acortamiento de los telómeros.

SEÑALES PROLIFERATIVAS

Ras induce proliferación y transformación en muchas células normales que expresan otros oncogenes y en la mayoría de las líneas celulares inmortalizadas espontáneamente. Así, Ras tiene efectos contrarios sobre el ciclo celular a los descritos anteriormente. Probablemente las señales necesarias para la parada de crecimiento inducidas por Ras se pierden durante el proceso de inmortalización (97). Una excepción la constituye la línea celular REF-52 que sigue manteniendo la capacidad de responder negativamente para Ras (98), seguramente porque el proceso de inmortalización de esta línea es por otra vía independiente. Recientes estudios han relacionado a Ras con Rb (99) en donde Ras parece ser necesario para la inducción de la ciclina D1 y la

consiguiente fosforilación e inactivación de Rb. Por tanto, células deficientes en Rb (Rb^{−/−}) no necesitarían la actividad de Ras para dividirse (99).

En la mayoría de las líneas celulares inmortalizadas la activación de la vía de señalización de Ras induce proliferación, sin embargo, incluso para células inmortalizadas la situación no está clara. La fuerte sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento, altos niveles de Ras activado, o la expresión constitutiva de Raf puede dar lugar a inhibición del crecimiento celular por inducción de p21^{cip1} (100). Estas observaciones demuestran como diferencias cuantitativas en la actividad de una ruta de señalización puede tener efectos opuestos sobre el ciclo celular. Por otro lado, mediante el mutante Ras^{V12C40} se ha visto que la vía de PI3K sinergiza con la vía de Raf para inducir la síntesis de DNA y la pérdida de inhibición por contacto (63). En esta situación Ras, mediante la activación de PI3K, protege frente a la muerte celular para conectar las señales proliferativas (101).

FUTURAS DIRECCIONES

La frecuente asociación de mutaciones de Ras con cánceres humanos ha sido la base para plantear aproximaciones farmacológicas que antagonizaran la función de Ras o moléculas relacionadas, como sus efectores. Con este fin, se han utilizado inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI) (91) que impiden el anclaje de Ras a la membrana plasmática y en consecuencia su total función. Esta aproximación puede no ser apropiada debido a que Ras es una molécula central en muchas otras rutas y a que existen otras moléculas importantes en rutas metabólicas o de señalización no mitogénica que también se farnesilan. Por ello intervenir sobre alguna de las dianas situadas por debajo de Ras podría tener ciertas ventajas. Numerosos grupos se encuentran en la actualidad diseñando inhibidores de los componentes de la cascada Raf-MEK-MAPK y otras, pero por el momento solo se dispone de estudios preliminares. También están siendo sometidos a estudio inhibidores del enzima colina quinasa (92). Este enzima es activado por Ras por un mecanismo todavía no dilucidado completamente y es la principal responsable de la producción de fosforilcolina (PCho), un derivado lipídico implicado en mitogénesis (93). La posibilidad de bloquear una o varias rutas en las que esté interviniendo Ras interferiría con mayores garantías su función transformante, revertiendo las propiedades de crecimiento maligno e invasivo que tienen las células cancerígenas en las que participe este oncogén.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lacal, J.C. and McCormick, F. The ras superfamily of GTPases. (1993). CRC Press, CRC Press Inc, Florida.
2. Lacal, J.C. and Carnero, A. Regulation of Ras proteins and their involvement in signal transduction pathways (Review). (1994). *Oncology Reports*, 1, 677-693.
3. Cook, S.J. and McCormick, F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. (1993). *Science*, 262, 1069-1071.
4. Perona, R., Esteve, P., Jiménez, B., Ballester, R.P. and Lacal, J.C.. Tumorigenic activity of rho genes from *Aplysia californica*. (1993). *Oncogene*, 8, 1285-1292.

5. Qiu, R.G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F. and Symons, M. An essential role for Rac in Ras transformation. (1995) *Nature*, 374, 457-459.
6. Urano, T., Emkey, R. and Feig, L.A. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. (1996). *EMBO J.*, 15, 810-816.
7. Wang, H.G., Millan, J.A., Cox, A.D. Der, C.J., Rapp, U.R., Beck, T., Zha, H. and Reed, J.C. R-Ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via Bcl-2 suppressible mechanism. *J. Cell. Biol.*, 129, 1112.
8. Jiménez, B., Arends, M., Esteve, P., Perona, R., Sánchez, R., Ramón y Cajal, S., Wyllie, A. and Lacal, J.C. Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of rho-p21, a GTP-ase protein of the Ras superfamily. (1995). *Oncogene*, 10, 811-816.
9. Khan, R.A., Yucel, J.K. and Malhotra, V. ARF signaling: a potential role for phospholipase in membrane traffic. (1993) *Cell*, 75, 1045-1048.
10. Ridley, A.J. and Hall, A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin fibers in response to growth factors. (1992). *Cell*, 70, 389-399.
11. Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Dieckmann, D. and Hall, A. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. (1992). *Cell*, 70, 401-410.
12. Takai Y., S. Takuya, K. Tanaka and H. Nakanishi. (1995) Rho as a regulator of the cytoskeleton. *TIBS* 20: 227-231.
13. Van Aelst L. and C. D'Souza-Schorey. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes & Dev.* 11:2295-2322.
14. Moore MS., Ran and nuclear transport (1998). *Sep* 4:273(36):22857-60
15. Barbacid, M. (1987). Ras genes. *Annu Rev Biochem.*, 56, 779-821.
16. León, J. and Pellicer, A. (1993): ras genes involvement in carcinogenesis: lessons from animal models systems. In: *The ras Superfamily of GTPases*. Lacal JC and McCormick F (Eds.) CRC Press, USA, pp3-36
17. Quilliam, L.A., Khosravi-far, R., Huff, S.Y., and Der, C.J. (1995). *Bioessays*, 17, 395-404.
18. Clark, G.J. and Der, C.J. in *GTPases in biology* (Dickey, B.F., and Birnbaumer, L., eds). (1993). 259-288, Springer-Verlag, Berlin.
19. Ben-Levy, R., Paterson, H.F., Marshall C.J., and Yarden, Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/Erb-2 receptor enables coupling to the MAP Kinase pathway (1994) *EMBO J.*, 13, 3302-3311.
20. Hancock, J.K. and Marshall, C.J. (1993): Posttranslational processing of ras and ras-related proteins. In: *The ras Superfamily of GTPases*. Lacal J.C. and McCormick F (Eds.) CRC Press, USA, pp 65-85
21. Cross, M. and Dexter, T.M. (1991): Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64: 271-280.
22. Goastin, A.S.; Leot, F.B., Shipley, G.D. and Moses, H.L.: Growth factors and cancer. *Can cer Res* 46:1015-1023 (1986).
23. Khosravi-far, and Der, C.J. The Ras signal transduction pathway. (1994). *Cancer Metastasis Rev*, 13, 67-89.
24. Yuryev A, Wennogle LP. The RAF family: an expanding network of post-translational controls and protein-protein interactions. (1998). *Cell Res*. 8, 81-98
25. Stokoe, D., McDonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., and Hancock, J.F. Activation of Raf as a results of recruitment to the plasma membrane (1994). *Science*, 264, 1463-1467.
26. Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., VandeWoude, G.F., and Ahn, N.G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP Kinase Kinase. (1994). *Science*, 265, 966-970.
27. Feig, L.A., and Cooper, G.M. Relationship among guanine nucleotide exchange, GTP hydrolysis, and transforming potential of mutated ras proteins. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, 8, 3235-3243.
28. Rozakis-Adcock M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson and D. Bowtell (1993) The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the ras activator mSos1. *Nature* 363: 83-85
29. Schlessinger, J. How receptor Tyrosine Kinases activate Ras (1993). *Trends Biochem Sci.*, 18, 273-275.
30. Feig, L.A., Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. (1994). *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 204-211.
31. Crews, C.M., and Erikson, R.L. Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. (1993). *Cell*, 74, 215-217.
32. Crews, C.M., Alessandrini, A., and Erikson, R.L. Erks: their fifteen minutes has arrived. (1992). *Cell Growth Differ.*, 3, 135-142.
33. Marais, R., Wynne, J. and Treisman, R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor regulated transcriptional activation domain (1993). *Cell*, 73, 381-393.
34. Treisman, R. The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. (1996a). *Semin. Cancer Biol.*, 1, 47-58.
35. Blenis, J. Signal transduction via the MAP Kinases: proceed at your own RSK (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 5889-5892.
36. White, M.A., Nicolette, C., Minden, A., Polverino, A., Van Aelst, L., Karin, M., and Wigler, M. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation (1995). *Cell*, 80, 533-541.
37. Khosravi-far, R. White, M.A., Westwick, J.D., Solski, P.A., Chrzanowska-Wodnicka, M., Van Aelst, L., Wigler, M.H., and Der, C.J. Oncogenic Ras activation of Raf mitogen-activated protein Kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation (1996) *Mol. Cell. Biol.*, 16, 3923-3933.
38. Brtva, T.R., Drugan, J.K., Ghosh, S., Terrell, R.S., Campbell-Burk, S., Bell, R.M., and Der, C.J. Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 9809-9812.
39. Drugan, J.K., Khosravi-far, R. White, M.A., Der, C.J., Sung, Y.-J., Huang, Y.-W., and Campell, S.L. Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 233-237.
40. Morrison, D.K., and Cutler, R.E., Jr. The complexity of Raf-1 regulation. (1997). *Curr. Op. Cell Biol.*, 9, 174-179.
41. Vincenz, C., and Dixit, V. 14-3-3 proteins with A20 in an isoform-specific manner and function both as a chaperone and adapter molecules (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 20029-20034.
42. Luo, L., Hensch, T.K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L.Y. and Y.N. Differential effects of the Rac GTPase on purkinje cell axons and dendritic trunks and spines (1996). *Nature*, 379, 837-840.
43. Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson M.F., Marshall, C.J. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. (1998). *Science*, 280, 109-112.
44. Denouel-Galy, A., Douville, E.M., Wrne, P.H., Papin, C., Laugier, D., Calothy, G., Downward, J., Eychene, A. Murine Ksr interacts with MEK and inhibits Ras-induced transformation. (1998). *Curr. Biol.* 8:46-55.
45. Therrien, M, Wong, A.M., Rubin, G.M. CNK, a Raf-binding multidomain protein required for RAS signaling. (1998) *Cell* 95:343-353.
46. Chen, Q., Lin, T.H., Der, C.J., and Juliano, R.L. Integrin-mediated activation of mitogen-activated protein (MAP) or extracellular signal-related Kinase Kinase (MEK) and Kinase is independent of Ras (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 18122-18127.
47. Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, C.J. Activation of MAP Kinase Kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH3T3 cells. (1994). *Cell*, 77, 841-852.
48. Lenormand, P., McMahon, M., and Pouyssegur, J. Oncogenic Raf-1 activates p70 S6 kinase via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 15762-15768.
49. Boguski, M.S., and McCormick, F. Protein regulating Ras and its relatives (1993). *Nature*, 366, 643-654.
50. Winkler, D. G., Johnson, J.C., Cooper, J.A., and Vojtek, A.B. Identification and characterization of mutations in Ha-Ras that selectively decrease binding to cRaf-1 (1997). *J. Biol. Chem.*, 272, 24402-24409.

51. Adari, H., Lowy, D.R., Willumsen, B.M., Der, C.J., and McCormick, F. Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain (1988). *Science*, 240, 518-521.
52. Marshall, M.S., and Hettich, L.A. Characterization of Ras effector mutant interactions with the NF-1GAP related domain (1993). *Oncogene*, 8, 425-431.
53. Martin, G.A., Yatani, A., Clark, R., Conroy, L., Polakis, P., Brown, A.M., and McCormick, F. GAP domains responsible for Ras p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K⁺ channel currents (1992). *Science*, 255, 192-194.
54. Pomerance, M., Thang, M.N., Tocque, B., and Pierre, M. The Ras GTP-ase activating protein SH3 domain is required for Cdc2 activation and Mos induction by oncogenic Ras in *Xenopus* oocytes independently of mitogen activated protein Kinase activation (1996). *Mol. Cell. Biol.*, 16, 3179-3186.
55. Habets, G.G.M., Scholtes, E.H.M., Zuydgeets, D., van der Kammen, R.A., Stam, J.C., Berns, A., and Collard, J.G. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1 that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins (1994). *Cell*, 77, 537-549.
56. McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settlementman, J., Dedhar, S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L.B., and Pawson, T. The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion (1993). *EMBO J.*, 12, 3073-3081.
57. Carpino, N., Wisniewski, D., Strife, A., Marshak, D., Kobayashi, R., Stillman, B., and Clarkson, B. P62dok: A constitutively tyrosine-phosphorylated GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells (1997). *Cell*, 88, 197-204.
58. Andersen, L.B., Fountain, J.W., Gutmann, D.H., Tarlé, S.A., Glover, T.W., Dracopoli, N.C., Housman, D.E., and Collins, F.S. Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. (1993). *Nature Genet.*, 3, 118-121.
59. Johnson, M.R., DeClue, J.E., Felzmann, S., Vass, W.C., Xu, G., White, R., and Lowy, D.R. Neurofibromin can inhibit Ras-dependent growth by a mechanism independently of its GTPase-accelerating function (1994). *Mol. Cell. Biol.*, 14, 641-645.
60. Li, Y., and White, R. Suppression of a human colon cancer cell line by introduction of an exogenous NF1 gene. (1996). *Cancer Res.*, 56, 2872-2876.
61. Albright, C.F., Giddings, B.W., Liu, J., Vito, M., and Weinberg, R.A. Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. (1993). *EMBO J.*, 12, 339-347.
62. Urano, T., Emkey, R., and Feig, L.A. Ral GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation (1996). *EMBO J.*, 15, 810-816.
63. Rodríguez-Viciana, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte B.M., Pappin, D., Pas, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., and Downward, J. Role of phosphoinositide 3-OH Kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. (1997). *Cell*, 89, 457-467.
64. Nimnual, A.S., Yatsula, B.A., and Bar-Sagi, D. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos (1998). *Science*, 279, 560-563.
65. Peterson, S.N., Trabalzini, L., Brtva, T.R., Fischer, T., Altschuler, D.L., Martelli, P., Lapetina, E.G., Der, C.J., and White II, G.C. Identification of a novel Ral-GDS related protein as a candidate effector for Ras and Rap-1 (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 29903-29908.
66. Kikuchi, A., and Williams, L.T. Regulation of interaction of ras p21 with RalGDS and Raf-1 by cyclic AMP-dependent protein kinase. (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 588-594.
67. White, M.A., Vale, T., Camonis, J.H., Schaefer, E., and Wigler, M.H. A role for the Ral guanine nucleotide Dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 16439-16442.
68. Jiang, H., Luo, J.Q., Urano, T., Frankel, P., Lu, Z., Foster, D.A., and Feig, L.A. Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation. (1995). *Nature*, 378, 409-412.
69. Carpenter, C.L., and Cantley, L.C. Phosphoinositide kinases (1996). *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 8, 153-158.
70. Rodríguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. and Downward, J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras (1994). *Nature*, 370, 527-532.
71. Hemmings, B.A. Akt signaling: Linking membrane events to life and death decisions (1997). *Science*, 275, 628-630.
72. Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erkjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., and Hawkins, P.T. Protein Kinase B Kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5 -triphosphate-dependent activation of protein kinase B. (1998). *Science*, 279, 710-714.
73. del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R., and Núñez, G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein Kinase Akt. (1997). *Science*, 278, 687-689.
74. Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R.D., Krishna, U.M., Falck, J.R., White, M.A., and Broek, D. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. (1998). *Science*, 279, 558-560.
75. Klarlund, J.K., Guilherme, G., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A., and Czech, M.P. Signaling by phosphoinositide-3,4,5 -triphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec-7 homology domains (1997). *Science*, 275, 1927-1930.
76. Marte, B.M., Rodríguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P.H., and Downward, J. PI3-Kinase and PKB/Akt act as a effector pathway for R-Ras (1997). *Curr. Biol.*, 7, 63-70.
77. Fantl, W.J., Escobedo, J.A., Martin, G.A., Truck, C.W., del Rosario, M., McCormick, F., and Williams, L.T. Distinct phosphotyrosines on a growth factor receptor bind to specific molecules that mediate different signaling pathways. (1992). *Cell*, 69, 413-423.
78. Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A.J., Fantl, W.J. and Williams, L.T. Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol-3-Kinase. (1995). *Science*, 268, 100-102.
79. Russell, M., Lange-Carter, C.A., and Johnson, G.L. Direct interaction between ras and the kinase domain of mitogen activated protein kinase kinase kinase (mekk1) (1995). *J. Biol. Chem.*, 270, 11757-11760.
80. Lange-Carter, C.A., Pleiman, C.M., Gardner, A.M., Blumer, K.J., and Johnson, G.L. A divergence in the MAP Kinase regulatory network defined by MEK Kinase and Raf. (1993). *Science*, 260, 315-319.
81. Johnson, N.L., Gardner, A.M., Diener, K.M., Lange-Carter, C., Gleavy, J., Jarpe, M.B., Minden, A., Karin, M., Zon, L.I. and Johnson, G.L. Signal transduction pathways regulated by Mitogen-activated/extracellular response Kinase Kinase Kinase induce cell death. (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 3229-3237.
82. Kuriyama, M., Harada, N., Kuroda, S., Yamamoto, T., Nakafuku, M., Iwamatsu, A., Yamamoto, D., Prasad, R., Croce, C., Canaani, E., and Kaibuchi, K. Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. (1996). *J. Biol. Chem.*, 271, 607-610.
83. Hunter, T. Oncoproteins networks (1997). *Cell*, 88, 333-346.
84. Prasad, R., Gu, Y., Alder, H., Nakamura, T., Canaani, O., Saito, H., Huebner, K., Gale, R.P., Nowell, P.C., Kuriyama, K., Miyazaki, Y., Croce, C.M. and Canaani, E. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. (1993). *Cancer Res.*, 53, 5624-5628.
85. Colicelli, J., Nicolette, C., Birchmeier, C., Rodgers, L., Riggs, M., and Wigler, M. Expression of three mammalian cDNAs that interfere with Ras function in *Saccharomyces cerevisiae* (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2913-2917.
86. Han, L., Colicelli, J., A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf-1. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, 15, 1318-1323.
87. Afar, D.E., Han, L., McLaughlin, J., Wong, S., Dhaka, A., Parmar, K., Rosenberg, N., Witte, O.N. and Colicelli, J. Regulation of the oncogenic activity of BCR-ABL by a tightly bound substrate protein RIN1. (1997). *Immunity*, 6, 773-782.
88. Settleman, J., Albright, C.F., Foster, L.C., Weinberg, R.A. Association between GTPase activators for Rho and Ras families. (1992). *Nature* 359, 153-4

