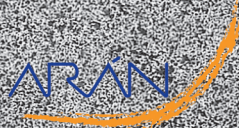
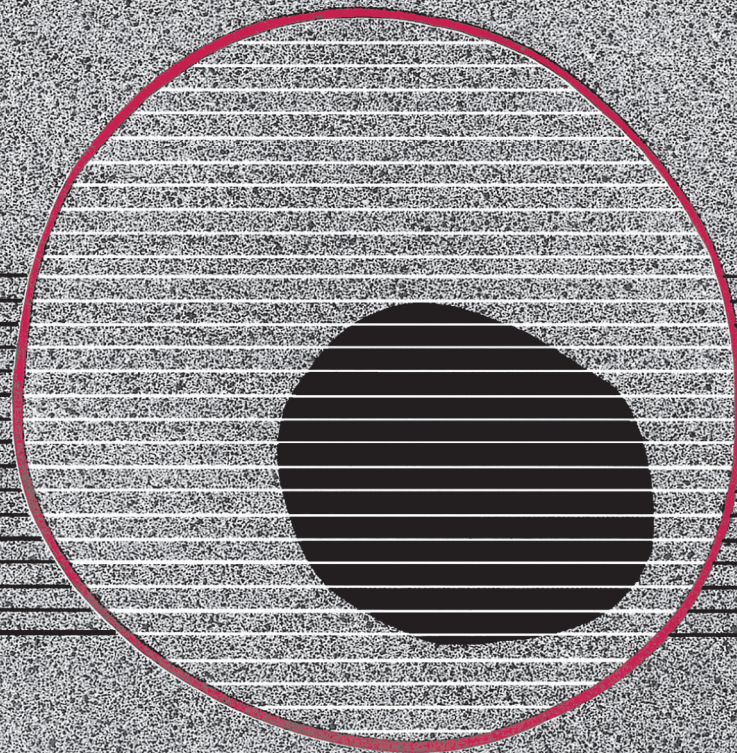


revisiones en

CANCER

ONCOGENES Y CÁNCER II

VOL. 13, NÚM. 2, 1999



revisiones en

CANCER

SUMARIO

VOL. 13

NÚM. 2

Genes de susceptibilidad y cáncer de mama M. De La Hoya	43
Alteraciones genéticas en el cáncer colorrectal T. Caldés Llopis	59
Consejo genético en cáncer colorrectal P. Pérez Segura	68
Citoquinas C. Roncero	77

Genes de susceptibilidad y cáncer de mama

M. DE LA HOYA

Laboratorio de Inmunología y Oncología Molecular. Hospital Universitario San Carlos. Madrid

GENES DE SUSCEPTIBILIDAD: FRECUENCIA, PENETRANCIA Y ESPECIFICIDAD

La existencia de factores genéticos que predisponen al desarrollo de cáncer de mama se ilustra claramente con el dato de que tras el sexo y la edad, una historia familiar positiva es el principal factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad. Se considera que la proporción de cánceres de mama directamente atribuibles a factores hereditarios es de un 5% a un 10% del total. Predicciones epidemiológicas han estimado que hasta un 36% de los cánceres de mama diagnosticados en mujeres menores de 30 años pueden estar ligados a un factor genético (Claus et al, 1991).

En los últimos años se han identificado diversos genes de susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. Sus características se resumen en la tabla I. Al hablar de genes de susceptibilidad es necesario introducir los conceptos de *frecuencia* y *penetrancia*. El primero se refiere a la proporción de portadores de mutaciones en la población general y el segundo a la probabilidad de que una persona portadora del gen mutado desarrolle finalmente la enfermedad. En general se habla de *frecuencia* y *penetrancia* como características propias de un gen de susceptibilidad aunque de un modo más apropiado se deben considerar características propias de una mutación en particular. Los estudios de ligamiento facilitan la localización de genes de alta *penetrancia*, que a la postre

TABLA I

GENES DE SUSCEPTIBILIDAD IMPLICADOS EN CÁNCER DE MAMA

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	<i>Penetrancia</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Especificidad</i>
BRCA1	17q21	alta	baja ~ 0,1%	alta: mama, ovario, ¿próstata?
BRCA2	13q12-13	alta	baja ~ 0,1%	alta: mama, ovario, ¿próstata?
BRCA3*)	8p12-22 ?	alta	baja ?	alta: ¿mama?
p53	17p13,1	alta	muy baja	baja: sarcomas, leucemias, cerebrales, mama,
PTEN/MMAC1	10q23	alta?	desconocida	baja: mama, endometrio cerebro, pulmón, próstata,
ATM	11q22-23	baja	alta 0,7%	baja: linfomas, ¿mama?
HRAS1/VNRT	11p15,5	baja	muy alta 6%	¿mama?

*) Alrededor de un 10-20% de las familias con alta incidencia de cáncer de mama no son portadoras de mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2. Estudios de ligamiento realizados en estas familias sugieren que un tercer gen, hasta la fecha no identificado, podría residir en la región cromosómica indicada (Greene, M.H. 1997).

resultan ser genes de baja *frecuencia*. Este es el caso de los genes BRCA1, BRCA2, p53 y probablemente PTEN/MMAC1. La identificación de genes de baja *penetrancia* suele ser una tarea ardua donde es difícil demostrar sin ambigüedades la relación entre el gen y la enfermedad en cuestión. En lo concerniente al cáncer de mama, este es el caso del gen ATM y de algunos alelos de la región VNTR adyacente al gen HRAS1. Otro concepto útil cuando hablamos de genes de susceptibilidad a desarrollar cáncer es el de la *especificidad*. Los genes que, aún expresándose de forma constitutiva y/o inducida en numerosos tejidos, sólo confieren susceptibilidad a desarrollar tumores en un número limitado de tejidos son genes de alta especificidad, ese es el caso de BRCA1 y BRCA2. Los genes de baja *especificidad*, por el contrario, confieren susceptibilidad a desarrollar tumores en numerosos tejidos. p53 es un ejemplo paradigmático de este tipo de genes de susceptibilidad. En general, los genes de baja *especificidad* están implicados en procesos de regulación del ciclo celular y/o apoptosis comunes a todas las células mientras los genes de alta *especificidad* participan bien en mecanismos especializados de tejidos concretos o bien en mecanismos más generales cuya supresión sin embargo, por alguna razón, solo promueve el desarrollo de tumores en un limitado número de tejidos. Por eso el estudio de la función bioquímica de los genes de alta *especificidad* puede aportar datos claves para la comprensión de un proceso carcinogénico concreto y/o para la identificación del papel de determinados carcinógenos.

Los genes NER constituyen un buen ejemplo para ilustrar el concepto de *especificidad* y sus implicaciones. Los pacientes con *xeroderma pigmentoso*, una enfermedad hereditaria que se transmite de forma autosómica recesiva, desarrollan numerosos tumores cutáneos en zonas expuestas a la radiación solar pero no presentan un incremento equivalente de la tendencia a desarrollar otro tipo de tumores. Estos pacientes son portadores de mutaciones en alguno de los genes implicados en el mecanismo de reparación del DNA denominado NER (del inglés nucleotide-excision repair). Estos genes se expresan en todos los tejidos y el hecho de que los pacientes sean especialmente sensibles a desarrollar cánceres de piel indica que las radiaciones U.V son el principal inductor de mutaciones (susceptibles de ser reparadas vía NER) al que los humanos estamos expuestos (Lengauer et al, 1998 y referencias allí indicadas). Si, por el contrario, fuese algún carcinógeno introducido de modo habitual en la dieta el que provocase daños en el DNA susceptibles de ser reparados vía NER estos mismos genes no estarían implicados en el desarrollo de tumores de piel pero sí probablemente en el de tumores del aparato digestivo. Los genes reparadores hMLH1 y hMSH2 son otro ejemplo de genes de susceptibilidad de alta *especificidad* cuya función bioquímica ha ayudado a comprender mejor la ontogenia del síndrome HNPCC (cáncer colorrectal no polipósico). Del mismo modo es previsible que los avances recientes en el estudio de la función de los genes BRCA1 y BRCA2 ayuden a comprender mejor la ontogenia del cáncer de mama.

BRCA1 Y BRCA2

BRCA1 ES UN REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El estudio del papel de BRCA1 en la regulación de la expresión génica se inició con la publicación de dos trabajos que demostraban como el extremo C-terminal de esta proteína (aa1528-aa1863) fusionado al dominio de unión a DNA del factor de transcripción GAL4 tenía actividad transactivadora (Chapman et al, 1996. Monteiro et al, 1996). Estos trabajos iniciales demostraron además que diversas mutaciones asociadas con alta predisposición a desarrollar cáncer de mama anulaban la capacidad transactivadora de la proteína. Estos resultados sugerían que BRCA1 podía ser un factor de transcripción, sin embargo faltaba demostrar la unión específica de BRCA1 al DNA.

No existe en BRCA1 ninguna región que presente homología de secuencia con dominios de unión a DNA conocidos, pero en un principio se supuso que el extremo N-terminal de la proteína podía ser la región implicada en la interacción con el DNA. No existía ninguna evidencia experimental que apoyase esta suposición, sin embargo existían razones que la fundamentaban :

—Los primeros 110 residuos de BRCA1 constituyen un dominio RING que por el hecho de poseer dos átomos de Zn²⁺ coordinados podría recordar a los dominios de unión DNA del tipo *zinc finger* presentes en muchos factores de transcripción.

—Esta región de BRCA1 es la más conservada entre especies, sugiriendo un papel fundamental en la función de la proteína (Blackwood y Weber, 1998; Abel et al, 1995; Sharan et al, 1995). En general, el dominio de unión a DNA suele ser la región de un factor de transcripción más conservada entre especies.

Hoy sabemos que los dominios RING, identificados también en muchas otras proteínas, son capaces de heterodimerizar y de mediar interacciones entre proteínas (Borden et al, 1995) quedando descartado así su papel en la unión al DNA. En consonancia con la función indicada, recientemente se han identificado dos proteínas que específicamente interaccionan con el dominio RING de BRCA1: BARD1, una proteína que a su vez contiene un dominio RING (Wu et al, 1996; Jin et al, 1997) y BAP1, una ubiquitina hidrolasa capaz (en experimentos de transfección) de potenciar la capacidad de BRCA1 para actuar como supresor del ciclo celular (Jensen et al, 1998).

Posteriormente se demostró que BRCA1 es un componente de la holoenzima RNA polimerasa II y que su extremo C-terminal es el responsable de la asociación a este complejo multiproteico (Scully et al, 1997). Este resultado apoyaba la idea de que BRCA1 no fuera un factor de transcripción pero si una proteína adaptadora que modulase la interacción entre algún factor de transcripción y la maquinaria basal de transcripción. Confirmando esta hipótesis, trabajos recientes demuestran que BRCA1 regula positivamente la expresión del gen p21^{WAF1/CIP1} (Somasundaram et al, 1997) actuando como coactivador de p53 (Ouchi et al, 1998; Zhang et al, 1998b). En el contexto de este promotor, la región C-

terminal de p53 (aa300-a393) interacciona con una región de BRCA1 comprendida entre los aminoácidos 224 y 500 (región codificada por el extremo 5' del exón 11 del gen). Mutantes de BRCA1 carentes de señal de localización nuclear, extremo C-terminal o dominio de unión a RAD51 son incapaces de activar el promotor del gen p21^{WAF1/CIP1} (Somasundaram et al, 1997).

BRCA1 regula positivamente los promotores de los genes bax (Zhang et al, 1998b) y *mdm2* (Ouchi et al, 1998). Los promotores de estos genes, al igual que ocurre con el promotor del gen p21^{WAF1/CIP1}, contienen sitios de unión para p53, aunque en el contexto de estos promotores no se ha demostrado el papel de BRCA1 como coactivador de este factor de transcripción.

En relación al papel de BRCA1 como coactivador de p53 es interesante señalar que algunos trabajos han sugerido la presencia de mutaciones concretas de p53 en los tumores de mama familiares asociados a BRCA1 (Crook et al, 1997; Crook et al, 1998). En estos trabajos se secuenció p53 en tumores mamarios con distintas mutaciones en BRCA1. El 66% de los tumores presentaba mutaciones en el gen p53 (frente a un 33% en los tumores mamarios control no asociados a BRCA1), siendo la mayoría mutaciones descritas por primera vez o poco frecuentes y localizadas en el exón 5 del gen p53. Sin embargo el significado de estos resultados es poco claro y cuestionado por otros trabajos que no han encontrado una frecuencia especialmente alta de mutaciones en p53 asociada a tumores de mama con mutaciones en BRCA1 (Schlichtholz et al, 1998).

BRCA1 puede activar la expresión del gen p21^{WAF1/CIP1} en ausencia de p53, probablemente a través de motivos STAT (Somasundaram et al, 1997. Ouchi et al, 1998) lo que sugiere que el papel de BRCA1 como coactivador no está limitado al factor de transcripción p53. Además, recientemente se ha demostrado la interacción entre BRCA1 y otro factor de transcripción clave en la regulación del ciclo celular, c-Myc (Wang et al, 1998). En este caso la interacción de BRCA1 reprime la capacidad transactivadora de este factor. También se ha descrito la interacción de BRCA1 con el coactivador CBP (Cui et al 1998) y con CtIP, una proteína de función desconocida pero capaz de asociarse al represor transcripcional CtBP1 (Wong et al, 1998). La actividad transcripcional de BRCA1 *in vitro* está muy influenciada por la concentración de TFIID y es máxima en presencia del coactivador PC4 lo que de nuevo sugiere un papel para BRCA1 como proteína adaptadora en un complejo transcripcional (Haile et al, 1999).