89. Ponting, C.P., and Benjamin, D.R. A novel family of Ras-binding domains. (1996). *Trends Biochem. Sci.*, 21, 422-425.
90. Joneson, T., White, M.A., Wigler, M.H., and Bar-Sagi, D. Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of Ras. (1996). *Science*, 271, 810-812.
91. Cox, A.D. and Der, C.J. Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras. (1997). *Biochim Biophys Acta*. 8;1333(1),51-71.
92. Hernández-Alcoceba R., Saniger L., Campos J., Núñez M.C., Khaless F., Gallo M.A., Espinosa A., and Lacal J.C. (1997). Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* 15, 2289-2301.
93. Cuadrado A., Carnero A., Dolfi F., Jiménez B. and Lacal J.C.. (1993) Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for the mitogenic activity of growth factors. *Oncogene* 8, 2959-2968
94. Lloyd, A.C., Obermuller, F., Staddon, S., Barth, C.F., McMahon, M., Land, H. Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. (1997). *Genes dev.*, 11, 663-677.
95. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. (1997). *Cell*, 88, 593-602.
96. Wynford-Thomas, D. Proliferative lifespan checkpoints: cell-type specificity and influence on tumor biology. (1997) *Eur. J. Cancer*, 33, 716-726.
97. Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Hannon, G.J., Rehberger, P.A., Trono, D., Richter, K.H., Walker, C., Beach, D., Sherr, C.J., Serrano, M. Cloning and characterization of murine p16 INK4a and p15INK4b genes. (1995). *Oncogene*, 11, 635-645.
98. Franza, B.J., Maruyama, K., Garrels, J.L., Ruley H.E. In vitro establishment is not a sufficient prerequisite for transformation by activated ras oncogenes (1986). *Cell*, 44, 409-418.
99. Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., Nevins, J.R. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/cdk2 and E2F. (1997). *Nature*, 387, 422-426.
100. Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A.C., Land, H. High-intensity Raf signals causes cell cycle arrest mediated by p21. (1997). *Mol. Cell. Biol*, 17, 5588-5597.
101. Khwaja, A., Rodriguez, V.P., Wennstrom, S., Warne, P.H., Downward, J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein Kinase B/Akt cellular survival pathway. Matrix adhesion and ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH Kinase and protein Kinase B/Akt (1997). *EMBO J.* 16, 2783-2793.

Oncogenes nucleares

C. CAELLES, A. MUÑOZ

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad. Barcelona
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
Universidad Autónoma (C.S.I.C.-U.A.M.). Madrid*

INTRODUCCIÓN

Los oncogenes nucleares codifican proteínas que se localizan normalmente en el núcleo celular. La mayoría de los oncogenes nucleares codifican proteínas que actúan como factores de transcripción regulando (activando o inhibiendo) la expresión génica. Ello los hace particularmente interesantes, al controlar aquellos genes directamente responsables de la conversión de las células normales en transformadas. Los productos de los oncogenes nucleares constituyen en muchos casos el punto de convergencia de la cascada de eventos que los factores de crecimiento disparan al interactuar con sus receptores presentes en la membrana celular. La serie de fosforilaciones (por receptores tirosina quinasa), interacciones proteína-proteína (con intervención de moléculas adaptadoras con dominios SH2 y SH3) y activación de moléculas transductoras (Ras y otras con actividad GTPásica) tienen como consecuencia la modulación (frecuentemente la activación por fosforilación) de una serie de proteínas presentes en el núcleo celular, algunas de las cuales son productos de los oncogenes nucleares. Las proteínas codificadas por oncogenes nucleares están reguladas, además de por factores de crecimiento que inducen la proliferación celular, por agentes que inducen daño o estrés a las células como la luz ultravioleta o agentes químicos que alteran la estructura del DNA, y en condiciones fisiológicas por algunas hormonas y mediadores que son capaces de inducir modificaciones estructurales (fosforilación...) o conformacionales que modifican su actividad. Por todo ello, es obvio que el análisis de la actividad y regulación de los oncogenes nucleares y la caracterización y estudio de los genes que controlan son claves para el conocimiento de las etapas iniciales del proceso por el que las células normales se convierten en cancerosas. La alteración de la expresión de estos oncogenes, bien por un aumento

anormal que causa un incremento excesivo de las proteínas que codifican o bien por mutaciones que originan proteínas alteradas con función anómala, provoca la desregulación de los genes que controlan.

Un segundo grupo de oncogenes nucleares codifican proteínas implicadas en el control del ciclo de división celular. Su mutación provoca el aumento de la velocidad de proliferación celular. Finalmente, se conocen otros oncogenes que dan lugar a quinasas o incluso a proteasas localizadas en el núcleo celular.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA. TRANSCRIPCIÓN

La expresión génica está controlada a muchos niveles (1, 2). El primero es la transcripción del DNA a RNA en un proceso en cuyo inicio intervienen la enzima RNA polimerasa y un cada vez mejor definido conjunto de proteínas (TFs, o factores basales de transcripción) que constituyen el complejo iniciador o basal de la transcripción. Este complejo se une a una región de los genes denominada promotor constituida por secuencias definidas de nucleótidos que están inmediatamente adyacentes (cajas TATA, con secuencias tipo TATA-AT) o coinciden (Iniciadores, ricas en C y con nucleótidos en posiciones definidas) con el inicio de la transcripción. En la regulación de este proceso intervienen además una serie de proteínas que actúan potenciando o inhibiendo la actividad de la maquinaria de transcripción: son los factores de transcripción. Su acción tiene lugar mediante la unión a zonas específicas de los genes más o menos cercanas al promotor (en algunos casos adyacentes y en otras distantes decenas, centenares o incluso miles de nucleótidos; localizadas a veces en la región previa 5' al promotor, y otras pasado éste, en intrones, en la región codificante, o incluso en la zona 3' posterior a ésta). En cualquier caso, la unión de los

factores de transcripción al DNA provoca cambios en la velocidad con que la RNA polimerasa transcribe los genes. Estos cambios son motivados por interacciones directas o indirectas (a través de otras proteínas denominadas co-reguladores o adaptadores) con los factores basales de transcripción o TFs. Existen dos tipos de co-reguladores: los que potencian la transcripción o co-activadores, y los que la inhiben o co-represores. El efecto positivo de los co-activadores se debe a una actividad intrínseca de acetilación de histonas o a la capacidad de atraer otras moléculas con esta actividad enzimática. La acetilación de residuos de lisinas en las histonas que están estrechamente unidas al DNA anula su carga positiva, lo que lleva a la disminución de su afinidad por el DNA, que está cargado negativamente en sus grupos fosfato. Como consecuencia, la estructura de la cromatina (los nucleosomas) se relaja, haciéndose más abierta y accesible a la entrada del complejo iniciador de transcripción, y así se favorece la expresión de los genes. Por el contrario, los co-represores favorecen la inhibición de la transcripción mediante su asociación a proteínas con actividad deacetilasa de histonas. La eliminación de los grupos acetilo de las histonas aumenta su carga positiva y con ello la afinidad de unión con el DNA y el compactamiento de la cromatina, que se hace inaccesible al complejo iniciador de la transcripción.

Los factores de transcripción juegan un papel fundamental en la expresión específica de los genes propios de un tejido o tipo celular determinado. Se cree que en todas las células existe un nivel basal, muy reducido de transcripción de la mayoría, si no todos, los genes, y que es la existencia de factores de transcripción (conjuntos de ellos actuando coordinadamente) específicos lo que determina qué genes van a ser eficientemente expresados en cada célula y, como consecuencia, el fenotipo y función celular. Naturalmente, deben existir mecanismos o agentes que regulen a su vez la expresión y/o la actividad de los factores de transcripción. Estos son factores de crecimiento, morfógenos y hormonas de producción endógena en condiciones fisiológicas, y factores exógenos como radiaciones, agentes químicos de la dieta, drogas...

El hecho de que algunos de los factores de transcripción sean producto de oncogenes implica que sus actividades son críticas para los procesos de proliferación y de adquisición y mantenimiento del fenotipo diferenciado de las células. Lo que equivale a decir que los genes que regulan son fundamentales en los procesos cuya alteración conduce a la aparición de cánceres.

ONCOGENES NUCLEARES: DESCUBRIMIENTO, REGULACIÓN, IMPORTANCIA

Como ocurre con todos los tipos de oncogenes, el estudio de los virus que inducen transformación celular y tumores en animales ha sido clave para el descubrimiento de muchos de los oncogenes nucleares (2). El trabajo que diversos laboratorios desarrollaron durante las décadas de los sesenta y setenta que condujo al aislamiento y clonado de los genomas de los retrovirus cau-

santes de tumores en animales permitió, posteriormente caracterizar algunos oncogenes cuyos productos se localizan en el núcleo de las células infectadas. El clonado de los homólogos celulares (proto-oncogenes, *c-onc*) a partir de los oncogenes nucleares virales (*v-onc*) llevó a comprobar que las proteínas por ellos codificadas se encuentran también en el núcleo de numerosos tipos de células, así como la existencia de diferencias entre las proteínas normales codificadas por los proto-oncogenes y las codificadas por los oncogenes virales. Estas diferencias, que muchas veces se acompañan de un mayor nivel de expresión de los oncogenes virales debido a la elevada transcripción de los genomas de retrovirus, son la causa de un comportamiento anormal en su acción como factores de transcripción.

El trabajo presente y futuro en este área se centra en gran medida en el descubrimiento de los genes que son regulados por los factores de transcripción codificados por los proto-oncogenes existentes en las células normales y por las versiones alteradas que son producto de su mutación y/o expresión anormal (sobre-expresión, expresión bien en un tipo celular o bien en una etapa del desarrollo inadecuado). Naturalmente, además es de gran importancia conocer cómo está controlada la actividad de los productos de los oncogenes nucleares como factores de transcripción: su fosforilación, interacciones con otras proteínas nucleares, por ligando (en el caso de *erbA* y quizá de otros), y su propia expresión. Es evidente que el conocimiento de los genes regulados y del mecanismo de acción de los oncogenes nucleares será muy útil para comprender los procesos y mecanismos básicos de la transformación maligna, la proliferación celular y, en general, la expresión génica.

EL ONCOGÉN *erbA*

El oncogén *v-erbA* está presente en el genoma del virus de la eritroblastosis aviaria (AEV), un retrovirus que causa eritroleucemias y sarcomas en aves (3). No tiene una elevada actividad transformante por sí sólo, sino que actúa potenciando la acción oncogénica de *v-erbB*, el segundo oncogén del AEV. *V-erbA* bloquea la diferenciación terminal a eritrocitos maduros y, aunque de modo menos importante, aumenta el efecto proliferativo de *v-erbB*, que codifica por una forma alterada del receptor tirosina quinasa de membrana del factor de crecimiento epidérmico. En precursores eritroblásticos de pollo, *v-erbA* coopera con el receptor *c-kit* del factor de crecimiento de células multipotentes ("stem cell factor") en la inducción de proliferación y bloqueo de la diferenciación, sustituyendo la acción de estrógenos y glucocorticoides a través de sus receptores nucleares (4). Además, *v-erbA* es capaz de cooperar con otros oncogenes con actividades bioquímicas muy diferentes tales como *ras*, *src*, *sea* o *fps* en la transformación de eritroblastos (5). *V-erbA* es una forma mutada de *TR/c-erbAa*, uno de los dos genes (*a*, *b*) del receptor nuclear de alta afinidad de las hormonas tiroideas (la forma activa triyodotironina o *T3*, y la pro-hormona tiroxina o *T4*, con una menor capacidad de unión al receptor) (6). Los

receptores de T3/T4 (TR) son, por tanto, el producto de los proto-oncogenes *c-erbA*. Son proteínas que se encuentran siempre en el núcleo asociadas a la cromatina, actuando como factores de transcripción regulados por ligando/hormona. Forman heterodímeros, que muestran máxima afinidad por el DNA, con las proteínas RXR. Estas son codificadas por tres genes (*RXR*, α , β) y son, a su vez, receptores de un derivado de la vitamina A, el ácido 9-cis retinoico.

La proteína *v-ErbA* presenta diversas alteraciones respecto a *c-ErbA* (figura 1a). Entre ellas, la fusión en su extremo amino-terminal de parte de la proteína viral Gag y una delección que cubre los primeros 12 aminoácidos incluyendo el primer sitio de fosforilación en *c-ErbA*. Como resultado de un cambio Gly por una Ser en la región de unión a DNA, la proteína *v-ErbA* tiene una menor afinidad de unión a las secuencias de DNA a las que se une el receptor normal, denominadas "Thyroid

Response Elements" o TRE. Estos TRE son variantes más o menos modificadas del hexámero AGGTCa en repeticiones directas o invertidas (palindrómicas) con un número de nucleótidos (espaciador) entre dichas repeticiones que suele ser de cuatro (7, 8). Además, diversas mutaciones puntuales y una delección muy cerca del extremo carboxi-terminal son responsables de que *v-erbA* no sea capaz de unir hormona ni de activar la expresión de los genes inducidos por T3, y de que exhiba una reducida afinidad por las proteínas RXR (figura 1a).

En ausencia de hormona o cuando sus niveles son bajos, el receptor normal *c-erbA* inhibe la expresión de los genes a los que está unido, disminuyendo el nivel basal de transcripción (figura 1b) (9, 10). La represión de la transcripción génica se debe a la constitución de complejos con diversos co-represores (*N-CoR*, *SMRT*) y otras moléculas (*Sin3*, *HDAC/RPD3*) que tienen activi-

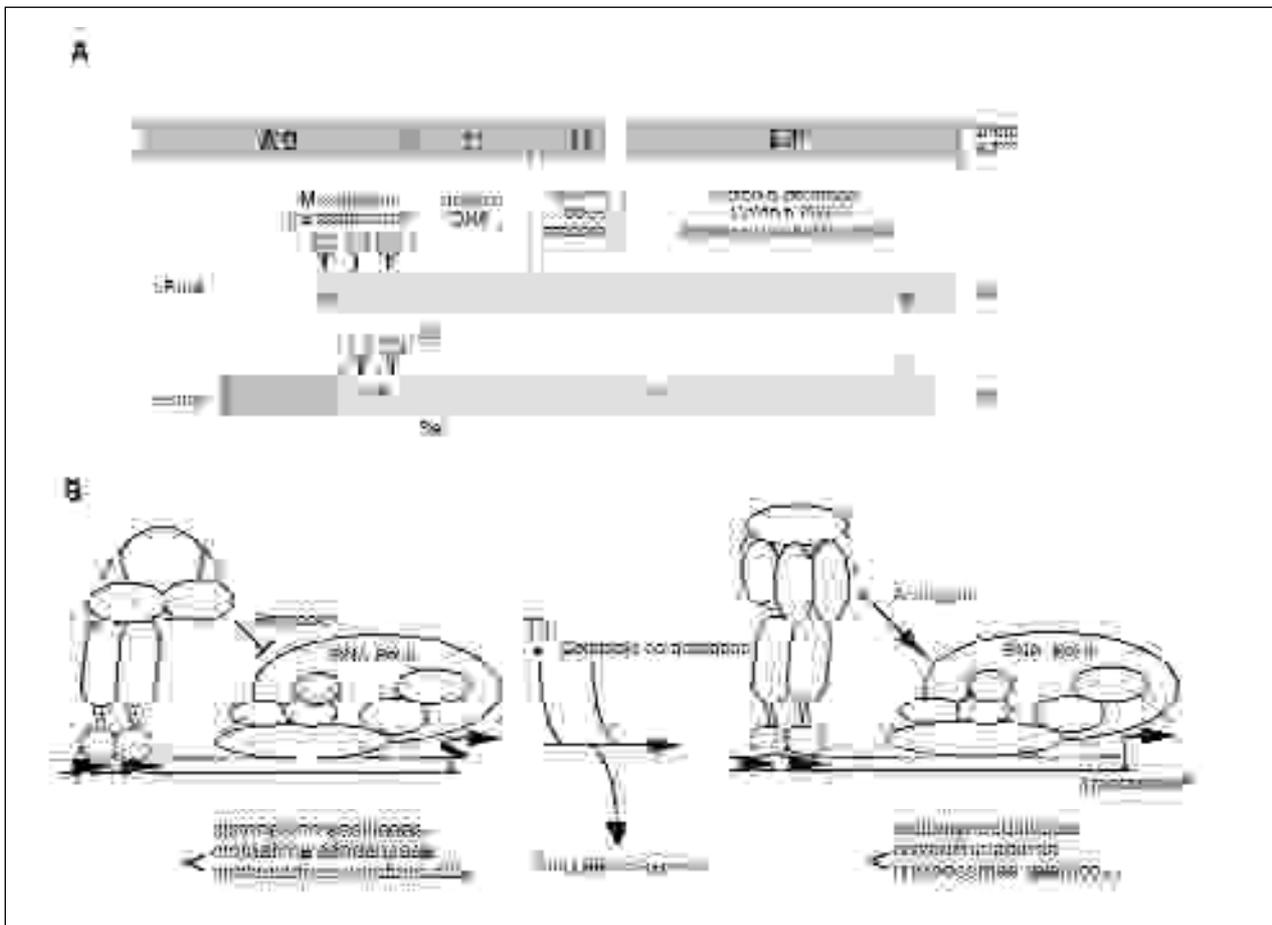


Fig. 1. a) Esquema del receptor normal celular *c-ErbA* y la proteína viral oncogénica *v-ErbA*. Se muestran los dominios de unión a DNA y hormona, y la distribución de las mutaciones puntuales y delecciones existentes en *v-ErbA*. Como consecuencia, *v-ErbA* no une T3 ni es capaz de activar la transcripción génica, y muestra además una reducida afinidad de unión a DNA y RXR. b) Modelo de acción de TR/*c-ErbA*. En ausencia de hormona TR/*c-ErbA* se une al DNA formando heterodímeros con RXR y reprime la transcripción génica mediante la constitución de complejos con diversos co-represores (*N-CoR*, *SMRT*) y otras moléculas (*Sin3*, *HDAC/RPD3*) que tienen actividad deacetilasa de histonas. Como consecuencia la cromatina queda condensada e inaccesible a la maquinaria transcripcional, con lo que se reprime la expresión génica. La unión de T3 provoca un cambio conformacional en TR/*c-ErbA* que se traduce en el intercambio de co-represores por co-activadores (*N-CoA*, *SRC-1*, *CBP/p300*) y la acción de acetilasas de histonas que abren la estructura de la cromatina y causan la activación de la transcripción. Por el contrario, su sobreexpresión a partir de los potentes promotores retrovirales provoca que *v-ErbA* pueda, a pesar de su menor afinidad por DNA y RXR, competir por los mismos sitios de unión y, debido a su incapacidad de unir T3, inhibir de modo constitutivo la expresión génica. Modificada de Muñoz A, "Cáncer. Genes y nuevas terapias", Ed. Hélice, Madrid, 1997, (con permiso de la editorial).