BRCA1 se comporta como un gen supresor clásico, en el que la pérdida de los dos alelos es necesaria para iniciar el proceso oncogénico. (Zhang et al 1998a). Numerosos experimentos en cultivos celulares confirman este papel como gen supresor, capaz de regular negativamente el ciclo celular (Holt et al, 1996; Somasundaram et al, 1997) e inducir apoptosis (Shao et al, 1996). Aunque es más que probable que BRCA1 module la acción de muchos otros factores de transcripción y regule la expresión de numerosos genes, el hecho de que sea capaz de actuar como coactivador de p53 (un gen supresor clásico), como corepresor de c-Myc (un

oncogen clásico) y que active la expresión del gen supresor del ciclo celular p21^{WAF1/CIP1} y del gen proapoptótico bax asocian claramente la función transcripcional de BRCA1 con su papel como gen supresor.

El papel de BRCA1 como regulador positivo de la expresión de p21^{WAF1/CIP1} no está en principio de acuerdo con los resultados derivados de ratones mutantes negativos para el gen BRCA1 (Hakem et al, 1996). La ausencia de BRCA1 es letal en el desarrollo embrionario de estos ratones. Todos los ratones mueren antes del día E7.5 del desarrollo embrionario. La letalidad se debe a un fallo proliferativo, fallo que coincide con una sobreexpresión de p21^{WAF1/CIP1}. Se puede argumentar que BRCA1 tiene un papel represor sobre el gen p21^{WAF1/CIP1} durante el desarrollo embrionario, papel opuesto al que parece tener en células de individuos adultos. Sin embargo también es posible argumentar que la ausencia de BRCA1 hacia el día E7.5, un periodo de proliferación celular máxima en el desarrollo embrionario del ratón, provoque un incremento de los daños en el DNA que termine por activar otras rutas de señalización celular inductoras de la expresión del gen p21^{WAF1/CIP1}. Los ratones BRCA1 -/- expresan niveles muy bajos de *mdm2* (Hakem et al, 1996) lo que podría también en parte explicar la sobreexpresión de p21^{WAF1/CIP1}. Ratones dobles mutantes para BRCA1 y p53 ó p21^{WAF1/CIP1} no sufren un fallo proliferativo hasta alcanzar el día E10.5 del desarrollo embrionario (Hakem et al, 1997) mostrando que p21^{WAF1/CIP1} está implicado en el fallo proliferativo pero sugiriendo a su vez que otros elementos del proceso proliferativo están alterados.

BRCA1 ESTÁ IMPLICADO EN LA RESPUESTA CELULAR A CIERTOS DAÑOS PRODUCIDOS EN EL DNA

Los primeros indicios de que BRCA1 podía estar implicada en procesos de reparación del DNA se derivan de un simple análisis de secuencia. La proteína BRCA1 no presenta homología de secuencia con ninguna otra proteína conocida, sin embargo el extremo C-terminal contiene un motivo de 100 aminoácidos repetido en tandem que se denominó dominio BRCT (por BRCA1C-terminal; Koonin et al, 1996). Análisis computacionales mostraron que este mismo motivo estaba presente en numerosas proteínas divergentes entre sí, pero todas ellas implicadas en procesos de reparación de daños en el DNA (Callebaut et al, 1997; Bork et al, 1997)

Una primera evidencia experimental se obtuvo con el descubrimiento de que BRCA1 interaccionaba con RAD51, una proteína implicada en reparación del DNA. Experimentos de inmunofluorescencia realizados sobre un cultivo sincrónico de células MCF-7 (línea celular humana derivada de un cáncer de mama) reveló, en la fase S del ciclo celular, una distribución nuclear de la proteína muy característico. La señal no aparecía difusa por todo el núcleo celular como ocurre en ensayos similares realizados con, por ejemplo, muchos factores de transcripción, si no muy al contrario concentrada en un número limitado de focos (Chen et al, 1996).

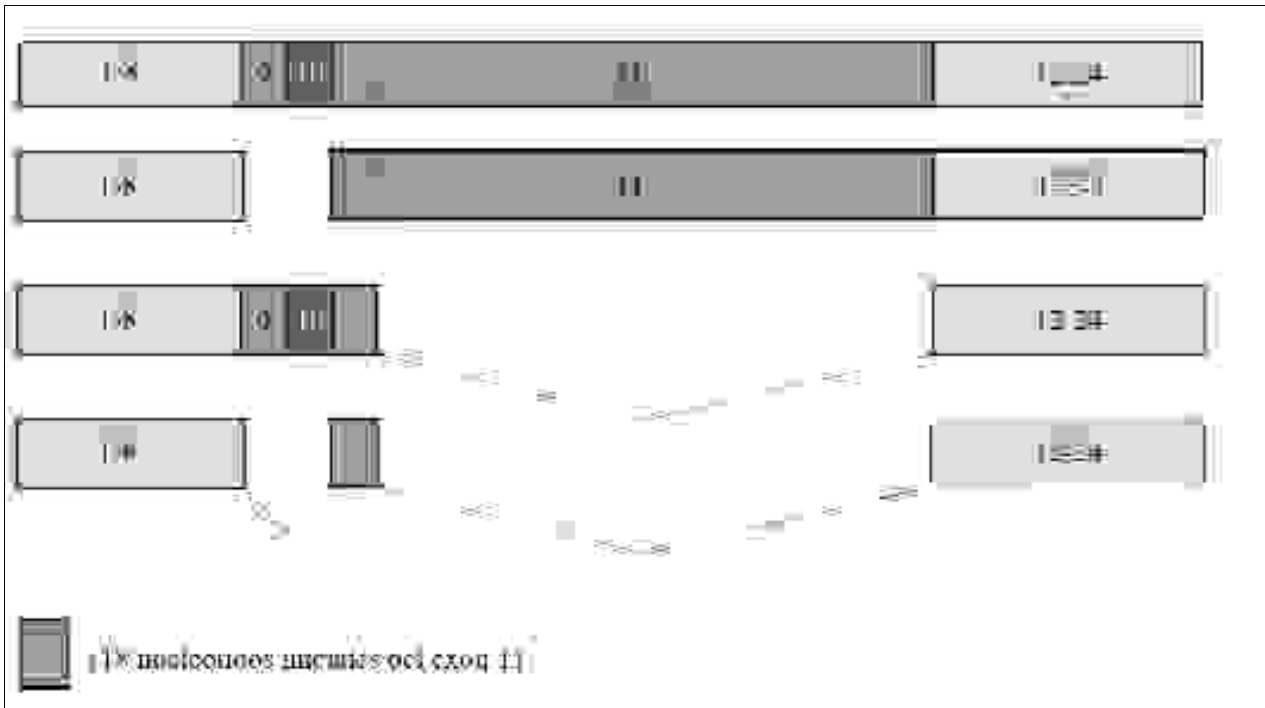


Fig. 1. Procesamientos alternativos del gen BRCA1: Se han descrito numerosos procesamientos alternativos de este gen. En la figura se indican los cuatro mejor caracterizados. Se ha sugerido que las distintas variantes de BRCA1 podrían tener distintas funciones en el control del ciclo celular, sin embargo apenas hay trabajos al respecto y todos los experimentos que se mencionan en el texto se refieren a la proteína BRCA1 de 230kD codificada por el transcrito mayor. Obsérvese cómo las mutaciones germinales localizadas en los exones 1 a 8 y 12 a 24 afectan a todas las variantes, sin embargo no ocurre lo mismo con mutaciones de los exones centrales.

Scully et al, 1997a). Este patrón era específico de la fase S del ciclo celular. Poblaciones enriquecidas con células en fase G1 del ciclo celular mostraban una señal difusa por todo el núcleo celular. El patrón obtenido en núcleos de células en fase S recordaba al que se había descrito para RAD51 (Tashiro et al, 1996). Estudios de doble inmunofluorescencia con microscopía confocal revelaron un significativo (aunque no completo) solapamiento de señales, lo que indicaba la colocalización de ambas proteínas. El mismo estudio demostró que BARD1 también colocalizaba. Del mismo modo se demostró que BRCA1 y RAD51 colocalizan en el núcleo de células en división meiótica. Experimentos adicionales, básicamente inmunoprecipitaciones, demostraron que BRCA1 y RAD51 no sólo colocalizaban, además eran capaces de interactuar físicamente, aunque los experimentos no dejaban claro si la interacción era directa o alguna otra proteína ejercía de adaptador entre BRCA1 y RAD51. Se identificó una región concreta de BRCA1, codificada por el exón 11 (aminoácidos 758-1064) responsable directa de esta interacción (Scully et al, 1997a). RAD51 es un homólogo humano del gen RecA bacteriano. La función de RecA es esencial para la respuesta SOS, una cascada de señales que se activa en respuesta a daños en el DNA e implica la activación transcripcional de distintos genes. (Echols and Goodman, 1991). Estudios en levaduras han demostrado que RAD51 participa en la reparación de roturas de hebra doble en el DNA (reparación que requiere de un proce-

so de recombinación homóloga) y en recombinación meiótica (Shinohara et al, 1992). La interacción de BRCA1 con RAD51 sugería algún papel para BRCA1 en el mantenimiento de la integridad genómica, lo que de confirmarse, podría explicar la razón de que individuos con mutaciones en este gen tuviesen mayor predisposición a desarrollar tumores. Es interesante señalar aquí que ya se había descrito en ese momento la interacción de RAD51 con p53, otro gen supresor implicado en cáncer de mama (Sturzbecher et al, 1996).

Se obtuvo una prueba indirecta del papel de BRCA1 en el mantenimiento de la integridad genómica al demostrarse que su localización nuclear y su estado de fosforilación se modificaban en respuesta a daños en el DNA (Scully et al, 1997b). Se observó que tratando un cultivo celular con agentes que dañan el DNA como hidroximetilurea, radiación U.V., radiación o mitomicina C, se provocaba, en el plazo de una hora, la desaparición de los característicos focos observados con inmunotinción para BRCA1. La inmunotinción generaba ahora una señal difusa en toda la región nuclear. Más interesante aún, en los pocos focos que aún podían observarse en el núcleo de células tratadas con estos agentes, se pudo determinar que BRCA1, BARD1 y RAD51 colocalizaba con PCNA, una subunidad de la DNA polimerasa, sugiriendo que ahora forman parte del complejo proteico asociado a la horquilla de replicación. En células control sin tratar, los complejos BRCA1-RAD51 no colocalizan con PCNA. La proteína colocaliza con

RAD51 y BRCA1 en el núcleo celular y en células tratadas pasa a colocalizar con PCNA (Scully et al, 1997b). Todos estos datos sugieren la existencia en los núcleos de células en división de unos complejos multiproteicos (de los que al menos BRCA1, BARD1 y RAD51 forman parte) que en respuesta a daños en la replicación del DNA se translocarían a regiones de síntesis de DNA. La translocación de estos complejos multiproteicos coincide con una hiperfosforilación de BRCA1 (Scully et al, 1997b). Ni la quinasa dependiente de DNA, ni el producto del gen ATM están implicados en esta hiperfosforilación de BRCA1 (Scully et al, 1997b). Hay pocos datos sobre las proteínas implicadas en modular el estado de fosforilación de BRCA1 o las regiones de BRCA1 susceptibles de fosforilación. Recientemente se ha demostrado que algunos sitios susceptibles de ser fosforilados *in vitro* están localizados en la región comprendida entre los aminoácidos 379 y 408 y que esta región es importante en la función de BRCA1 ya que el efecto supresor del crecimiento que se observa al sobreexpresar BRCA1 en líneas celulares (Holt et al, 1996) desaparece cuando se sobreexpresa un gen BRCA1 del que se ha eliminado la secuencia correspondiente (Burke et al, 1998).

Una prueba directa de la implicación de BRCA1 en procesos de reparación del DNA se obtuvo al generar clones de células MCF-7 resistentes a *cis*-diaminodiclo-roplatino(II) (CDDP). (Husain et al, 1998). Estas células sobreexpresan BRCA1 y son capaces de reparar plásmidos modificados *in vitro* con CDDP con mucha mayor eficacia que las células parentales. Esta capacidad reparadora se pierde cuando se anula la expresión de BRCA1 utilizando oligonucleótidos antisentido.

Los niveles celulares de la proteína BRCA1 disminuyen a las 24 horas (se observa una disminución equivalente del RNA mensajero a las 12 horas) del tratamiento de células MCF-7 con agentes citotóxicos como la adriamicina o la radiación U.V. (Andres et al, 1998). Este resultado sugiere que existe un mecanismo de supervivencia celular que permite a las células que han conseguido reparar adecuadamente su DNA entrar de nuevo en ciclo celular y desensibilizarse frente a la apoptosis.