dad deacetilasa de histonas. La unión de T3 a TR/c-ErbA provoca un cambio conformacional en éste, que se traduce en la liberación de los co-represores y la asociación posterior con moléculas co-activadoras (N-CoA, SRC-1, CBP/p300) con actividad acetilásica de histonas intrínseca o con capacidad de unir enzimas con esta actividad. La consecuencia final es la activación de la transcripción. Así, c-ErbA funciona como un factor de transcripción inducible por ligando. Por el contrario, la proteína codificada por el oncogén v-erbA al no ser capaz de unir hormona permanece unida a los co-represores actuando como un represor constitutivo de la transcripción. Su sobre-expresión a partir de los potentes promotores retrovirales provoca que v-ErbA pueda, a pesar de su menor afinidad por DNA, competir por los mismos sitios de unión e inhibir de modo constitutivo la expresión de los genes que son fisiológicamente activados por TR/c-ErbA y T3. Si bien v-erbA tiene también una menor capacidad de unirse a RXR formando heterodímeros, sus elevados niveles de expresión en células infectadas por el AEV deben probablemente conducir a un "secuestro" de las proteínas RXR que impida la formación de heterodímeros funcionales entre c-ErbA y RXR. Por otra parte, dada la existencia de dos mutaciones en su región de unión a DNA, es posible que v-ErbA sea capaz de unirse a secuencias de DNA distintas de las que se une el receptor normal c-ErbA. Esto ha sido descrito *in vitro*, y si tuviera también lugar *in vivo* implicaría la regulación por v-erbA de genes distintos a los fisiológicamente regulados por T3 a través de c-ErbA (12).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE V-ERBA: ERITROBLASTOSIS

Como se ha mencionado anteriormente, v-erbA inhibe la diferenciación terminal de los eritroblastos en animales infectados por el AEV. Teniendo en cuenta sus características, cabe esperar que esta acción sea el resultado de la regulación de genes implicados en este proceso. De acuerdo con ello, se han descrito tres genes cuya expresión es inhibida por v-erbA: la anhidrasa carbónica de tipo II (CAII), band3, y la δ -aminolevulinato sintetasa (δ -ALA-S) (13). Confirmando la predicción, estos genes codifican proteínas claves para la fisiología del eritrocito: la formación de bicarbonato a partir de agua y anhídrido carbónico (CAII), el intercambiador de membrana que saca bicarbonato de las células e introduce iones cloruros (band3), y la enzima clave que regula la síntesis de porfirinas constituyentes del grupo hemo (δ -ALA-S). Sin embargo, deben existir otros genes regulados por v-erbA aún no caracterizados. Ello se deduce de experimentos en los que no se ha podido revertir totalmente la inhibición de la diferenciación de los eritroblastos infectados mediante la introducción y expresión de estos genes (14). Por otra parte, la expresión de v-erbA causa en ratones transgénicos alteraciones en el epitelio del tiroides y de la vesícula seminal, y la aparición de hepatocarcinomas. Curiosamente, esto último sólo ocurre en machos, indicando la existencia de interacciones entre v-erbA y alguna(s) hormona(s) sexual(es) (15).

PAPEL DE ERBA EN OTROS CÁNCERES

Como sugiere la aparición de hepatocarcinomas en animales transgénicos, es posible que alteraciones en c-erbA, bien por mutaciones del tipo de las existentes en v-erbA u otras, o bien por sobre-expresión o delección, puedan estar implicadas en algún tipo de cáncer en el hombre. Una serie de hechos apoyan esta posibilidad. Por una parte, es conocido desde incluso antes de la caracterización del proto-oncogén c-erbA como receptor de T3 que éste se expresa en prácticamente todos los tipos celulares del organismo. De hecho, cada tipo celular expresa un definido repertorio de proteínas c-ErbA. Actualmente, se sabe que los receptores de las hormonas tiroideas están codificados por dos genes, α y β , que por mecanismos de procesamiento alternativo y uso de distintos promotores dan lugar a distintas isoformas del receptor (3). El gen TR/c-erbA codifica las isoformas denominadas TR/c-ErbA 1, c-ErbA 1, c-ErbA 2, c-ErbA 2, c-ErbA 3 y Rev-ErbA. Únicamente el primero de ellos es capaz de unir T3 y actuar como verdadero receptor, por ello se denomina TR 1. Las isoformas 2 y 3 pierden la capacidad de unir hormona pero mantienen la de unirse al DNA por lo que, al menos en ensayos de co-transfección de células en cultivo, interfieren con los efectos mediados por los receptores funcionales (2). c-ErbA 1 y 2 fueron descubiertas muy recientemente. Se expresan a partir de un promotor interno localizado en el intrón 7 del gen y carecen del dominio de unión a DNA, por lo que podrían actuar como inhibidores transcripcionales de los propios TRs (16). Rev-ErbA es transcrito a partir de la cadena complementaria no codificante del gen TR/c-erbA, no liga hormona y su función es desconocida. El gen TR/c-erbA da lugar a dos isoformas, TR/c-erbA 1 y TR/c-erbA 2, que se diferencian sólo en el extremo amino-terminal. Ambas unen T3, y, por lo tanto, son funcionales. Por otra parte, las formas de c-ErbA expresadas varían durante el desarrollo, probablemente debido a una regulación por agentes endógenos como la propia T3 y otros que son desconocidos. Todo esto, junto con las múltiples e importantes acciones que T3 tiene durante el desarrollo ontogénico, especialmente en la etapa embrionaria y postnatal temprana (aunque también en la vida adulta), sugiere la participación de las proteínas c-ErbA en el proceso de diferenciación de diversos tipos celulares (2).

Las hormonas tiroideas son moléculas de naturaleza lipofílica y bajo peso molecular que controlan una gran variedad de procesos biológicos. Son capaces de difundir a través de la membrana plasmática y ejercen su acción en casi todos los tipos celulares regulando el metabolismo general, el crecimiento y la diferenciación, mediante el control de la expresión génica a través de las proteínas c-ErbA (2). La relativa abundancia de expresión de c-erbA en células nerviosas (neuronas y glía), músculo cardíaco y hepatocitos, se correlaciona con los efectos de T3 sobre la maduración cerebral (diferenciación neuronal y glial, mielinogénesis, sinaptogénesis,...), la función cardíaca y hepática respectivamente, y la regulación de genes en dichos órganos (17).

T3/c-erbA también modulan la expresión genética y diferenciación neuronal inducida por el factor de crecimiento nervioso NGF de células PC12 (18). Reforzando el nexo entre T3/TR/c-erbA y el cáncer, recientemente se ha descrito la interacción directa de TR 1 y TR 1 con el producto del gen supresor p53 (19, 20). La proteína p53 normal, pero no una mutante, es capaz de reprimir la activación transcripcional mediada por TR 1 en presencia de ligando (20) y bloquea también la activación independiente de hormona de TR 1 en células GH4C1 de pituitaria (19). Por otra parte, el receptor TR/c-erbA 1 inhibe la activación transcripcional de ciertos genes (gadd45, bax) por p53, aunque no de otros (p21) (21). Asimismo, la proteína Rb del retinoblastoma, producto de otro gen supresor de tumores, es capaz de unirse al co-activador Trip230 e inhibe su efecto estimulador sobre la actividad transcripcional de TR (22).

Resultados recientes de nuestro grupo demuestran que T3/c-erbA y v-erbA ejercen efectos opuestos sobre la expresión de genes específicos de astrocitos y oligodendrocitos en una línea celular de características gliales establecida a partir de cerebro embrionario de ratón (23). Además, mientras que v-erbA provoca un aumento de la supervivencia y proliferación celular debida a la inducción de la expresión y secreción del factor de crecimiento PDGF B, que estimula las células autocrínicamente, c-erbA causa el efecto opuesto, disminuyendo el crecimiento y acelerando la muerte celular (apoptosis) en ausencia de suero (24). En parte debido a la inducción de PDGF B, v-erbA causa la adquisición de capacidad invasiva por las células y un fenotipo transformado (25).

Un elevado número de estudios clínicos y experimentales involucran a la hormona tiroidea y a sus receptores en procesos relacionados con la carcinogénesis. T3 aumenta el potencial transformante de carcinógenos químicos, radiaciones y virus (26, revisión), y además es capaz de aumentar la actividad del oncogén ras en células en cultivo (27). *In vivo*, los receptores de T3 se expresan tanto en la glándula mamaria normal (28, 29) como en las células de cáncer de mama en animales (30-32). Desde que hace ya más de un siglo Beatson utilizase extractos de tiroides en el tratamiento del cáncer de mama (33), múltiples estudios han intentado relacionar el estado tiroideo con esta enfermedad, aunque los datos hasta el momento son contradictorios (34-42). Algunos grupos han descrito que el hipotiroidismo incrementa el riesgo de padecer cáncer de mama, mientras que para otros su efecto sería preventivo (39, 43). Los datos publicados sobre la relación entre cáncer de mama e hipertiroidismo (44), tiroiditis (45) o terapia de reemplazo con T4 (46) son igualmente inconsistentes. También se ha descrito un aumento de los casos de cáncer de mama en áreas con bocio endémico (38, 47), pero éstos no disminuyeron cuando se llevó a cabo una profilaxis con yodo (43). Por otra parte, es interesante la observación de que la concentración de T3 libre es mayor en el fluido de los quistes mamarios que en el suero, lo que sugiere un papel de la hormona en la fisiología de la enfermedad fibroquística mamaria (48). Asimismo, se ha propuesto que en pacientes con cáncer es

frecuente el estado hipotiroideo como consecuencia del elevado nivel de citoquinas como la IL-6 (49), y que la baja concentración de hormona circulante se asocia con una peor respuesta a la terapia y con peor pronóstico (50).

Conocido el carácter oncogénico de mutaciones en erbA en animales, hoy el análisis de la integridad y/o expresión de estos genes tiene más relevancia que el estudio de los niveles de T3/T4 circulantes. En pacientes con cáncer de mama se han descrito amplificaciones y deleciones de los genes erbA que sugieren una alteración en estos tumores de la regulación génica dependiente de T3 (51, 52). De hecho, T3 interviene en la regulación del desarrollo del epitelio mamario y de la síntesis de proteínas de la leche (53-57). Se han encontrado, además, alteraciones en los loci *erbA* en leucemias (58) y en carcinomas humanos de colon (59), pulmón (60), estómago (61) e hígado (62). Además, se ha descrito la presencia de receptores de hormona tiroidea mutados en una línea celular de hepatocarcinoma humano, lo que se asocia a una menor expresión del gen nm23 de acción anti-metastática (63).

Nuestros estudios revelan que la expresión de niveles elevados de c-erbA en una línea no tumoral de células de epitelio de mama que muestra un fenotipo diferenciado normal provoca una serie de efectos indeseables de T3 como son la inducción de proteasas implicadas en la transformación maligna (estromelisin 1 y 2, colagenasa IV), la disminución de la adhesión célula-célula y la inhibición parcial de la polaridad celular típica del epitelio, así como la destrucción de la capacidad morfogénica (64). Además, hemos observado que T3 reduce la expresión de tenascina-C, una proteína secretada a la matriz extracelular por células tumorales y estromales que regula, generalmente aumentando, la movilidad celular, así como la capacidad invasiva y angiogénica (65). De este modo, la sobre-expresión de c-erbA podría tener un efecto beneficioso sobre el fenotipo celular disminuyendo la capacidad invasiva. Es claro que se requieren más estudios para entender los efectos complejos de erbA y su ligando T3 en el epitelio mamario.

Los datos obtenidos sugieren la posibilidad de que la sobre-expresión (por amplificación génica u otros mecanismos) de receptores normales de T3 codificados por c-erbA pueda estar implicada en el proceso de aparición/progresión de carcinomas de mama. A la vista de estos resultados, el interés de estudiar los efectos de v-erbA u otra forma mutada de c-erbA y, sobre todo, la integridad, funcionalidad y niveles de expresión de las proteínas c-erbA en biopsias de tumores de mama de pacientes es obvio. Como se ha mencionado, diversos grupos han descrito en los últimos años alteraciones en uno u otro gen TR/c-erbA / en distintos tipos de tumores humanos. Sin embargo, el escaso número de estudios y pacientes analizados dejan estos resultados pendientes de su confirmación definitiva. Aún más, al igual que ocurre con todos los estudios que tratan de relacionar una alteración génica con un tipo de cáncer, es conveniente indicar que el significado de alteraciones en un locus genético detectadas en un tumor macroscópico obtenido por resección quirúrgica es dudoso, dado

que en etapas tan tardías de la progresión tumoral la acumulación de todo tipo de aberraciones cromosómicas, incluso de grandes proporciones, dificulta cualquier análisis.

En definitiva, la caracterización del oncogén *v-erbA* como una forma mutada del receptor nuclear de T3 y su intervención en la aparición de leucemias en animales constituye el nexo entre hormonas y cáncer que durante años ha estado latente, pero sin definir en la literatura. Es evidente que el estudio en profundidad de la actividad de *erbA* permitirá establecer si alteraciones en el receptor de T3 o disfunciones de la propia acción hormonal intervienen en algún proceso canceroso en el hombre.

LOS ONCOGENES *jun* / *fos*

Los oncogenes *v-jun* y *v-fos* fueron descubiertos en retrovirus animales: el virus del sarcoma aviar 17 (ASV-17) y dos virus que producen osteosarcomas en ratones (Finkel-Biskis-Jenkins o FBJ y Finkel-Biskis-Reilly o FBR) respectivamente. Ambos provienen de genes celulares: los proto-oncogenes *c-jun* y *c-fos*, respecto a los cuales presentan algunas mutaciones. En ambos casos existen en el genoma celular genes relacionados que constituyen sendas familias: la familia *jun* formada por los genes *c-jun*, *junB* y *junD*, y la familia *fos* que incluye a los genes *c-fos*, *fosB*, *fra-1* y *fra-2* (figura 2a) (2, 66, 67).

Las proteínas *Jun* y *Fos* muestran homologías estructurales (figura 2b), teniendo ambas una región o dominio responsable de activar la transcripción y otra de unión a DNA. Esta última contiene dos subregiones: una rica en aminoácidos básicos que interacciona con el DNA y otra en leucinas, que forma una estructura denominada de cremallera de leucinas ("leucine zipper") necesaria para la dimerización, requisito éste para unirse al DNA. *Jun* y *Fos* son capaces de interactuar *in vitro* e *in vivo* formando complejos. Existen, sin embargo, diferencias: mientras las de la familia *Jun* son capaces de formar homodímeros que se unen eficientemente al DNA, además de heterodímeros con los miembros de la familia *Fos*, éstas sólo forman interacciones estables en heterodímeros con proteínas de la familia *Jun* (figura 2c). Además, se ha descrito la formación de dímeros de *Jun* con otras moléculas, como los factores de transcripción de la familia ATF o las proteínas *Maf*.

Ambas proteínas, *c-Jun* y *c-Fos*, fueron identificadas como constituyentes del factor de transcripción AP-1 ("Activating Protein-1"). Este factor AP-1 se une a secuencias TGACTCA, que es un elemento de respuesta a agentes promotores de tumores del tipo ésteres del forbol como el TPA (12-0-tetradecanoil-13-forbol-acetato), y que está presente en genes como *colagenasa I*, *estromelisin*, *interleuquina-2* y otros muchos. AP-1 es activado también por factores de crecimiento y diversos agentes de estrés celular, y media la acción de numerosos oncogenes receptores tirosina quinasa de membrana y de la cadena de transmisión de la señal mitogénica.