BRCA1 PUEDE ESTAR IMPLICADO EN EL PUNTO DE RESTRICCIÓN G₂/M

Numerosas evidencias experimentales indican que durante la fase G₂/M del ciclo celular BRCA1 esta asociado preferentemente al centrosoma (Hsu et al, 1998). BRCA1, en su forma hipofosforilada, interacciona con g-Tubulina, una proteína presente en el material pericentriolar y responsable de la nucleación de los microtúbulos a través de su interacción con el extremo (-) de éstos (Stearns et al, 1994). ¿Que implicaciones puede tener el hecho que BRCA1 se asocie al centrosoma?. Numerosas proteínas implicadas en el punto de restricción G₂/M se asocian al centrosoma en esta fase del ciclo celular. Así ocurre con la ciclina B, p34^{cdc2}, 14-3-3

y p53. Es posible por tanto que BRCA1 también esté implicado de algún modo en este punto de control del ciclo celular. Sin embargo no tiene por que ser necesariamente así. Es también posible que la asociación de BRCA1 con el centrosoma sea simplemente un mecanismo para conseguir una apropiada distribución de BRCA1 en las células hijas, como se ha descrito para otras proteínas como NuMa (Compton et al, 1992).

Experimentos adicionales que sugieren un papel de BRCA1 en el control de la transición G₂-M se realizaron con la línea celular humana 184A1 derivada de un epitelio de mama no tumorigénico. En este modelo experimental se observa que la sobreexpresión de un fragmento de BRCA1 C-terminal mutado, que se comporta como dominante negativo, produce una aceleración del ciclo celular debido a un acortamiento de la transición G₂-M. Además se observa como en las células transfectadas la inducción de parada del ciclo celular en la fase G₂-M provocada por colchicina (un inhibidor de la tubulina) se reduce y al mismo tiempo aumenta la tasa de muerte celular inducida por este compuesto. (Larson et al, 1997). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de un extremo C-terminal de BRCA1 dominante negativo suprime un punto de control en la transición G₂-M del ciclo celular.

Un papel de control en el punto de restricción G₂/M podría explicar, al menos en parte, el hecho de que los tumores con mutaciones en BRCA1 acumulen muchas alteraciones cromosómicas si se los compara con tumores no relacionados con BRCA1 (Tirkkonen et al, 1997). Sin embargo el papel de BRCA1 en el control de la integridad del DNA, por sí sólo, también justificaría un aumento de las alteraciones cromosómicas (Zhang et al, 1998; Lengauer et al, 1998).

¿BRCA2 ES UN REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA?

La proteína BRCA2, al igual que ocurre con la proteína BRCA1, no presenta homologías de secuencia significativas con ninguna proteína descrita hasta la fecha. Sin embargo, el grupo de Kouzarides observó que el extremo 5' del exón 3 de BRCA2 codifica para una secuencia aminoacídica homóloga a una región transactivadora del factor de transcripción *c-jun*. El mismo grupo comprobó que este exón fusionado al dominio de unión a DNA de LexA tiene capacidad transactivadora (Milner et al, 1997).

Numerosos datos experimentales indican una estrecha relación entre el estado de acetilación de las histonas y el proceso de regulación transcripcional (Pazin y Kadonaga, 1997; Wolffe et al, 1997) y de hecho, la actividad HAT (histona acetil transferasa) se ha descrito en numerosas proteínas implicadas en la regulación transcripcional como es por ejemplo el caso de los coactivadores p300/CBP y P/CAF o del factor basal TAF II 250. Recientemente dos trabajos han asociado BRCA2 con una actividad enzimática acetiltransferasa sugiriendo así un papel en la regulación transcripcional para esta proteína. Sin embargo los dos trabajos muestran resultados notablemente discrepantes. En un trabajo se describe

como la región N-terminal de BRCA2 tiene actividad acetiltransferasa *per se* cuando se utiliza como sustrato específicamente las histonas H3 y/o H4 (Siddique et al, 1998). Es interesante señalar que este trabajo demuestra también como precisamente el exón 3 de BRCA2 es prescindible para esta actividad enzimática. El otro trabajo relaciona también BRCA2 con la actividad HAT y explícitamente con una actividad reguladora de la transcripción (Fuks et al, 1998). Sin embargo en este segundo trabajo se sugiere que BRCA2 no tiene actividad HAT *per se* y requiere de la interacción con el coactivador P/CAF para catalizar la reacción.

Recientemente se ha demostrado también que, en determinadas condiciones, BRCA2 puede *in vitro* interaccionar con p53 y reprimir su actividad transcripcional. RAD51 favorece el papel represor de BRCA2 en este sistema experimental. (Marmorstein et al, 1998).

Todos estos datos sugieren un papel activo de BRCA2 en la regulación de la expresión génica, sin embargo el trabajo experimental acumulado hasta la fecha es sensiblemente menor al existente en torno a BRCA1 y lo que es más importante, hasta la fecha no se ha descrito ningún gen concreto regulado por BRCA2 por lo que el papel de este gen en la regulación de la expresión génica sigue siendo especulativo.

BRCA2 PARTICIPA JUNTO CON BRCA1 EN LA RESPUESTA CELULAR A CIERTOS DAÑOS PRODUCIDOS EN EL DNA

El gen BRCA2 se expresa a niveles fácilmente detectables en la etapa intermedia del desarrollo embrionario del ratón (a partir del día E7.5, etapa del desarrollo embrionario donde se dan las tasas más altas de proliferación celular) y en el organismo adulto, especialmente en testículo, ovario y timo. Este patrón de expresión es coincidente con los patrones de expresión de BRCA1 y RAD51. BRCA1 y BRCA2 también se expresan de forma coordinada en el epitelio mamario (Sharan et al, 1997 y referencias allí indicadas).

La primera evidencia de que BRCA2 puede estar implicado en reparación del DNA se derivó de estudios realizados con ratones mutantes nulos para este gen. (Sharan et al, 1997). Los ratones heterocigotos BRCA2 +/- tienen un desarrollo embrionario normal y no se ha observado que presenten una especial susceptibilidad a desarrollar procesos tumorales. Sin embargo, los ratones BRCA2 -/- no son viables. La letalidad se manifiesta el día E7.5 debido a un fallo proliferativo de las células embrionarias. Se determinó la sensibilidad de embriones E3.5 a la irradiación con rayos g. Los embriones heterocigotos tenían una susceptibilidad a la radiación similar a la de los embriones normales, sin embargo los embriones homocigotos eran especialmente sensibles a la radiación sugiriendo que tenían defectos en el sistema de reparación de roturas en la doble hebra del DNA. Es interesante señalar que recientemente se ha demostrado que los embriones de ratones defectivos para el gen BRCA1 son igualmente hipersensibles a la radiación g (Shen et al, 1998). En estudios con ratones mutantes nulos para RAD51 también se había observado la letali-

dad de la delección homocigota con defecto de la proliferación celular hacia el día E7.5 y una especial hipersensibilidad de las células embrionarias a la radiación g (Lim et al, 1996). Estas coincidencias y un patrón de expresión similar sugerían la cooperación de BRCA2 con RAD51 en la función reparadora del DNA. El hecho de que un ensayo basado en el sistema de dos híbridos demostrase la interacción física entre BRCA2 y RAD51 reforzaba esta tesis. (Sharan et al, 1997). Es interesante señalar que mientras la homología general entre BRCA2 murino y humano es baja, un 59%, la región C-terminal de BRCA2, que se identificó como responsable de la interacción con RAD51 (aminoácidos 3196-3232), presenta una homología del 95% sugiriendo que es una región clave en la función de BRCA2.

El exón 11 de BRCA2 contiene ocho repeticiones de un motivo denominado BRC, muy conservado entre especies, del que hasta hace muy poco se desconocía su función (Bertwistle y Ashworth, 1998). Trabajos recientes, basados también en el sistema de dos híbridos y realizados con el gen BRCA2 humano, indican que estas repeticiones son motivos de unión a RAD51 de mayor afinidad que la región C-terminal originalmente descrita en ratón (Chen et al, 1998b ; Marmorstein et al, 1998). Los ratones mutantes nulos para BRCA2 descritos originalmente carecían de todo el exón 11, y por tanto de los ocho dominios BRC. Los ratones mutantes nulos que conservan parte del exón 11, incluyendo tres dominios BRC, presentan un fenotipo menos severo y los ratones mutantes nulos homocigotos que conservan todo el exón 11 son viables (Friedman et al, 1998). Estos datos sugieren que los dominios BRC, y por consiguiente probablemente la interacción de BRCA2 con RAD51, son críticos para un correcto desarrollo embrionario. Se ha demostrado la presencia de complejos BRCA2-RAD51 *in vivo* mediante coinmunoprecipitación (Chen et al, 1998).

Una evidencia directa de la implicación de BRCA2 en algún mecanismo de reparación del DNA se obtuvo al comprobar que la línea celular Capan-1 (derivada de un cáncer de páncreas humano), que contiene una mutación homocigota que genera una terminación prematura en el codón 2003 del gen BRCA2, es especialmente sensible al tratamiento con MMS (metanosulfonato de metilo). La expresión de un gen BRCA2 exógeno normal, pero no la expresión de un gen BRCA2 con los dominios BRC deleccionados, confiere a estas células resistencia a MMS (Chen et al, 1998b). Este mismo trabajo demuestra también que la proteína BRCA2 endógena de células Capan-1 retiene la capacidad de unirse a RAD51. Tomados en conjunto, estos resultados indican que tanto la interacción con RAD51 como la presencia de un dominio C-terminal funcional son indispensables para que BRCA2 genere resistencia a MMS. Aunque el mecanismo por el que el MMS genera daños en el DNA no está completamente claro, muchos trabajos indican que genera cortes en la doble hebra del DNA y es por tanto equivalente al daño producido en el DNA por la radiación g (Pati et al, 1997). De hecho, la línea celular Capan-1 también es hipersensible a la radiación g (Chen et al, 1998b).

Se ha demostrado, mediante técnicas de inmunoprecipitación en células MCF7, que BRCA2 interacciona físicamente con BRCA1. Además, anticuerpos anti-RAD51 coimmunoprecipitan BRCA2 y BRCA1 (Chen et al, 1998a). La región de BRCA2 determinante en esta interacción está localizada entre los residuos 1314 y 1756. BRCA2 interacciona con la región C-terminal de BRCA1, sin embargo son diferenciables la región transactivadora de BRCA1 de la región susceptible de interaccionar con BRCA2 ya que mutantes de BRCA1 deficientes en transactivación y en su unión a la RNA Polimerasa II siguen siendo capaces de unirse a BRCA2 (Chen et al, 1998a). El mismo trabajo demuestra que BRCA2 colocaliza con BRCA1 y RAD51 en núcleos de células en fase S del ciclo celular y que en respuesta a agentes citotóxicos como la hidroxiurea o la radiación U.V., BRCA2, como ya se había descrito y se ha comentado para el caso de RAD51, BRCA1 y BARD1, pasa a colocalizar con PCNA. También se demuestra que BRCA2 colocaliza con BRCA1 y RAD51 en el núcleo de células en proceso de división meiótica.

Al igual que ocurre con BRCA1, los niveles celulares de BRCA2 descienden apreciablemente en un plazo de 24 horas tras el tratamiento de células MCF-7 con agentes citotóxicos lo que sugiere la existencia de un mecanismo de retorno a los niveles basales de expresión de estos dos genes que permitan la reentrada en ciclo celular tras la correcta reparación del DNA (Andres et al, 1998).

Todos estos datos sugieren que BRCA2 y BRCA1 están implicados en una misma ruta de señalización celular que se activa en respuesta a determinados daños sufridos por el DNA.

MUTACIONES DE ALTA PENETRANCIA, MUTACIONES DE BAJA PENETRANCIA Y POLIMORFISMOS

La mayoría de las mutaciones germinales descritas en los genes BRCA1 y BRCA2, alrededor del 80%, alteran el marco de lectura y son mutaciones de alta penetrancia. En general implican deleciones o inserciones de unas pocas bases. Así es el caso de las mutaciones de BRCA1 185delAG y 5382insC, y de la mutación de BRCA2 6174delT, todas ellas mutaciones prevalentes en la población judía Ashkenazi (Tonin et al, 1996). El truncamiento prematuro de BRCA1 a tan sólo 11 aminoácidos del extremo C-terminal constituyen ya una mutación de alta penetrancia (Friedman et al, 1994), lo que sugiere que la pérdida del dominio transactivador de BRCA1 es el factor desencadenante de la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. También se han descrito numerosas mutaciones que destruyen sitios de *splicing* (por ejemplo Xu et al, 1998), mutaciones que introducen sitios de *splicing* crípticos (Hoffman et al, 1998) e incluso alteraciones genéticas groseras que eliminan exones completos (Puget et al, 1998). Recientemente se ha sugerido que entre un 8% y un 40% de los tumores asociados a BRCA1 podrían implicar este tipo de alteraciones groseras que no son detectables mediante las técnicas con-

vencionales de *screening* de mutaciones (Puget et al, 1999 y referencias allí citadas). También son mutaciones de alta penetrancia aquellas que implican la sustitución de un residuo crítico para la función de las proteínas, como es el caso de algunas mutaciones descritas en los dominios RING (Brzovic et al, 1998) y COOH-terminal (Chapman et al, 1996) de BRCA1.