Los genes *jun* y *fos* son inducidos rápida y transito-

riamente tras el tratamiento con suero o factores de crecimiento, por lo que se consideran genes de respuesta inmediata. Su expresión es consecuencia de la señal mitogénica que comienza en la membrana plasmática tras la unión de los factores de crecimiento a sus receptores con actividad tirosín-quinasa y que llega al núcleo por activación y translocación de serina/treonina quinasas (ERK-1,-2/MAPK...). Estas fosforiladoras (Elk-1) que activan su transcripción (*c-fos*), o fosforilan directamente al complejo AP-1 (68). Ambos genes, *c-jun* y *c-fos*, tienen en sus promotores elementos de regulación por AP-1, lo que implica que se autoregulan. La actividad de las proteínas *c-Jun* y *c-Fos* está regulada, además de por su propia expresión y formación de homo/heterodímeros, por fosforilación directa por quinasas específicas ("c-Jun N-terminal Kinases" o JNKs, también denominadas SAPK; y "Fos-Regulating Kinase" FRK), que son activadas en condiciones de estrés celular como luz ultravioleta, hipoxia, o calor, o por mecanismos aún no bien definidos. La regulación de la actividad AP-1 es pues compleja, ya que las distintas proteínas *Jun* y *Fos* difieren en sus capacidades de unirse al DNA, en su capacidad intrínseca de activar la transcripción, y en su modulación por fosforilación. De todo ello se deduce que los genes de estas dos familias deben controlar la respuesta proliferativa de un modo primario, activando (o inhibiendo) en cascada genes cuyos productos ponen en marcha o paran el ciclo celular. Además, AP-1 regula genes que como los de proteasas y proteínas clave del sistema inmune, otros oncogenes y genes supresores de tumores están directamente implicados en la aparición y/o progresión tumoral, la respuesta inmunitaria e inflamatoria.

El oncogén *v-jun* difiere de *c-jun* por la existencia de una delección de 27 aminoácidos en la región amino-terminal llamada dominio o región delta que es responsable de la activación transcripcional, y de varias mutaciones puntuales (69) (figura 2d). La capacidad transformante de *v-jun* y *v-fos* al menos en parte se debe también a su sobre-expresión, ya que algunas diferencias que presentan en relación a sus homólogos celulares tienen como consecuencia estabilizar bien el RNA o bien la proteína. Entre *v-fos* y *c-fos* hay también un pequeño número de sustituciones y una delección de los 50 aminoácidos carboxi-terminales, que no afecta a la cremallera de leucinas necesaria para heterodimerizar ni a la región básica de unión a DNA, pero que pudiera estar implicada en su capacidad para autoreprimir su expresión (70). En cualquier caso, la capacidad transformante de estas proteínas depende de su actividad transcripcional formando el factor AP-1, como se deduce del hecho de que mutaciones en la cremallera de leucinas que impiden su dimerización anulan su oncogenicidad.

La actividad biológica de *Jun* está regulada por fosforilación. Por una parte, por la fosforilación de dos residuos de Ser (63 y 73) en la región amino-terminal responsable de activar la transcripción génica (figura 2d). Esta fosforilación es llevada a cabo por la JNK, y produce un aumento de su actividad transcripcional (71). Por otra, la fosforilación por caseín-quinasa II

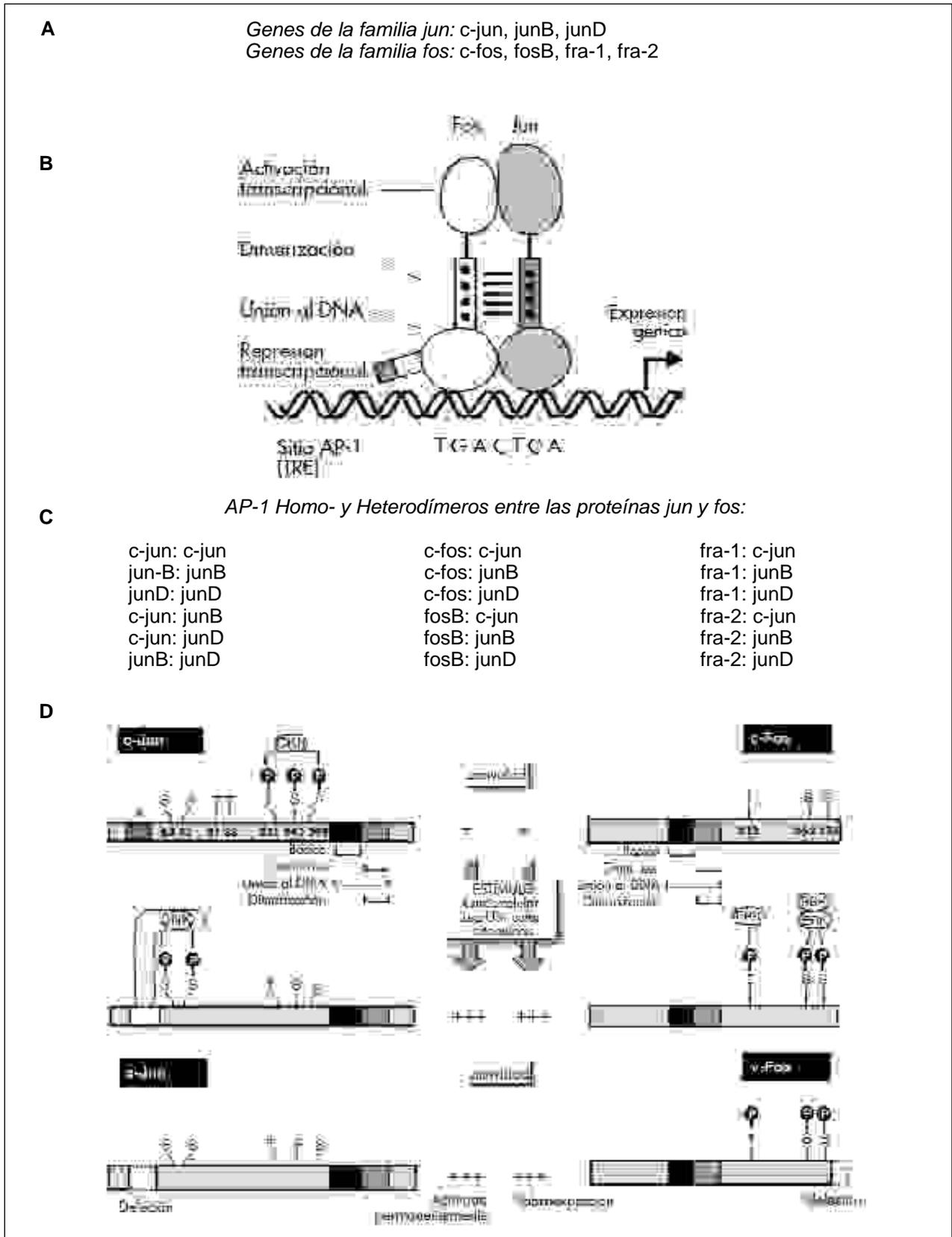


Fig. 2. Los oncogenes jun y fos: el factor AP-1. a) Proteínas de las familias Jun y Fos. b) Estructura de las proteínas c-Jun y c-Fos. Se indican los dominios funcionales de ambas proteínas, la formación de dímeros y su unión a secuencias específicas en el DNA, sitios AP-1 o TRE. c) Homodímeros y heterodímeros entre los miembros de las familias de proteínas Jun y Fos que constituyen el factor AP-1. d) Regulación de la actividad de c-Jun y c-Fos: efecto de fosforilaciones y mutaciones. Modificada de Muñoz A, "Cáncer. Genes y nuevas terapias", Ed. Hélice, Madrid, 1997, (con permiso de la editorial).

(CKII) o glucógeno sintasa-quinasa 3 (GSK3) en residuos de Thr231 y Ser249 de la región carboxi-terminal conlleva una reducción de la unión a DNA y, por tanto, de la actividad de c-Jun (72) (figura 2d). Esta fosforilación es inhibida a su vez por acción de la proteín-quinasa C (PKC) activable por suero o TPA. Esta acción de la PKC no es directa, sino, quizá, resultado de la activación de una fosfatasa que desfosforila dichos residuos. Se ha descrito que la fosforilación activadora en la región amino-terminal tiene como consecuencia un cambio conformacional en la carboxi-terminal, que reduce la accesibilidad de los residuos aceptores de fosfato impidiendo su fosforilación. Además, la fosforilación amino-terminal de c-Jun causa la estabilización de la proteína disminuyendo la velocidad de su degradación (73), y permite la unión de AP-1 a co-activadores transcripcionales como la CBP/p300. Así, se considera que tiene un papel clave en la regulación de la actividad de AP-1. La proteína oncogénica v-Jun, por el contrario, tiene una actividad constitutivamente elevada no sujeta a control por fosforilación. Ello se debe a la delección de 27 aminoácidos que incluye el dominio delta de unión de la JNK, y a una mutación existente entre los residuos (Thr y Ser) fosforilables en el carboxi-terminal, en concreto un cambio de la Ser243 a Phe, que impide su fosforilación. Como consecuencia, v-Jun tiene una permanente mayor afinidad de unión al DNA, y, por ello, mayor actividad transcripcional que c-Jun.

Un método de estudio de la actividad biológica de jun y fos, al igual que con otros oncogenes, ha sido en los últimos años la generación de animales en los que se ha suprimido la expresión de una (+/-) o de las dos (-/-) copias de estos genes (animales "knock-out") mediante técnicas de recombinación homóloga. El análisis de los efectos sobre el desarrollo y el fenotipo de los animales ha permitido comprobar el importante papel de jun y fos. Los ratones c-jun^{-/-} mueren durante el período medio de la gestación. Hasta ese momento son indistinguibles de los embriones normales, aunque los cultivos de fibroblastos extraídos de ellos muestran un crecimiento espontáneo y en respuesta a mitógenos reducido (74). Estos resultados muestran el papel clave de c-jun en el organismo. En el caso de los ratones c-fos^{-/-}, existe también una viabilidad reducida, aunque un cierto porcentaje llega a nacer. En éstos, se observa una disminución del peso corporal, retardo en el crecimiento, osteopetrosis con deficiencias en huesos y erupción de dientes, alteraciones en la hematopoyesis, linfopenia, ausencia de gametogénesis y comportamiento anormal. Todo ello indica que la expresión de c-fos no es estrictamente necesaria para el crecimiento de muchos tipos celulares pero sí muy importante para el correcto desarrollo de diversos tejidos (75).

EL ONCOGÉN myc

V-myc fue originalmente descubierto como el oncogén del virus de la mielocitomatosis aviar MC29 y de otros relacionados cuya infección produce la rápida aparición de tumores que afectan a distintos tipos de

células hematopoyéticas y fibroblastos. En v-myc existen una serie de cambios respecto a su homólogo celular c-myc entre los que se encuentran diversas mutaciones puntuales, distintos tipos de fusiones con genes virales y reducción en la zona 3' no traducida del mRNA, cuya participación en la activación oncogénica no está bien definida. Hoy sabemos que la mera sobre-expresión de la proteína celular c-Myc induce transformación celular. En el hombre se han encontrado amplificaciones y/o sobre-expresión de c-myc en diversos tipos de tumores que en algunos casos se correlacionan con el grado de malignidad (mama, estómago, colon, cérvix, glioblastoma,...) (76, 77). En el 100% de los linfomas de Burkitt, c-myc es sobre-expresado como consecuencia de una translocación que coloca la región del cromosoma 8 donde se localiza c-myc adyacente a las regiones reguladoras de genes de inmunoglobulinas (Igk, IgH, Ig) de elevada expresión en linfocitos presentes en otros cromosomas (2, 14 y 22, respectivamente). Otras translocaciones que afectan a c-myc se han descrito en leucemias linfocíticas T y B.

C-myc se expresa en células que proliferan, pero muy poco o nada en células quiescentes o diferenciadas terminalmente, siendo su expresión inducida por suero o factores de crecimiento. Su sobre-expresión inhibe la diferenciación y favorece la proliferación celular. La causa principal de la activación oncogénica de c-myc parece ser la desregulación de su expresión, aunque el descubrimiento de alteraciones en la secuencia de las proteínas c-Myc expresadas en tumores (y en v-myc) no permite descartar la existencia de mutaciones activantes (78). Aunque parezca contradictorio a primera vista, c-Myc puede también inducir apoptosis. Ello ocurre en caso de conflicto con señales opuestas que bloquean la división celular, como cuando se fuerza su expresión en células cultivadas en ausencia de suero o factores de crecimiento (79).

Existen otros genes relacionados: N-myc, L-myc, S-myc y B-myc. N- y L-myc también aparecen sobre-expresados en distintos tipos de tumores en el hombre: neuroblastomas (N-myc), carcinomas de células pequeñas de pulmón (N/L-myc)..., mientras que no se han encontrado hasta el momento alteraciones de S-myc y B-myc en tumores humanos.

C-myc codifica un factor de transcripción. La proteína c-Myc es fosforilable y glicosilada, y se une al DNA (a la secuencia consenso CACGTG, llamada caja E) formando un heterodímero con otra proteína llamada Max. Max puede también formar homodímeros (Max-Max) o heterodímeros otras proteínas de la denominada familia Mad (Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4, Rox) y unirse a las mismas secuencias de DNA, por lo que la regulación de los genes a los que se une Myc debe ser el resultado integrado de los niveles e interacción de todas estas proteínas (80). En términos generales, los complejos Max-Max no activan y los Max-Mad tienen un efecto inhibitorio, debido a que las proteínas de la familia Mad interactúan con co-represores transcripcionales (Sin3A, Sin3B). De ahí, quizás, que la sobre-expresión de Myc, o de cualquier otra de ellas, pueda tener efectos desreguladores importantes.

A pesar de que se conoce desde hace tiempo el papel clave de c-myc en el control del ciclo celular activando la proliferación e inhibiendo la diferenciación, no es mucho lo que se sabe sobre los genes que regula. c-myc regula positivamente los complejos ciclina-CDK que actúan en la fase G1 del ciclo: ciclina D/CDK4/6 y, sobre todo, ciclina E/CDK2. Myc actúa por al menos tres vías: a) la inactivación funcional de los inhibidores de CDK p27 y quizá p21 y p57, b) la inducción de la fosfatasa CDC25A que activa las CDK, y c) la desregulación de la expresión de la ciclina E. c-Myc suprime la inhibición del ciclo por inhibidores de CDKs de la familia INK4 como p16. Así, c-Myc-ciclina E pueden promover la proliferación celular actuando en una fase posterior al control por retinoblastoma y p16, lo que hace de ellas unas dianas preferentes de intervención farmacológica en un amplio espectro de tumores.

Por todo lo anterior, es altamente interesante identificar los genes diana regulados por c-Myc. Entre los inducidos se encuentran la protimosina, ornitina descarboxilasa, telomerasa, RCC1, CDC25A, p53, eIF4E y CAD, habiéndose propuesto un pequeño efecto en algunos tipos celulares sobre los genes de las ciclinas E, A y D1. Por el contrario, c-myc parece inhibir la expresión de C/EBP α , la transferasa terminal, albúmina, NCAM, trombospondina-1, metalotioneína 1, neu y algunos otros. Por otra parte, c-myc causa la estabilización de la proteína p53 por un mecanismo indirecto que implica la inducción de la expresión de la proteína p19ARF. Esta proteína p19ARF inhibe la estimulación de la degradación de p53 promovida por el producto del oncogén mdm-2, facilitando así su acumulación de p53 que a su vez aumenta la sensibilidad de las células a la apoptosis.

EL GEN RAR DEL RECEPTOR DEL ÁCIDO RETINOICO

El gen que codifica el receptor de tipo alfa del ácido retinoico (RAR), otro miembro de la superfamilia de receptores nucleares, se activa oncogénicamente cuando debido a translocación cromosómica se fusiona a otros genes, generalmente PML ("ProMyelocytic Leukemia") o PLZF ("Promyelocytic Leukemia Zn Finger") y a veces a NPM ("NucleoPhosMin) o NuMA ("Nuclear Mitotic Apparatus"), causando leucemia promielocítica aguda (APL o PML) (figura 3). Los productos de los genes fusionados, PML-RAR y PLZF-RAR, forman complejos con actividad deacetilante de histonas que provocan la represión transcripcional de genes inducidos por el RA y, en consecuencia, la inhibición de la diferenciación mielocítica. El tratamiento con altas dosis de ácido retinoico (RA) conduce a remisiones completas, pero desgraciadamente transitorias, de los pacientes con fusiones PML-RAR que son debidas a la eliminación de la actividad deacetilásica. Ello no es así en el caso de fusiones PLZF-RAR, que mantienen un dominio de reclutamiento de co-represores en el extremo aminoterminal de la parte de proteína PLZF (81, 82). Esto demuestra que la patogénesis de la APL radica en parte en la inhibición transcripcional de genes diana del RA debido a la estabilización de complejos

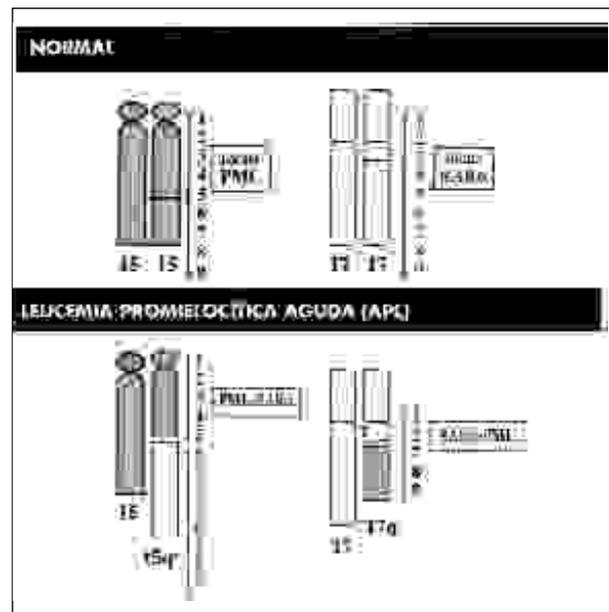


Fig. 3. Esquema de la translocación cromosómica (15:17) que causa la generación de genes híbridos PML-RAR y conduce a la aparición de leucemia promielocítica aguda (APL). Reproducida de Muñoz A, "Cáncer. Genes y nuevas terapias", Ed. Hélice, Madrid, 1997, (con permiso de la editorial).

represores PML-RAR y PLZF-RAR con actividad deacetilásica.