Se estima que las mutaciones de alta penetrancia confieren a las portadoras un riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama a los 70 años que oscila entre el 60% y el 90% según los distintos estudios (Ellisen et al, 1998; Dunnig et al, 1998; Brody et al, 1998). Estas mutaciones son muy poco frecuentes en la población general (se cree que 1 de cada 500 ó 1000 personas puede ser portadora) y están asociadas a familias con alta carga de cánceres de mama y/u ovario (Ford et al, 1995; Ellisen et al, 1998; Brody et al, 1998). Sin embargo estos genes son muy polimórficos, se ha descrito un número enorme de alelos distintos de BRCA1 y BRCA2, y es razonable pensar que algunos de estos alelos se pudieran comportar como genes de susceptibilidad de baja penetrancia o incluso en algunos casos como variantes protectoras frente al cáncer de mama. En un estudio reciente se analizan cuatro polimorfismos de BRCA1 muy comunes: Gln 356 Arg, Pro 871 Leu, Glu 1038 Gly y Ser 1631 Gly llegándose a la conclusión de que ninguno de ellos está asociado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama y/u ovario. El mismo estudio sugiere que un residuo de arginina en la posición 356 podría proteger frente al desarrollo del cáncer de mama (Dunning et al, 1997). Un estudio realizado sobre 42 pacientes seleccionados por tener una historia familiar moderada o bien sin historia familiar pero con una edad de aparición del tumor temprana identificó mutaciones que implican sustitución de residuos en los dominios RING y C-terminal (Greenman et al, 1997).

Numerosos estudios han descrito la alta prevalencia de alguna mutación concreta de BRCA1 o BRCA2 en determinados países, o bien en determinadas comunidades étnicas. Así, aparte de las mutaciones características de la población Askenatzi que se ha comentado ya en este mismo apartado, se han descrito mutaciones prevalentes de BRCA1 en población islandesa (Johannesdottir et al, 1996), sueca (Johansson et al, 1996), austriaca (Wagner et al, 1996) flamenca (Peelen et al, 1997; Petrij-Bosch et al, 1997), galesa (Lancaster et al, 1998) y franco-canadiense (Tonin et al, 1998) y mutaciones prevalentes de BRCA2 en población islandesa (Thorlacius et al, 1996) y franco-canadiense (Tonin et al, 1998). La existencia de mutaciones prevalentes simplifica enormemente el proceso de detección de mutaciones en las respectivas poblaciones y es de enorme utilidad para valorar el grado de penetrancia y el pronóstico de los tumores asociados a una mutación concreta de uno de estos genes. Los estudios realizados hasta la fecha en nuestro laboratorio sugieren que, desafortunadamente, en el caso de la población española no existen mutaciones prevalentes.

Numerosos genes de susceptibilidad a desarrollar diversos tipos de cánceres son también genes importantes en el desarrollo de cánceres esporádicos, así ocurre

con los genes p53, APC, PTEN/MMAC1 o Rb. Sin embargo no parece ocurrir así con los genes BRCA1 y BRCA2 y apenas se han encontrado alteraciones en estos genes en los cánceres de mama esporádicos. Recientemente se ha demostrado que en algunos tumores de mama el promotor de BRCA1 está hipermetilado y la expresión del gen reprimida (Magdinier et al, 1998), sin embargo este defecto epigenético parece ser un fenómeno poco frecuente.

p53, EL SÍNDROME *LI-FRAUMENI* Y EL CÁNCER DE MAMA

Las familias características del síndrome *Li-Fraumeni* destacan por la alta proporción de cánceres en edades tempranas, especialmente sarcomas, leucemias, tumores cerebrales y cáncer de mama. Aproximadamente la mitad de las familias que padecen este síndrome son portadoras de mutaciones en el gen p53 (Greene et al,

1997). Se ha estimado que el riesgo de padecer cáncer de mama, para las mujeres pertenecientes a familias con este síndrome que sean portadoras de mutaciones en el gen p53, es del 50% a los 50 años. Los estudios realizados en familias con síndrome mama-ovario no han encontrado mutaciones germinales en p53, indicando que no existen alteraciones de p53 capaces de conferir susceptibilidad al cáncer de mama sin aumentar a la vez el riesgo de padecer otros múltiples tipos de tumores (Prosser et al, 1991; Warren et al, 1992). Un estudio realizado en mujeres con cáncer de mama seleccionadas al azar encontró mutaciones germinales en menos del 1% de los casos analizados (Sidransky et al, 1992) sugiriendo de nuevo que no parece posible asociar p53 con un síndrome de cáncer de mama, como si ocurre en el caso de BRCA1 y BRCA2.

El hecho de que sólo el 50% de las familias con síndrome *Li-Fraumeni* sean portadoras de mutaciones en p53 sugiere la posibilidad de que exista otro u otros