El gen PML es inducido por interferón y tiene acción antiproliferativa, mediando la acción del propio RA, según se deduce de la susceptibilidad tumoral de los ratones PML^{-/-} (83). Además, recientemente se ha descrito que PML induce apoptosis por mecanismos dependientes e independientes de caspasas (84, 85). Las proteínas normales PML y PLZF se localizan en el núcleo celular en unas estructuras llamadas "Nuclear Bodies" o NB. En las células leucémicas la proteína de fusión PML-RAR origina la deslocalización de la PML normal, e impide la acción pro-apoptótica de PML. En este sentido, es relevante que tanto el RA como el trióxido de arsénico, otro agente antileucémico, restauran la localización de PML en los NB (86). Por tanto, en la APL la formación de proteínas híbridas PML-RAR es oncogénica porque destruye la actividad antiproliferativa y apoptótica de la proteína normal PML y la inducción de diferenciación mielocítica del RA a través de su receptor RAR. Así, PML-RAR actúa como un producto oncogénico con doble acción dominante negativa. Aún más, PML induce la expresión de genes implicados en la presentación de antígenos como los MHC de clase I, LMP-2 y -7 y TAP-1 y -2 (que codifican respectivamente proteasas involucradas en la degradación de antígenos a péptidos de unión a los MHC y proteínas que participan en el transporte de éstos a través de la membrana del retículo endoplásmico en su vía hacia la superficie celular). Por tanto, la alteración de la expresión de PML en los pacientes puede contribuir a la evasión de la respuesta inmune por las células tumorales (87).

OTROS ONCOGENES

El oncogén *v-myb* está presente en dos retrovirus (virus de la mieloblastosis aviar o AMV y E26) que producen leucemias en aves. Es una forma mutada del gen *c-myb* que se expresa de modo muy restringido en células hematopoyéticas inmaduras proliferativas (88). Aunque es muy poco lo que sabe sobre su acción, *v-myb* y *c-myb* (junto con los genes relacionados *A-myb* y *B-myb*) son factores de transcripción que regulan genes implicados en la diferenciación de células hematopoyéticas uniéndose a secuencias del tipo PyAACG/TG (89). Se ha descrito que *c-myb* es capaz de regular positivamente su propia expresión, así como de los genes *bcl-2*, *mim-1*, *cdc2*, *CD4*, *CD13*, *CD34*, *hsp70*, *TCRd*, elastasa de neutrófilos, mieloperoxidasa, *c-kit*, *lck*, adenosina deaminasa y otros en células de estirpe mieloblástica. Tanto *v-myb* como versiones mutadas de *c-myb* con actividad oncogénica aisladas de tumores tienen una mayor actividad transcripcional que *c-myb*. Aparte de algunas mutaciones puntuales, los *v-myb* retrovirales tienen sendas deleciones en los extremos amino- y carboxi-terminal que eliminan ambas regiones reguladoras de la actividad transcripcional. Además, la propia sobre-expresión de *c-myb* es también oncogénica. Mientras que la pérdida de *c-myb* causa una inhibición de la proliferación, una elevada expresión constitutiva conlleva el bloqueo de la diferenciación celular. Confirmando una acción clave de *c-myb* en hematopoyesis, animales *myb*^{-/-} mueren durante el desarrollo embrionario por defectos en la hematopoyesis hepática fetal. Es interesante la descripción de expresión de *c-myb* en un elevado porcentaje de carcinomas de mama y en algunos de ovario, y la amplificación en un porcentaje de leucemias, carcinomas de colon y melanomas, tipos celulares donde normalmente no se encuentra. El significado de esta expresión es desconocido.

El oncogén *v-rel* del virus de la reticuloendoteliosis aviar, causante de linfomas en aves, es una versión truncada de *c-rel*, un gen que codifica un factor de transcripción de la misma familia que NF- κ B, que se une a secuencias GGGPu (C,A,T)TPyPy(C,A,T)C (90). Muchos de los genes regulados por estos factores están relacionados con el sistema inmune: de inmunoglobulinas, del complejo de histocompatibilidad, de inflamación, adhesión...NF- κ B es un tetrámero formado por dos subunidades de Mr 50.000 y 65.000 que se localiza de forma latente en el citoplasma en asociación con una subunidad inhibidora denominada I κ B. La activación de las células (generalmente del sistema inmune) con ciertos agentes (factor necrosante de tumores TNF, TPA...) induce la fosforilación y degradación de I κ B. NF- κ B entonces se trasloca al núcleo y activa la transcripción génica. La región de homología entre NF- κ B y *rel* incluye los dominios de unión a DNA y de dimerización. De acuerdo con ello, tanto *v-rel* como *c-rel* se unen a las mismas secuencias que NF- κ B y se asocian a las mismas proteínas citoplasmáticas. *V-rel* carece del dominio carboxi-terminal de *c-rel* que es responsable de la activación transcripcional; por ello, *v-rel* actúa como

un antagonista de *c-rel* y NF- κ B en linfocitos T. Otro posible modo de acción oncogénica de *v-rel* es la competición con *c-rel* u otros miembros de la familia por la formación de heterodímeros.

El oncogén *v-ets* está presente junto con *v-myb* en el genoma del retrovirus E26 que induce leucemias en aves. Ambos, *v-ets* y *v-myb*, colaboran en la inducción de leucemias. Su homólogo *c-ets* pertenece a una familia de factores de transcripción que reconocen secuencias con el motivo central GGAA/T (91). Los genes de la familia *ets* regulan, entre otros, genes que codifican proteasas implicadas en la adquisición de malignidad como uPA, colagenasa I y estromelisin 1 en células epiteliales, endoteliales y fibroblastos, así como numerosos genes que se expresan en células linfoides. Un miembro de la familia *ets* es el gen *spi-1*, que codifica la proteína PU.1, un factor de transcripción cuya sobre-expresión conduce a la aparición de eritroleucemias en animales y que induce la expresión de una serie de genes que incluyen los receptores de los factores de crecimiento de células hematopoyéticas CSF, G-CSF y GM-CSF, así como *CD11b*, *CD18*, *MPO*, el propio *spi-1* y los de las inmunoglobulinas *Ig*, *Ig*, *Ig* μ e *Ig*J. Otros miembros de esta familia son *fli-1*, *tel* y *erg*, cuya activación oncogénica por fusión debida a translocación cromosómica se asocia a sarcomas de Ewing y ciertos tipos de leucemias respectivamente.

En leucemias agudas de células T se han caracterizado translocaciones e inversiones cromosómicas que activan una serie de genes cuyos productos son factores de transcripción (*RBTN1* y 2, *HOX11*, *lyl1*, *bcl-6*, *tan-1*, *tall*, *tal-2*, *rhom-1*, *rhom-2*,...) que, a veces no son expresados en condiciones normales en el tipo celular al que transforman. Este, pues, parece ser un caso de expresión inadecuada. Estas alteraciones cromosómicas causan la activación aberrante de estos genes que codifican factores de transcripción por dos posibles mecanismos: a) el aumento de su transcripción debido a ser colocados tras un promotor muy fuerte y activo, como por ejemplo los de los genes de las inmunoglobulinas o cadenas del receptor de las células T en células hematopoyéticas, y b) la formación de proteínas de fusión con genes que codifican otros factores de transcripción.

Menos estudiados y conocidos, *ski*, *dek/can*, *gli1*, *pbx*, *evl1* o *qin*, y los oncogenes virales *E1A* de adenovirus y el antígeno T del virus SV40 (para los que no se han encontrado homólogos celulares).

Otro oncogén recientemente caracterizado es el *v-maf* del retrovirus aviar AS42, que tiene como homólogos celulares a una serie de genes (*mafK*, *mafF*, *mafB*, *mafG*, *nrl*) que codifican proteínas nucleares que se unen a secuencias de DNA que incluyen aquellas reconocidas por Jun y Fos, y que forman además heterodímeros con éstas.

Mdm-2 está inducido transcripcionalmente por el gen supresor tumoral p53, codificando una proteína que regula negativamente a éste promoviendo la degradación de la proteína que codifica. Su sobre-expresión, por ejemplo en un porcentaje de sarcomas, contribuye al desarrollo oncogénico al mediar la desaparición de la proteína p53.

ONCOGENES NUCLEARES QUE CODIFICAN COMPONENTES DEL CICLO DE DIVISIÓN CELULAR

El oncogén *PRAD1/bcl-1* codifica la ciclina D1 implicada en el control del ciclo de celular. Está desregulado por sobre-expresión en numerosos tipos de cánceres, especialmente en carcinomas de mama, mayoritariamente como resultado de amplificación génica (92). *Vin-1* codifica por la ciclina D2, y se encuentra asimismo amplificado en un porcentaje de leucemias linfocíticas crónicas, y alterado en algunos tumores germinales. Es evidente que la sobre-expresión de estas ciclinas debe alterar el control del punto de restricción del ciclo celular en la fase G1. Por otra parte, se ha descrito que los genes que codifican las fosfatasa *Cdc25A* y *Cdc25B* que activan las CDKs son potenciales oncogenes, habiéndose descrito su sobre-expresión en un porcentaje importante de carcinomas de mama.

ONCOGENES NUCLEARES QUE CODIFICAN TIROSINA QUINASAS

El gen normal *c-abl* codifica una tirosina quinasa nuclear que actúa como un regulador negativo de la proliferación celular (93). Su sobre-expresión puede también inducir apoptosis tras irradiación o quimioterapia. Sin embargo, cuando se sobre-expresa o sufre mutaciones se puede localizar en el citoplasma. La proteína Abl está fosforilada, y ha sido descrita su unión a ciertas secuencias de DNA. Su acción oncogénica aparece cuando se expresan formas de *c-abl* dominantes negativas, por fusión en *v-Abl* con proteína viral Gag (Gag-Abl, del retrovirus de la leucemia de Abelson) que destruye el dominio SH3 inhibitorio de la actividad tirosina quinasa que consecuentemente se desregula, o cuando por translocación cromosómica se forman proteínas de fusión Bcr-Abl, aunque éstas mantienen el dominio SH3. La proteína Bcr-Abl se expresa en leucemias que tienen el cromosoma Filadelfia como la mieloide crónica y linfocítica aguda. Se ha descrito que la transformación por *bcr-abl* requiere la acción de *myc*, de modo que una forma dominante negativa de *c-myc* inhibe la transformación por *bcr-abl*. La expresión de *c-abl* está estrechamente controlada durante el ciclo celular, habiéndose encontrado proteína *c-Abl* en el citoplasma unida a la PI3K. Se han propuesto diversas interacciones entre Abl y otras proteínas tan importantes como Rb y *c-Myc*, que, sin embargo, requieren confirmación.

Otras quinasas nucleares son codificadas por los genes *fps/fes*, *fer* y *rak*, cuyo significado biológico dista mucho de ser conocido.

ONCOGENES NUCLEARES QUE CODIFICAN PROTEASAS

El oncogén *unp* codifica una proteasa ubicua capaz de eliminar residuos de ubiquitina de otras proteínas. Su sobre-expresión causa transformación celular en células 3T3, y su homólogo humano, *unph*, ha sido asimismo encontrado sobre-expresado en carcinomas microcíticos

y adenocarcinomas de pulmón. Por otra parte, el oncogén *tre*, aislado a partir de DNA de un sarcoma de Ewing, codifica una proteína también con actividad desubicitinizante que se expresa en células cancerosas pero no en normales como resultado de un reordenamiento de secuencias existentes en distintos cromosomas.

ANTAGONISMO ENTRE RECEPTORES NUCLEARES Y EL FACTOR AP-1

Como hemos revisado anteriormente, los oncogenes nucleares suelen ejercer su actividad como factores activadores de la transcripción formando homo- o heterodímeros con otras proteínas (RXR-erbA, Jun-Fos y Myc-Max son ejemplos). Este modo de acción permite un nivel adicional de regulación mediante interacciones proteína-proteína. Aún más, recientemente se ha identificado un nivel superior de complejidad y regulación: existen interacciones funcionales ("cross-talk") entre las proteínas codificadas por los propios oncogenes. Estas interacciones no están aún bien definidas; pueden ser directas proteína-proteína (Jun-Maf, Fos-Maf) o de competición por unión a secuencias de DNA o algún otro factor (co-activadores, factores del complejo de transcripción). Entre las más importantes por su posible relevancia fisiológica está el mutuo antagonismo entre *c-ErbA* y otros receptores hormonales nucleares como el de glucocorticoides (GR), retinoides (RAR) o vitamina D (vitDR) con el factor AP-1 (94). La capacidad de *c-ErbA*, GR, RAR o vitDR de inhibir la activación génica por AP-1 requiere la unión a su ligando respectivo. El efecto inhibitorio depende del tipo de célula y gen analizado. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar este antagonismo, que la mayoría de las veces es mutuo, pero que en ocasiones es unidireccional (95, revisión). El primero es la interacción proteína-proteína entre los receptores y el factor AP-1, bien directa o bien indirecta mediada por proteínas que actuarían de puente. Ello impediría la unión a los sitios de respuesta en el DNA. Estas interacciones se han observado *in vitro*, pero no de manera clara *in vivo*; y de hecho, en células, el antagonismo funcional entre glucocorticoides y AP-1 no impide la unión de GR ni de Jun-Fos a sus respectivos elementos de respuesta en los promotores de sus genes diana. Un segundo modelo es el de competición por un co-factor necesario. Así, se ha propuesto que tras la activación de AP-1 por fosforilación de *c-Jun* o la de los receptores hormonales por la unión de su ligando respectivo ambos competirían por la unión del co-activador transcripcional CBP, que ambos requieren para una efectiva activación de la expresión de sus genes diana y que estarán en cantidades limitantes en el núcleo celular (96). Esta es una hipótesis muy atractiva que, sin embargo, no ha encontrado aún una definitiva demostración y que no es compatible con algunos datos como la existencia de mutantes de *c-Jun* que inhiben eficazmente los receptores hormonales a pesar de carecer de la región amino-terminal por la que se unen a CBP. Un tercer modelo, que ha sido propuesto por nuestro grupo,

para explicar el antagonismo del factor AP-1 por los receptores nucleares es la inhibición de la actividad de la vía de la JNK (97). Nuestros datos indican que glucocorticoides, T3, retinoides y vitamina D inhiben sustancialmente la fosforilación de c-Jun por la JNK, y así la actividad transcripcional de AP-1 en distintos tipos de células (97) (figura 4). Es muy significativo que la proteína oncogénica v-ErbA, que es incapaz de unir T3, no interfiere con la actividad de AP-1. Y no sólo esto, sino que se ha descrito que la expresión de v-ErbA puede bloquear la acción antagonista de T3/c-ErbA sobre AP-1 (98).

Estos mecanismos de antagonismo de AP-1 pueden tener una gran relevancia fisiológica y terapéutica, tanto en el efecto antitumoral (antiproliferativo y pro-apoptótico) como en el inmunosupresor y antiinflamatorio de glucocorticoides, retinoides y, quizá, T3 y vitamina D. Conceptualmente, es posible que mutaciones en los receptores hormonales nucleares, como es el caso de v-ErbA, anulen estas acciones y contribuyan a la desregulación de procesos tan esenciales.

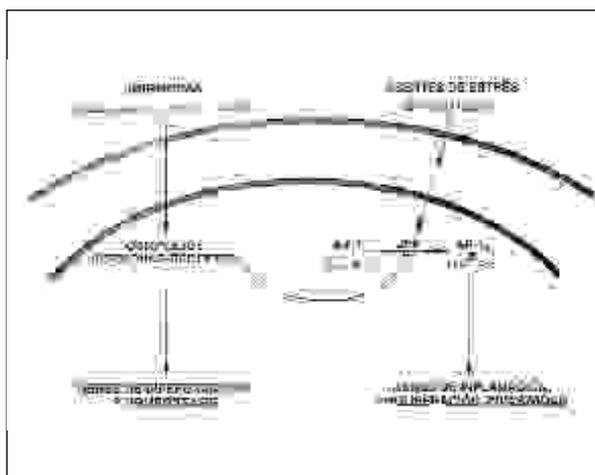


Fig. 4. Esquema del antagonismo de la actividad del factor AP-1 por receptores hormonales nucleares activados mediante la inhibición de la vía de la JNK.

BIBLIOGRAFÍA

- Latchman DS. Eukaryotic transcription factors. 3ª edición, 1998. Academic Press, Londres.
- Muñoz A. Cáncer. Genes y nuevas terapias, 1997. Editorial Hélice, Madrid.
- Rasclé A, Gandrillon O, Cabello G, Samarut J. The v-erbA oncogene. En: *Oncogenes as transcriptional regulators*, vol 1: *Retroviral Oncogenes*, M. Yaniv y J. Ghysdael, eds., 1997, Birkhäuser Verlag, Basilea.
- Bauer A, Mikulits W, Lagger G, Stengl G, Brosch G, Beug H. The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors. *EMBO J.*, 1998; 17: 4291-4303.
- Kahn P, Frykberg L, Brady C, Stanley I, Beug H, Vennström B. V-erbA cooperates with sarcoma oncogenes in leukemic cell transformation. *Cell*, 1986; 45: 349-356.
- Sap J, Muñoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennström B. The c-erbA protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, 1986; 324: 635-640.
- Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine Reviews*, 1993; 14: 184-193.
- Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Reviews*, 1994; 15: 291-407.
- Muñoz A, Bernal J. Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.*, 1997; 137: 433-445.
- Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998; 10: 384-391.
- Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998; 10: 373-383.
- Subauste JS, Koenig RJ. Characterization of the DNA-binding and dominant negative activity of v-erbA homodimers. *Mol. Endocrinol.*, 1998; 12: 1380-1392.
- Zenke M, Muñoz A, Sap J, Vennström B, Beug H. V-erbA oncogene activation entails the loss of hormone-dependent regulator activity of c-erbA. *Cell*, 1990; 61: 1035-1049.
- Fuerstenberg S, Leitner I, Schoeder C, Schwartz H, Vennström B, Beug H. Transcriptional repression of band3 and CAII in v-erbA-transformed erythroblasts accounts for an important part of the leukemic phenotype. *EMBO J.*, 1992; 11: 3355-3365.
- Barlow C, Meister B, Lardelli M, Lendhal U, Vennström B. Thyroid abnormalities and hepatocellular carcinoma in mice transgenic for v-erbA. *EMBO J.*, 1994; 13: 4241-4250.
- Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Legrand C, Savatier P, Samarut J. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbAa locus that encode inhibitors of retinoid acid receptor a and TR activities. *Mol. Endocrinol.*, 1997; 11: 1278-1290.
- Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 847-853.
- Muñoz A, Wrighton C, Seliger B, Bernal J, Beug H. Thyroid hormone receptor/c-erbA: control of commitment and differentiation in the neural/chromaffin progenitor line PC12. *J. Cell Biol.*, 1993; 121: 423-438.
- Qi J, Desai-Yajnik V, Yuan Y, Samuels H. Constitutive activation of gene expression by thyroid hormone receptor results from reversal of p53-mediated repression. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 7195-7207.
- Yap N, Yu C, Cheng S. Modulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors by the tumor suppressor p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 4273-4277.
- Chang K, Chen Y, Chen T, Chou W, Chen P, Ma Y, Yang-Feng T, Leng X, Tsai M, O'Malley B, Lee W. A thyroid hormone receptor coactivator negatively regulated by the retinoblastoma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 9040-9045.
- Barrera-Hernández, G., Zhan Q, Wong R, Cheng S-Y. Thyroid hormone receptor is a negative regulator in p53-mediated signaling pathways. *DNA and Cell Biology*, 1998; 17: 743-750.
- Iglesias T, Llanos S, López-Barahona M, Pérez-Aranda A, Rodríguez-Peña MA, Bernal J, Höhne A, Seliger B, Muñoz A. C-erbA and v-erbA modulate growth and gene expression of a mouse glial precursor cell line. *Cell Growth and Differentiation*, 1994; 5: 697-704 (1994).
- Llanos S, Caelles C, Azorín I, Renau-Piqueras J, Fernández-Luna JL, Bosca L, Muñoz A. The c-erbAa proto-oncogene induces apoptosis in glial cells via a protein kinase C- and bcl-2-suppressible mechanism. *J. Neurochem*, 1998; 70: 2315-2326.
- Iglesias T, Llanos S, López-Barahona M, Seliger B, Rodríguez-Peña MA, Bernal J, Muñoz A. Induction of platelet-derived growth factor B/c-sis by the v-erbA oncogene in glial cells. *Oncogene*, 1995; 10: 1103-1110.
- Guernsey D. Thyroid hormone action. *Cancer J.*, 1993; 6: 253-256.
- López C, Hsiao W, Weinstein I. Effects of triiodothyronine and tamoxifen on cell transformation induced by an activated c-Ha-ras oncogene. *Cancer Res.*, 1989; 49: 895-898.
- Bhattacharya A, Vonderhaar BK. Specific binding proteins for

- 3,5,3'-triiodothyronine in mouse mammary epithelium. *J. Cell. Biol.*, 1977; 75: 47a.
29. Selliti D, Tseng Y, Latham K. Nuclear thyroid hormone receptors in C3H/HeN mouse mammary glands and spontaneous tumors. *Cancer Res.*, 1983; 43: 1030-1038.
 30. Burke R, McGuire W. Nuclear thyroid hormone receptors in a human breast cancer cell line. *Cancer Res.*, 1978; 38: 3769-3773.
 31. Smallridge RC, Latham KR. Nuclear thyroid hormone receptor in human breast tumors. *Clin. Res.*, 1980; 28: 421.
 32. Ruzicka F, Rose D. Nuclear thyroid hormone receptors, a-glycero-phosphate dehydrogenases, and malic enzyme in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors. *Cancer Res.*, 1983; 43: 3150-3154.
 33. Beatson G. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet*, 1896; 2: 104-107.
 34. Goldman M, Monson R, Maloof F. Benign thyroid diseases and the risk of death from breast cancer. *Oncology*, 1992; 49: 461-466
 35. Lemaire M, Baugnet-Mahieu L. Thyroid function in women with breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1986; 22: 301-307.
 36. Rasmussen B, Feldt-Rasmussen U, Hegedus L, Perrild H, Bech K, Hoier-Madsen M. Thyroid function in patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1987; 23: 553-556.
 37. Smyth P, Smith D, McDermott E, Murray M, Geraghty J, O'Higgins N. A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer." *J. Clin. Endocr. Metab.*, 1996; 81: 937-941.
 38. Spencer J. The influence of the thyroid in malignant disease. *Br. J. Cancer*, 1954; 8: 393-411.
 39. Stoll B. Breast cancer and hypothyroidism. *Cancer*, 1965; 18: 1431-1436.
 40. Strain J, Bokje E, van't Veer P, Coulter J, Stewart C, Logan H, Odling-Smee W, Spence R, Steele K. Thyroid hormones and selenium status in breast cancer. *Nutr. Cancer*, 1997; 27: 48-52.
 41. Takatani O, Okumoto T, Kosano H, Nishida M, Hiraide H, Tamakuma S. Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in Japanese women. *Cancer Res.*, 1989; 49: 3109-3112.
 42. Vorherr H. Thyroid function in benign and malignant breast disease. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1987; 23: 255-257.
 43. Backwinkel K, Jackson A. Some features of breast cancer and thyroid deficiency. *Cancer*, 1964; 17: 1174-1176.
 44. Wanebo H, Benua R, Rawson R. Neoplastic disease and thyrotoxicosis. *Cancer*, 1966; 19: 1523-1526.
 45. Itoh K, Maruchi N. Breast cancer in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Lancet*, 1975; 2: 1119-1121.
 46. Kapdi C, Wolfe J. Breast cancer: relationship to thyroid supplements for hypothyroidism. *JAMA*, 1976; 236: 1124-1127.
 47. Eskin B. Iodine metabolism and breast cancer. *Trans. NY Acad. Sci.*, 1970; 11: 911-947.
 48. Martínez L, Castilla, JA, Gil T, Alarcón JL, Marcos C, Herruzo M. Thyroid hormones in fibrocystic breast disease. *Eur. J. Endocrinol.*, 1995; 132: 673-678.
 49. Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, Maemura M, Ohwada S, Morishita Y. Changes of cytokines and thyroid function in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res.*, 1997; 17: 695-700.
 50. Yokoe T, Iino Y, Takei H, Horiguchi J, Koibuchi Y, Maemura M, Ohwada S, Morishita Y. Relationship between thyroid-pituitary function and response to therapy in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res.*, 1996; 16: 2069-2072.
 51. van de Vijver M, van de Berselaar R, Devilee P, Cornelisse C, Nusse R. Amplification of the neu (c-erbB-2) oncogene in human mammary tumors is relatively frequent and is often accompanied by amplification of the linked c-erbA oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, 1987; 7: 2019-2023.
 52. Ali I, Lidereau R, Callahan R. Presence of two members of c-erbA receptor gene family (c-erbAb and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1989; 81: 1815-1820
 53. Houdebine L, Delouis C, Devinoy E. Posttranscriptional stimulation of casein synthesis by thyroid hormone. *Biochemie*, 1978; 60: 809-812.
 54. Singh D, Bern, H. Interaction between prolactin and thyroxine in mouse mammary gland lobulo-alveolar development in vitro. *J. Endocrinol.*, 1969; 45: 579-583.
 55. Vonderhaar, B. A role of thyroid hormones in differentiation of mouse mammary gland in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975; 67: 1219-1225.
 56. Vonderhaar B. Studies on the mechanism by which thyroid hormones enhance a-lactalbumin activity in explants from mouse mammary glands. *Endocrinology*, 1977; 100: 1423-1431.
 57. Vonderhaar B, Greco A. Lobulo-alveolar development of mouse mammary glands is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology*, 1979; 104: 409-418.
 58. Dayton A, Selden J, Laws G, Dorney D, Finan J, Tripputi P, Emanuel B, Rovera G, Nowell P, Croce C. A human c-erbA oncogene homologue is closely proximal to the chromosome 17 breakpoint in acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81: 4495-4499.
 59. Markowitz S, Haut M, Stellato T, Gerbic, C, Molkentin K. Expression of the erbA-b class of thyroid hormone receptors is selectively lost in human colon carcinoma. *J. Clin. Invest.*, 1989; 84: 1683-1687.
 60. Dobrovic A, Houle B, Belouchi A, Bradley W. ErbA related genes coding for DNA-binding hormone receptors localized to chromosome 3p21-3p25 and deleted in small cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, 1988; 48: 682-685.
 61. Yokota J, Yamamoto T, Miyajima N, Toyoshima K, Nomura N, Sakamoto H, Yoshida T, Terada M, Sugimura T. Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene*, 1988; 2: 283-287.
 62. Arbuthnot P, Kew M, Parker I, Fitschen W. Expression of c-erbA in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res.*, 1989; 9: 885-888.
 63. Lin K-h, Lin Y-w, Lee H-f, Liu W-L, Chen S-T, Chang KSS, Cheng S-y. Increased invasive activity of human hepatocellular carcinoma cells is associated with as overexpression of thyroid hormone b1 nuclear receptor and low expression of the anti-metastatic nm23 gene. *Cancer Lett.*, 1995; 98: 89-95.
 64. López-Barahona M, Fialka I, González-Sancho JM, Asunción M, González M, Iglesias T, Bernal J, Beug H, Muñoz A. Thyroid hormone regulates stromelysin expression, protease secretion and the morphogenetic potential of normal polarized mammary epithelial cells. *EMBO J.*, 1995; 14: 1145-1155.
 65. González-Sancho JM, Alvarez-Dolado M, Caelles C, Muñoz A. Thyroid hormone inhibits tenascin-C expression in mammary epithelial cells. *Mol. Carcinog.*, en prensa.
 66. Lewin B. Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell*, 1991; 64: 303-312.
 67. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270, 16483-16486.
 68. Karin M, Liu Z-g, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997; 9: 240-246.
 69. Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T. Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene*, 1995; 11: 2509-2514.
 70. Ofir R, Dwarki J, Rashid D, Verma IM. Phosphorylation of the C-terminus of fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter. *Nature*, 1990; 348:80-82.
 71. Dérijard B, Ibi M, Wu I-H, Barret T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ. JNK-1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-ras that binds and phosphorylates the c-jun activation domain. *Cell*, 1994; 76: 1025-1037.
 72. Lin A, Frost J, Deng T, Smeal T, Al-Alawi N, Kikkawa U, Hunter T, Brenner D, Karin M. Casein kinase II is a negative regulator of c-jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell*, 1992; 70: 777-789.
 73. Papavassiliou AG, Treir M, Bohmann D. Intramolecular signal transduction in c-jun. *EMBO J.*, 1995; 14: 2014-2019.
 74. Johnson RS, van Lingem B, Papaioannou VE, Spiegelman BM. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes & Dev.*, 1993; 7: 1309-1317.
 75. Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou VE. Pleiotropic

- effects of a null mutation in the *c-fos* proto-oncogene. *Cell*, 1992; 71: 577-586.
76. Prins J, De Vries EGE, Mulder NH. The *myc* family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res.*, 1993; 13: 1373-1386.
 77. Hirvonen HE, Salonen R, Sandberg MM, Vuorio E, Västrik I, Kotilainen E, Kalimo H. Differential expression of *myc*, *max* and *Rb1* genes in human gliomas and glioma cell lines. *Br. J. Cancer*, 1994; 69: 16-25.
 78. Gardiner EM, Richman A, Hayday A. *Myc* activation: a case of complex corruption. *Sem. Virol.*, 1991; 2: 341-350.
 79. Hoffman B, Liebermann DA. The proto-oncogene *c-myc* and apoptosis. *Oncogene*, 1998; 17: 3351-3357.
 80. Bouchard C, Staller, Eilers M. Control of cell proliferation by *Myc*. *Trends Cell Biol.*, 1998; 8: 202-206.
 81. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, 1998; 391: 811-814.
 82. Grignani F, de Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-a recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*, 1998; 391: 815-818.
 83. Wang ZG, Delva L, Gaboli M, Rivi R, Giorgio M, Cordoncardo C, Grosveld F, Pandolfi PP. Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Nature*, 1998; 279: 1547-1551.
 84. Quignon F, de Bels F, Koken M, Feunteun J, Ameisen J-C, de Thé H. PML induces a novel caspase-independent death process. *Nature Genetics*, 1998; 20: 259-265.
 85. Wang Z-G, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi, Pandolfi PP. Pml is essential for multiple apoptotic pathways. *Nature Genetics*, 1998; 20: 266-272.
 86. Koken MHM, Reid A, Quignon F, Chelbi-Alix MK, Davied JM, Kabarowski JHS, Zhu J, Dong S, Chen S-J, Chen Z, Tan CC, Licht J, Waxman S, de Thé H, Zelent A. Leukemia-associated retinoic acid receptor a fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 10255-10260.
 87. Zheng P, Guo Y, Niu Q, Levy DE, Dyck JA, Lu S, Sheiman LA, Liu Y. Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation. *Nature*, 1998; 396: 373-375.
 88. Klempnauer K-H, Ramsay G, Bishop JM, Moscovici MG, Moscovici C, McGrath JP, Levinson AD. The product of the retroviral transforming gene *v-myb* is a truncated version of the protein encoded by the cellular oncogene *c-myb*. *Cell*, 1983; 33: 345-355.
 89. Biedenkapp H, Borgmeyer U, Sippel AE, Klempnauer K-H. Viral *myb* oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity. *Nature*, 1988; 335: 835-837.
 90. Verma JM, Stevenson JK, Schwartz EM, van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Dev.*, 1995; 9: 2723-2735.
 91. Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A. The *ets* family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.*, 1993; 211: 7-18.
 92. Bates S, Peters G. Cyclin D1 as a cellular proto-oncogene. *Semin. Cancer Biol.*, 1995; 6: 73-82.
 93. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase *c-abl* negatively regulates cell growth. *Cell*, 1994; 77: 121-131.
 94. Pfahl M. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocrine Rev.*, 1993; 14: 651-658.
 95. Gottlicher M, Heck S, Herrlich P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.*, 1998; 76: 480-489.
 96. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin S, Heyman R, Rose D, Glass C, Rosenfeld M. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 1996; 85: 403-411.
 97. Caelles C, González-Sancho JM, Muñoz A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes & Dev.*, 1997; 11: 3351-3364.
 98. Desbois C., Aubert D, Legrand C, Pain B, Samarut J. A novel mechanism of action for *v-ErbA*: Abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Cell*, 1991; 67: 731-740.

El modelo experimental de la carcinogénesis de piel de ratón. Una visión integrada del cáncer

M. QUINTANILLA, P. FRONTELO, J. F. SANTIBÁÑEZ, F. G. SCHOLL, M. GARCÍA-GALLO, M. IGLESIAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Madrid

INTRODUCCIÓN

Es obvio que el estudio de las bases moleculares y celulares del cáncer requiere el uso de modelos animales y de sistemas de células en cultivo susceptibles a la manipulación por el investigador. Gracias a estos modelos experimentales, la investigación sobre el cáncer ha conocido en los últimos veinte años un avance considerable y se han podido identificar los oncogenes y genes supresores de tumores. Entre los modelos animales utilizados en la experimentación oncológica destaca el de la carcinogénesis química de piel de ratón (1), por haber contribuido de manera decisiva a la visión actual del cáncer como un proceso multiseccional. Al mismo tiempo, se ha venido utilizando, este modelo, como un ensayo crítico para determinar la naturaleza carcinogénica o cocarcinogénica de diferentes agentes ambientales.

En la carcinogénesis de piel, la inducción de tumores se realiza mediante la aplicación en la piel de los animales de una única dosis de un carcinógeno químico (por ejemplo, dimetilbenzantraceno o DMBA) que actúa provocando la aparición en la epidermis de una población de "células iniciadas". Éstas, bajo el estímulo, repetido durante varias semanas, de un promotor tumoral (generalmente el éster del forbol TPA), dan lugar a

la formación de papilomas benignos. La mayor parte de los papilomas son reabsorbidos por la piel y desaparecen. Sin embargo, alrededor del 5-10% de los tumores, progresan espontáneamente (sin necesidad del promotor) a carcinomas epidermoides malignos. De esta manera, en el proceso global de la carcinogénesis pueden distinguirse tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Fig. 1). Estas tres definiciones operativas se aplican actualmente al análisis de la mayoría de las neoplasias humanas y experimentales.

CONTROL DEL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACION EN LA EPIDERMIS

La epidermis es un epitelio estratificado escamoso que forma la cubierta protectora de la piel. Sólo la capa más interna, la capa basal, tiene la capacidad de proliferar. Cuando las células basales migran, primero hacia la capa espinosa superior y más tarde a la capa granular, inhiben su síntesis de DNA y su mitosis y entran en un proceso de diferenciación terminal que culmina, en la capa córnea, con la producción de células muertas, enucleadas y queratinizadas (escamas), que se desprenden continuamente de la superficie y son reemplazadas por células de las capas internas en

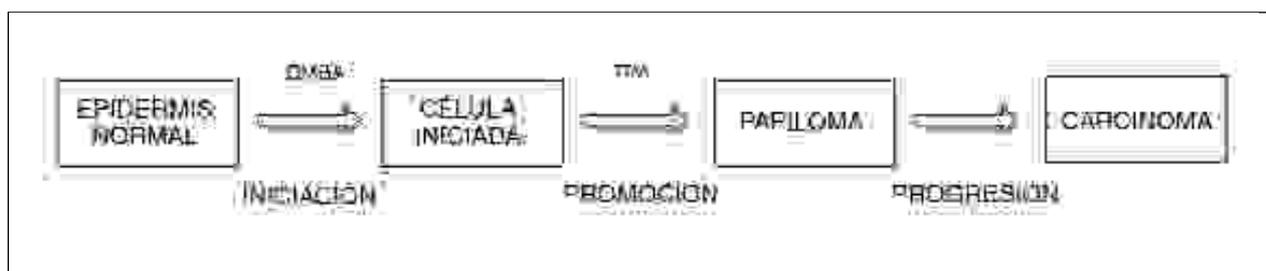


Fig. 1. Esquema de la carcinogénesis química de piel de ratón.

proceso de diferenciación y maduración. Este equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular está regulado por un grupo de factores extracelulares que incluye tanto estimuladores como inhibidores del crecimiento celular (1, 2). Entre los factores estimuladores del crecimiento de las células epidérmicas se han propuesto a EGF, TGF- β , KGF, IL-6, IL-1 y concentraciones bajas (10^{-7} - 10^{-10} M) de ácido retinoico. TGF- β parece controlar los eventos iniciales del equilibrio entre proliferación y diferenciación. Sin embargo, la función de algunos de estos factores podría no ser exclusivamente mitogénica ya que tanto TGF- β como los retinoides son potentes inductores de la migración de los queratinocitos. El control negativo de la proliferación de las células basales podría ser ejercido por la expresión autocrina de TGF- β ; mientras que otro factor de la misma familia, TGF- α , podría ser el responsable de la inhibición del crecimiento de las células suprabasales. Finalmente, el principal regulador de la diferenciación y maduración de los queratinocitos es un gradiente de calcio extracelular e intracelular a lo ancho de la epidermis. La concentración de calcio es baja en el compartimento basal y alta en la capa granular.

Los factores de crecimiento actúan uniéndose a sus receptores específicos en la membrana plasmática de las células. La activación subsiguiente de los receptores genera señales intracelulares, mediadas por un grupo de moléculas: proteínas G, protein quinasas y factores de transcripción, que transmiten el estímulo (positivo o negativo) al núcleo celular. Muchos de estos transductores de señales se han catalogado como protooncogenes o genes supresores del cáncer. Así, a las proteínas de la familia de protooncogenes ras se les ha implicado en la transducción de las señales positivas generadas por el receptor de EGF y TGF- β (3), mientras que las proteínas p53 y pRb, ambas productos de genes supresores de tumores, median el control negativo del crecimiento (4).

INICIACIÓN Y PROMOCIÓN: MUTACIÓN H-RAS Y SELECCIÓN CLONAL

Experimentos clásicos en los que se utilizaron diferentes iniciadores y promotores, así como distintas pautas de tratamiento, indicaban que la iniciación implica una lesión genética estable y la formación de una pequeña población de células iniciadas. Los estudios más recientes de genética molecular demuestran que la iniciación se puede producir por mutaciones en genes específicos, de forma notable en genes de la familia ras. Así, más del 90% de los tumores iniciados por el carcinógeno DMBA presentan una mutación específica A-T en el codón 61 del protooncogén Harvey-ras (H-ras) (5). La evidencia de que las mutaciones H-ras ocurren durante la iniciación de la carcinogénesis viene apoyada por datos que muestran que tales mutaciones son específicas del carcinógeno utilizado y pueden ser detectadas antes de la aparición de tumores visibles. Además, experimentos con el virus de sarcoma murino tipo Harvey (HMSV) y con ratones transgénicos en los que la

expresión de un oncogén H-ras, bajo el control de promotores de queratinas específicas de la piel, es dirigida a la epidermis, demuestran la formación de papilomas y carcinomas sin necesidad de un carcinógeno iniciador (6, 7).

La iniciación produce sólo un cambio sutil en el fenotipo celular, irreconocible en el contexto de la epidermis. Esa es la razón de que el análisis histológico de una piel iniciada no revele ninguna alteración observable respecto a una piel normal. Sin embargo, los queratinocitos iniciados exhiben, *in vitro*, una respuesta alterada a las señales inductoras de la diferenciación terminal (1). Se asume, por tanto, que las células iniciadas, bajo el estímulo del promotor tumoral, presentan una ventaja de crecimiento selectiva en relación a las células vecinas normales. De ahí que la aplicación repetida del promotor tumoral a una epidermis iniciada produzca la selección y expansión clonal de los queratinocitos alterados por el carcinógeno iniciador, para generar múltiples papilomas benignos, cada uno representando un clon expandido de células iniciadas. El promotor más potente de la carcinogénesis de piel de ratón es el TPA (acetato de tetradecanoilforbol), que activa la protein quinasa C (PKC) e induce la diferenciación de los queratinocitos normales. Mientras que para la iniciación existe un consenso general de que es un evento genético, algunos autores discuten si la promoción ocurre por un mecanismo puramente epigenético, que implicaría la activación crónica de PKC (1), o conlleva también alteraciones genéticas (7). La segunda hipótesis se apoya en la observación de que algunos papilomas contienen aberraciones cromosómicas: trisomías de los cromosomas 6 y 7 (8, 9); el gen H-ras está localizado en el cromosoma 7 y la trisomía implica invariablemente la duplicación del cromosoma que contiene el alelo H-ras mutado. Se ha especulado que estas alteraciones podrían ser debidas a la actividad genotóxica de TPA. Otros autores (1), defienden que estas alteraciones están asociadas a un evento de progresión premaligna, ya que los papilomas recién emergidos son diploides.

El requerimiento del modelo de carcinogénesis de piel de un iniciador y un promotor exógenos para que se produzcan tumores puede extenderse a otros tipos de cáncer. En órganos internos (pulmón, esófago, útero, etc.) los requerimientos serían los mismos pero el promotor podría ser endógeno (hormonas o factores de crecimiento).

PROGRESIÓN MALIGNA. FACTORES GENÉTICOS

La progresión de papilomas a carcinomas es, generalmente, un proceso espontáneo que no se incrementa por la acción de promotores exógenos. Implica un cambio drástico en el comportamiento celular: células tumorales, que en los papilomas se mantienen cohesivas sin alterar profundamente la arquitectura general de la epidermis, se separan de sus vecinas, rompen la membrana basal e invaden la dermis, donde, eventualmente, pueden atravesar las paredes de los vasos sanguíneos o linfáticos y formar metástasis en otros órganos del cuer-

po, generalmente los pulmones (10). En la progresión maligna intervienen tanto factores genéticos como epigenéticos (que no implican una alteración estructural de los genes sino cambios en su expresión). Ya se ha mencionado que determinadas aberraciones cromosómicas (trisomías de los cromosomas 6 y 7) están asociadas con la formación de un tipo de papilomas con un alto riesgo de progresión maligna. También se han observado alteraciones genéticas específicas: amplificación del alelo H-ras mutado o pérdida del alelo normal (5, 11), y mutaciones en el gen p53 (12). Estas alteraciones producen, sin duda, una ventaja selectiva para el crecimiento de las células de carcinoma. Especialmente, el gen supresor p53, cuya inactivación se ha observado en alrededor del 50% de los carcinomas, está muy relacionado con la estabilidad del genoma.

P53 forma parte de un mecanismo de seguridad para controlar la estabilidad genética de las células. Este mecanismo se activa cuando el DNA sufre un daño genético. En estas situaciones, se induce la expresión y estabilización de p53, que actúa en el núcleo como un factor de transcripción que reprime y activa, respectivamente, la expresión de genes estimuladores e inhibidores de la división celular (13). De esta manera, la proliferación de las células dañadas queda bloqueada transitoriamente para permitir que los sistemas celulares de reparación del DNA actúen. La transactivación del inhibidor de quinasas dependientes de ciclina (cdks) p21^{WAF1} es en gran parte responsable del bloqueo del ciclo celular inducido por p53 (14). p21^{WAF1} se une y bloquea la función de los complejos ciclina D-cdk 4/6 e impide la fosforilación de pRb. La fosforilación de pRb es la señal de tránsito para que las células pasen desde G1 a la fase S del ciclo (15). En situaciones en las que se produce un daño genético excesivo, p53 puede mediar la activación de apoptosis, o muerte celular programada, para así eliminar las células dañadas y evitar la propagación de mutaciones en el genoma. Se cree que la inactivación de p53 (por mutación o pérdida del gen) en los procesos neoplásicos es uno de los mecanismos que conducen a la inestabilidad genética de las células cancerosas.

ALTERACIONES EN EL CITOESQUELETO, ADHESIÓN CELULAR Y MATRIZ EXTRACELULAR RELACIONADAS CON LA PROGRESIÓN MALIGNA

Sin embargo, la progresión maligna implica algo más que cambios en el crecimiento de las células tumorales, y las alteraciones epigenéticas -que podrían producirse como consecuencia de las alteraciones genéticas antes mencionadas o de otras desconocidas- son determinantes de esta conversión.

Las principales alteraciones epigenéticas asociadas con la progresión maligna están relacionadas con cambios en el citoesqueleto y en la interacción de las células con su entorno (células vecinas y matriz extracelular) que conducen a la adquisición de propiedades migratorias e invasivas y, eventualmente, a un fenotipo metastásico. La migración/invasión de las células epiteliales

implica una reorganización del citoesqueleto y un cambio en la forma celular con la emisión de proyecciones de la membrana plasmática, ruptura de los contactos célula-célula mediados por los complejos cadherinas-cateninas, ruptura de las uniones célula-sustrato mediadas por integrinas y la formación de nuevos anclajes que sustenten la locomoción celular (16, 17). Las células malignas (o las células del estroma tumoral) secretan proteasas (uroquinasa, colagenasas, estromelinas) que se unen a receptores de la superficie celular y degradan de una manera focalizada y controlada (por la presencia de inhibidores específicos) proteínas de la matriz extracelular (colágenos, lamininas, fibronectina) en el frente de invasión de los tumores (18). Diversos estudios han realzado la importancia de las conexiones entre los distintos componentes del citoesqueleto y de éstos con la superficie celular y la matriz extracelular para el mantenimiento de la forma e integridad celular (19). El bloqueo de receptores tipo integrinas, la desestabilización de contactos célula-célula, la remodelación de la matriz extracelular, o la propia interferencia en la organización del citoesqueleto, pueden conducir a que la célula cambie su programa genético y su fenotipo tumoral (revisado en las refs. 20 y 21).

En la carcinogénesis de piel de ratón, durante la progresión de papilomas benignos a carcinomas, se han observado cambios en la expresión y localización de moléculas de adhesión célula-célula (cadherinas E y P) y célula-matriz extracelular (principalmente de la integrina $\alpha 6 \beta 4$) (22, 23); alteraciones en las queratinas del citoesqueleto celular (fundamentalmente la expresión aberrante de las queratinas embrionarias K8, K18, probablemente relacionadas con un fenotipo migratorio) (24, 25); cambios en la expresión y secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular (26); y la inducción de factores angiogénicos como VEGF, que promueven la vascularización de los tumores (27).

En la Fig. 2 se resumen las principales alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas con los distintos estadios de la carcinogénesis.

EL FACTOR TGF- β_1 COMO MODULADOR DEL FENOTIPO EPITELIAL Y DE LA PROGRESIÓN MALIGNA

El factor TGF- β_1 es un inhibidor de la proliferación de queratinocitos de la epidermis. No obstante, muchas líneas celulares derivadas de carcinomas o son menos sensibles, o escapan completamente a este efecto inhibidor (28). En la carcinogénesis de piel, TGF- β_1 ha sido implicado como un supresor tumoral. Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio y de otros grupos, han demostrado que TGF- β_1 es capaz de inducir la transdiferenciación de células epiteliales de carcinomas epidermoides a un fenotipo fibroblástico. Esta modulación fenotípica favorece la aparición de carcinomas fusocelulares, característicos de los últimos estadios de la progresión maligna.

Los procesos carcinogénicos llevan asociados alteraciones en las vías de señalización tirosín-quinasa sensibilizando a las células a factores de crecimiento que

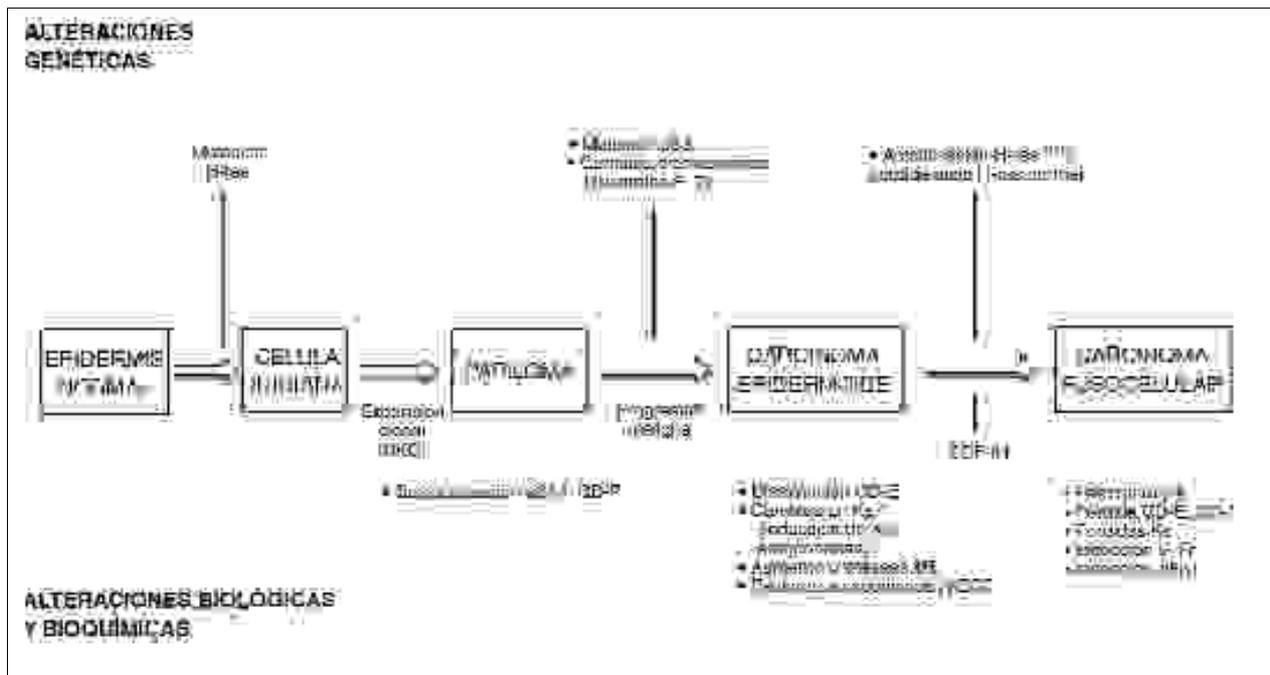


Fig. 2. Alteraciones genéticas y bioquímicas asociadas con las distintas etapas de la carcinogénesis de piel de ratón. CD, cadherina; K, queratina; ME, matriz extracelular.

estimulan la motilidad celular y que pueden llegar a producir una conversión epitelial-mesenchimática. De hecho, muchos factores de crecimiento han sido implicados en la modulación del fenotipo epitelial. Entre ellos, EGF promueve la migración de células epiteliales de hígado e intestino (29, 30), e induce una transdiferenciación en células epiteliales de mama (31). TGF- β modula el fenotipo epitelial de células de carcinomas epidermoides de vejiga induciendo un fenotipo fibroblástico (32). IGF favorece la capacidad de invasión de células de rhabdomyosarcoma y melanoma estimulando su migración (33, 34). HGF es capaz de inducir la dispersión de una gran variedad de células epiteliales normales y tumorales y actúa como factor de interconversión entre los procesos de transición epitelio-mesénquima y mesénquima-epitelio (35, 36).

De entre todos estos factores, cabe destacar el papel de TGF- β por su fuerte implicación en la aparición de tumores fusocelulares muy agresivos. Estudios de nuestro laboratorio han demostrado, en el sistema de la carcinogénesis de piel de ratón, que el tratamiento crónico con TGF- β , *in vitro*, induce una conversión epitelial-fibroblástica en células de carcinomas epidermoides hacia un fenotipo tumoral más indiferenciado y con características metastásicas (37, 38). Estas células son resistentes a la inhibición de la proliferación ejercida por el factor en queratinocitos normales o células derivadas de papilomas benignos. La modulación fenotípica es específica del efecto inducido por TGF- β , ya que el proceso revierte al eliminar el factor del medio de cultivo. Por otra parte, las células tratadas a tiempos cortos con TGF- β , sufren un reajuste en el sistema de proteólisis celular (expresión/secreción y actividad de unión del activador de plasminógeno tipo uroquinasa, uPA, e

inhibidores de plasminógeno tipo 1 y 2) asociado a una inducción de la migración e invasividad celular (39). En numerosos estudios ya se había demostrado una fuerte asociación entre la expresión de uPA catalíticamente activa y la invasividad tumoral y metástasis (véase la ref. 40 como revisión). La conversión epitelial-mesenchimática inducida por TGF- β ocurre, por tanto, de forma secuencial, de manera que la ruptura de los contactos intercelulares, la dispersión celular y la estimulación de la motilidad e invasividad preceden a la adquisición de un fenotipo fibroblástico. Estas observaciones que implican al factor TGF- β como modulador del fenotipo epitelial y progresión maligna han sido confirmadas mediante experimentos *in vivo* con ratones transgénicos que sobreexpresan TGF- β en la epidermis (41), así como en otros modelos de cáncer como el carcinoma de colon y mama (42, 43).

Investigaciones recientes apuntan a una cooperación entre el factor TGF- β y la activación del oncogén ras en el proceso de transdiferenciación epitelial-mesenchimática (37, 42, 44). De hecho, en el modelo de piel de ratón una modificación genética característica de la conversión de células epiteliales a fibroblásticas incluye una mutación o duplicación del oncogén H-ras. En efecto, queratinocitos inmortalizados no tumorigénicos no son susceptibles de modulación fenotípica por TGF- β (37). En estas células, TGF- β induce, únicamente, la inhibición del crecimiento y la muerte celular. Oft y colaboradores (42) han mostrado también, que el cambio epitelial-mesenchimático producido por TGF- β en líneas celulares polarizadas de mama sólo tiene lugar cuando estas están transformadas por ras. Se sugiere, por tanto, que la activación de la vía de señalización de ras es requisito esencial para la transformación de célu-

las epiteliales a fibroblásticas. No obstante, modificaciones adicionales, bien genéticas o epigenéticas, deben estar implicados en el proceso, ya que no todas las células epidérmicas que presentan mutaciones en ras son susceptibles a la transición inducida por TGF- β_1 (45).

P53 Y LA CARCINOGENESIS DE PIEL HUMANA

El principal agente inductor del cáncer de piel humano es la radiación ultravioleta (UV). El papel de p53 en la carcinogénesis epidérmica humana se puso claramente de manifiesto cuando se demostró que la radiación UV solar es la responsable directa de las mutaciones de este gen en la epidermis (46). La radiación UV-B del sol induce dímeros de ciclobutano de pirimidina y fotoproductos en el DNA de las células epidérmicas. La mayoría de los fotoproducto se reparan, pero durante la replicación del DNA algunas células adquieren una mutación puntual C-T en el gen p53. Aquellos queratinocitos p53+/- se han denominado "sunburn cells-" (SBC-). Cuando la siguiente exposición al sol induce la proteína p53, las células normales dañadas por la radiación UV durante la fase de replicación del DNA mueren por apoptosis. Sin embargo, sólo lo hacen alrededor de la mitad de los queratinocitos p53+/- . Por tanto, una célula p53+/- puede expandirse clonalmente y producir una lesión benigna, queratosis actínica. En la carcinogénesis de piel humana la radiación UV actúa al mismo tiempo como un iniciador y un promotor tumoral (Fig. 3). Actúa como un iniciador ya que es capaz de producir directamente lesiones en un gen implicado en la iniciación de la carcinogénesis. En este caso, el gen mutado es p53, a diferencia del modelo de ratón en el que mutaciones en p53 ocurrían durante la progresión

maligna y H-ras era el gen que con mayor frecuencia se alteraba en la iniciación. La radiación UV actúa también como un promotor, ya que ejerce una presión selectiva para expandir clonalmente a las células que tienen mutado el gen p53 y son resistentes a la muerte celular inducida por subsiguientes exposiciones a la radiación solar. Mutaciones en otros genes podrían contribuir también a la formación de queratosis actínicas. Aproximadamente el 25% de las queratosis actínicas desaparecen cada año en ausencia de posteriores exposiciones a la radiación solar. Sin embargo, una exposición continuada al sol podría seleccionar expansiones clonales adicionales de las células SBC- y favorecer el que una célula llegue a ser p53-/- (pérdida alélica, mutaciones puntuales). La mutación homocigótica de p53 podría desencadenar la inestabilidad genética de las células y conducir a aneuploidía y amplificación génica, a mutaciones inducidas por la radiación UV en otros genes y a la formación de carcinomas epidermoides en la piel.

NUEVOS MODELOS ANIMALES DE CARCINOGENESIS EXPERIMENTAL BASADOS EN LA INGENIERIA GENETICA

La importancia de lesiones genéticas específicas en el cáncer se ha podido comprobar directamente merced al desarrollo de ratones transgénicos o deficientes ("knockout") para un gen determinado. En la actualidad existe un gran número de modelos transgénicos en los que un gen normal o mutado, introducido por la vía germinal, se expresa en todas las células del animal adulto o específicamente en un tejido determinado. De esta manera se ha podido evaluar la contribución de mutaciones genéticas específicas al desarrollo tumoral en distintos órganos y tejidos. Por ejemplo, se ha podido

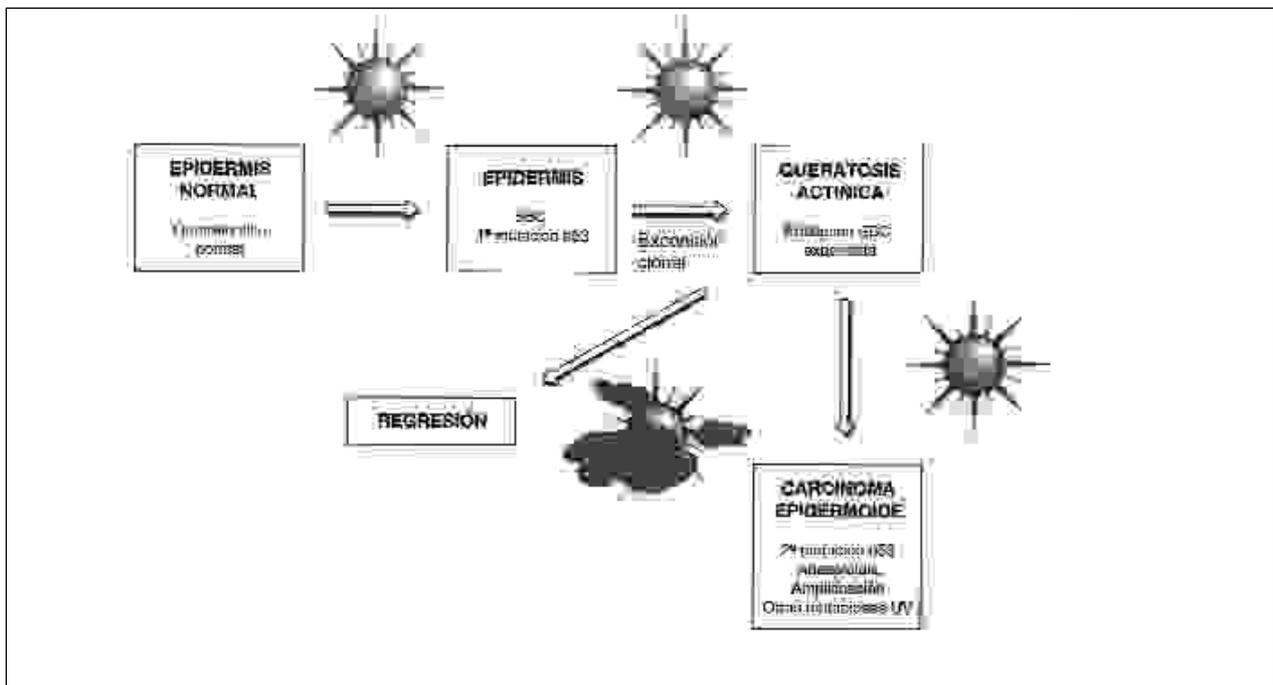


Fig. 3. Esquema de la carcinogénesis de piel inducida por la radiación UV solar (adaptado de Ziegler et al., Nature, 372: 773-776, 1993).

demostrar fehacientemente que el oncogén H-ras puede sustituir a un mutágeno químico en la iniciación de la carcinogénesis de piel de ratón (47), como se mencionaba anteriormente. Por otro lado, ratones deficientes para p53 (p53^{-/-}) (en los que los genes se eliminaron por un mecanismo de mutagénesis por inserción y recombinación homóloga) han demostrado el papel clave del gen p53 en la génesis de muchos tipos de cáncer. Los embriones de animales p53^{-/-} se desarrollan normalmente hasta el nacimiento, pero a una edad temprana (3-6 meses) generan tumores en distintos tejidos (48), más frecuentemente linfomas linfocíticos. P53 es, por tanto,

un gen de susceptibilidad al cáncer, e individuos que heredan una mutación en el gen p53, como en el caso de pacientes que sufren el síndrome de Li-Fraumeni, son proclives a desarrollar distintos tipos de cáncer (sarcomas, tumores cerebrales y leucemias son los tipos de cáncer más frecuentes observados en estos pacientes) (49). Las diferencias observadas, en cuanto al fenotipo de los tumores que desarrollan los pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni y los ratones knockout para p53, se atribuyen a diferencias de especie y a sutiles diferencias funcionales de la proteína p53 en las células de ratón y en las células humanas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yuspa SH. The pathogenesis of squamous cell cancer: Lessons learned from studies of skin carcinogenesis. Thirty third GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.*, 54: 1178-1189, 1994.
2. Fuchs E. Epidermal differentiation: The bare essentials. *J. Cell Biol.*, 111: 2807-2814, 1990.
3. Lowy DR y Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 851-891, 1993.
4. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*, 254: 1138-1146, 1991.
5. Quintanilla M, Brown K, Ramsden M y Balmain A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature*, 322: 78-80, 1986.
6. Brown K, Quintanilla M, Ramsden M, Kerr IB, Young S y Balmain A. v-Ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell*, 46: 447-456, 1986.
7. Brown K y Balmain A. Transgenic mice and aquamous multistage skin carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.*, 14: 113-124, 1995.
8. Aldaz CM, Trono D, Larcher F, Slaga TJ y Conti CJ. Sequential trisomization of chromosomes 6 and 7 in mouse skin premalignant lesions. *Mol. Carcinog.*, 2: 22-26, 1989.
9. Kemp CJ, Fee F y Balmain A. Allelotype analysis of mouse skin tumours using polymorphic microsatellites: sequential genetic alterations on chromosomes 6, 7 and 11. *Cancer Res.*, 53: 6022-6027, 1993.
10. Caulín C, López-Barcons LI, González-Garrigues M, Navarro P, Lozano E, Rodrigo I, Gamallo C, Cano A, Fabra A y Quintanilla M. Suppression of the metastatic phenotype of a mouse skin carcinoma cell line independent of E-cadherin expression and correlated with reduced levels of Ha-ras oncogene products. *Mol. Carcinog.*, 15: 104-114, 1996.
11. Bremner R y Balmain A. Genetic changes in skin tumour progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell*, 61: 407-417, 1990.
12. Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R y Balmain A. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumors of interspecific hybrid mice. *Oncogene*, 6: 2363-2369, 1991.
13. Ko LJ y Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes & Dev.*, 10: 1054-1072, 1996.
14. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW y Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75: 817-825, 1993.
15. Mittnacht S. Control of pRb phosphorylation. *Curr. Op. Gen. Dev.*, 8: 21-27, 1998.
16. Mitchison TJ y Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84: 371-379, 1996.
17. Ozawa M y Kemler R. Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *J. Cell Biol.*, 116: 989-996, 1992.
18. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S y Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9: 541-573, 1993.
19. Chou Y-H, Skalli O y Goldman RD. Intermediate filaments and cytoplasmic networking: New connections and more functions. *Curr. Op. Cell Biol.*, 9: 49-53, 1997.
20. Chicurel ME, Chen CS y Ingber DI. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr. Op. Cell Biol.*, 10: 232-239, 1998.
21. Boudreau N y Bissell M. Extracellular matrix signalling: Integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr. Op. Cell Biol.*, 10: 640-646, 1998.
22. Navarro P, Gómez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M y Cano A. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse skin carcinogenesis. *J. Cell Biol.*, 115: 517-533, 1991.
23. Cano A, Gamallo C, Kemp CJ, Benito N, Palacios J, Quintanilla M y Balmain A. Expression pattern of the cell adhesion molecules E-cadherin, P-cadherin and a6b4 integrin is altered in premalignant skin tumors of p53-deficient mice. *Int. J. Cancer*, 65: 254-262, 1996.
24. Caulín C, Bauluz C, Gandarillas A, Cano A y Quintanilla M. Changes in keratin expression during malignant progression of transformed mouse epidermal keratinocytes. *Exp. Cell Res.*, 204: 11-21, 1993.
25. Larcher F, Bauluz C, Díaz-Guerra M, Quintanilla M, Conti CJ, Ballestin C y Jorcano JL. Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol. Carcinog.*, 6: 112-121, 1992.
26. Llorens A, Rodrigo I, López-Barcons LI, González-Garrigues M, Lozano E, Vinyals A, Quintanilla M, Cano A y Fabra A. Down-regulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linked to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab. Invest.*, 78: 1131-1142, 1998.
27. Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, Conti CJ y Jorcano JL. Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res.*, 56: 5391-5396, 1996.
28. Haddow S, Fowles DJ, Parkinson K, Akhurst RJ y Balmain A. Loss of growth control by TGF-beta occurs at a late stage of mouse skin carcinogenesis and is independent of ras gene activation. *Oncogene*, 6: 1465-1470, 1991.
29. Barrandon Y y Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell*, 50: 1131-1137, 1987.
30. Blay J y Brown KD. Epidermal growth factor promotes the chemotactic migration of cultured rat intestinal epithelial cells. *J. Cell Physiol.*, 124: 107-112, 1985.
31. Stampfer MR y Bartley JC. In Lippmann M, R Dickson (eds): *Breast Cancer: Cellular and Molecular Biology*, Boston, Kluwer Academic Publishers, pp 1-24, 1988.
32. Gavrilovic J, Moens G, Thierry JP y Jouanneau J. Expression of

- transfected transforming growth factor-alpha induces matrix-degrading potential in a rat bladder carcinoma cell line. *Cell Regul.*, 1: 1003-1014, 1990.
33. El Badry OM, Minniti C, Kohn EC, Houghton PJ, Daughaday WH y Helman LJ. Insuline-like growth factor II acts as an autocrine motility factor in human rhabdomyosarcoma tumors. *Cell Growth Different.*, 1: 325-331, 1990.
 34. Stracke ML, Kohn EC, Aznavoorian SA, Wilson LL, Salomon D, Krutzsch HC, Liotta LA y Schiffman E. Insulin-like growth factors stimulate chemotaxis in human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153: 1076-1083, 1988.
 35. Tsarfaty I, Rong S, Resau JH, Rulong S, Pinto da Silva P y Van de Woude GF. The met proto-oncogen mesenchymal to epithelial cell conversion. *Science*, 263: 98-101, 1994.
 36. Woolf AS, Kolatsi-Joannou J, Hardman P, Andermacher E, Moorby C, Fine LG, Jat PS, Noble MD y Gherardi E. Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *J. Cell Biol.*, 128: 171-184, 1995.
 37. Caulín C, Scholl FG, Frontelo P, Gamallo C y Quintanilla M. Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor-b1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth & Differ.*, 6: 1027-1035, 1995.
 38. Frontelo P, González-Garrigues M, Vilaró S, Gamallo C, Fabra A y Quintanilla, M. Transforming growth factor b1 induces squamous carcinoma cell variants with increased metastatic abilities and a disorganized cytoskeleton. *Exp. Cell Res.*, 244: 420-432, 1998.
 39. Santibáñez JF, Frontelo P, Iglesias M, Martínez J y Quintanilla M. Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor b1-induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes. *J. Cell. Biochem.*, 1999. En prensa.
 40. Andreassen PA, Kjoller L, Christensen L y Duffy MJ The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int. J. Cancer*, 72: 1-22, 1997.
 41. Cui W, Fowles D, Bryson F, Duffie E, Ireland H, Balmain A y Akhurst RJ. TGF-b1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell*, 86: 531-542, 1996.
 42. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H y Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev.*, 10: 2462-2577, 1996.
 43. Huang H, Murtaugh LC, Vize PD y Whitman M. Identification of a potential regulator of early transcriptional responses to mesoderm inducers in the frog embryo. *EMBO J.*, 14: 5965-5973, 1995.
 44. Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst R y Balmain A. Transforming growth factor b is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: Implications for tumor invasion. *Cell Growth Differ.*, 9: 393-404, 1998.
 45. Miettinen PJ, Ebner R, López A y Derynck R. TGFb induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.*, 127: 2021-2036, 1994.
 46. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T y Brash DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, 372: 773-776, 1994.
 47. Bailleul B, Surani MA, White S, Barton SC, Brown K, Blessing M, Jorcano J y Balmain A. Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell*, 62: 697-708, 1990.
 48. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS y Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356: 215-221, 1992.
 49. Israel MA. Molecular biology of childhood neoplasms. En "The molecular basis of cancer" (Mendelshon J, Howley PM, Israel MA y Liotta LA eds.), WB Saunders Co, Philadelphia, pp. 294-316, 1995.