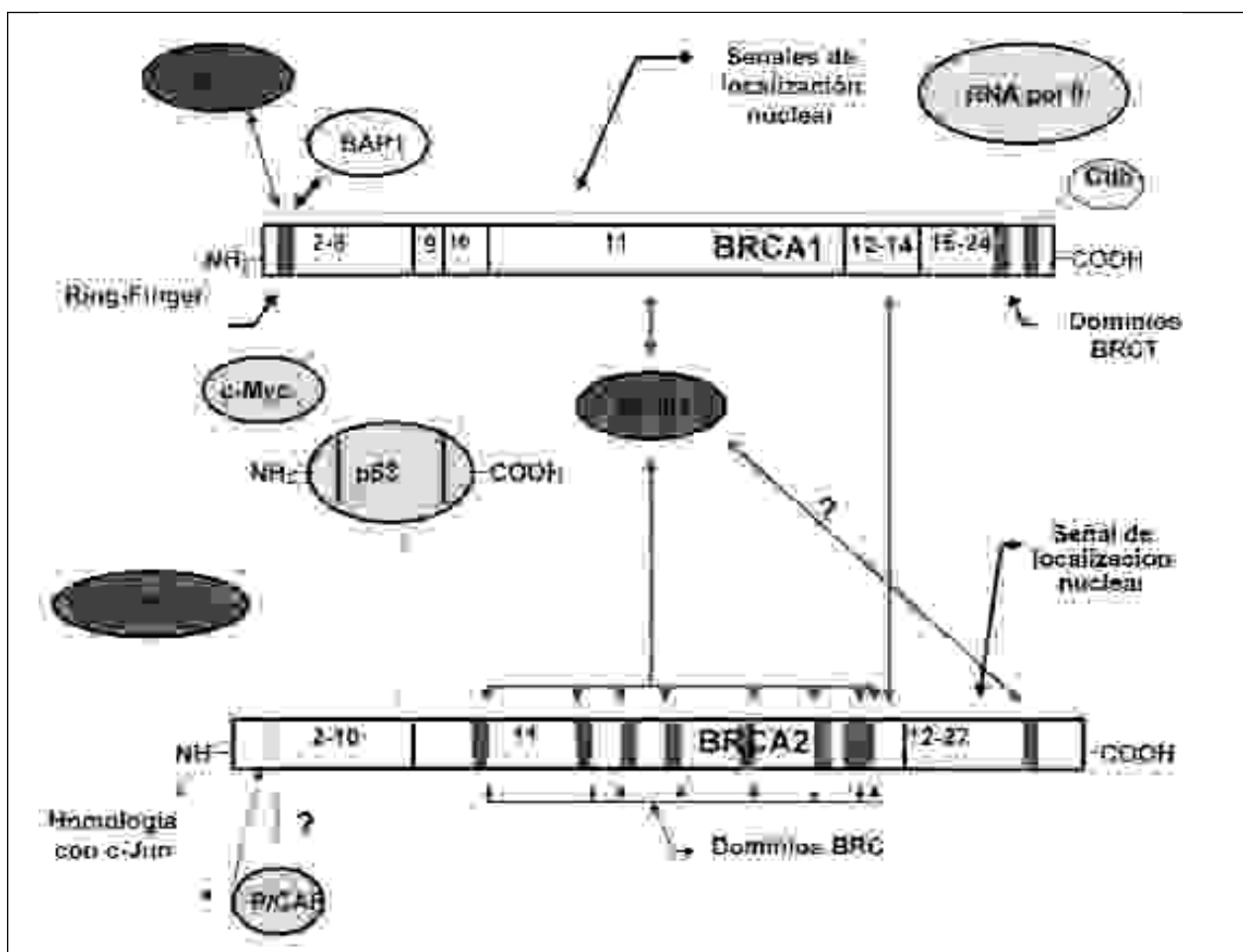


Fig. 2: Interacciones proteicas implicadas en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama: Esta figura pretende resumir de modo gráfico las numerosas interacciones proteicas que se describen en el texto. Las flechas indican de modo aproximado las regiones de cada proteína implicadas en las interacciones. En el texto se mencionan los dominios concretos de cada proteína implicados en los casos que se ha podido determinar. El color gris oscuro indica dominios proteicos o interacciones entre proteínas que se creen directamente implicados en reparación del DNA. El color gris claro indica dominios o interacciones directamente implicados en regulación de la transcripción, lo que no excluye que esta actividad transcripcional tenga una implicación en la reparación del DNA. El color blanco indica dominios o proteínas sin función claramente definida. Como se comenta en el texto, no todas las interacciones aquí indicadas se ha demostrado que sean directas. Es posible que existan proteínas adaptadoras responsables de la interacción. El esquema de las proteínas no está dibujado a escala.

genes responsables de este síndrome y que por tanto puedan tener una implicación importante en el desarrollo del cáncer de mama.

PTEN/MMAC1: GEN SUPRESOR IMPLICADO EN NUMEROSOS TUMORES

Numerosas evidencias indican que el gen PTEN/MMAC1 es un gen supresor que juega un papel importante en muchos procesos oncogénicos. Así, este gen se encuentra con frecuencia inactivado en numerosos tipos de tumores esporádicos entre los que destacan: glioblastomas, melanomas, próstata y mama (Li et al, 1997; Steck et al, 1997). Además, diversos síndromes hereditarios caracterizados por la alta predisposición a desarrollar diversos tumores (incluidos tumores de mama), como la enfermedad de Cowden o el síndrome Bannayan-Zonana, están asociados con mutaciones germinales en este gen (Liaw et al, 1997; Marsh et al, 1997).

Los ratones mutantes nulos PTEN/MMAC1 +/- desarrollan tumores en numerosos tejidos sugiriendo un papel equivalente para este gen en esta especie y en humanos. (Di Cristofono et al, 1998).

El gen PTEN/MMAC1 codifica para una proteína con un dominio catalítico conservado en numerosas enzimas tirosina fosfatasa. PTEN/MMAC1 tiene *in vitro* actividad fosfatasa sobre péptidos ricos en glutamina y tirosina y también sobre el segundo mensajero lipídico fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. La actividad tirosina fosfatasa sugiere que PTEN/MMAC1 podría actuar como gen supresor al modular negativamente rutas de señalización celular implicadas en proliferación. Recientemente se ha demostrado que PTEN/MMAC1 es un regulador negativo de la ruta de señalización celular fosfoinosítido-3quinasa/Akt, ruta que está implicada en numerosos procesos de proliferación celular. (Wu et al, 1998 y referencias allí indicadas). PTEN/MMAC1 también está implicado en la inhibición de la migración celular (y por tanto se sugiere que su inactivación puede ser importante en procesos metastásicos) al ser capaz de desfosforilar la enzima FAK (focal adhesion kinasa) y suprimir así su actividad (Tamura et al, 1999).

Todos estos datos sugieren que PTEN/MMAC1 es un gen supresor implicado en la regulación del ciclo celular en numerosos tejidos y que no tenga, a diferencia de lo que ocurre en el caso de BRCA1 y BRCA2, un papel particular en el epitelio mamario. A este respecto PTEN/MMAC1 podemos considerarlo un gen supresor general y por tanto implicado en numerosos procesos neoplásicos como puedan serlo p53 ó p16.

No se sabe realmente el riesgo de desarrollar cáncer de mama para los portadores de mutaciones germinales en este gen. Se ha estimado que para pacientes con la enfermedad de Cowden, aunque sin una mutación en el gen PTEN demostrada, el riesgo acumulado de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida es del 30% (Starink et al, 1986).

EL GEN ATM

¿GEN DE SUSCEPTIBILIDAD AL CÁNCER DE MAMA DE BAJA PENETRANCIA?

La Ataxia Telangiectasia (AT) es un síndrome, transmitido de forma autosómica recesiva, caracterizado principalmente por la aparición temprana de ataxia cerebelar, telangiectasia oculocutánea, defectos en el sistema inmune, hipersensibilidad a las radiaciones ionizantes y predisposición a sufrir procesos tumorales. El gen responsable de este síndrome, localizado en el cromosoma 11q22-23, se clonó en 1995 (Savitsky et al, 1995a). Numerosos estudios epidemiológicos han sugerido que los individuos portadores de un alelo del gen ATM mutado tienen una mayor predisposición a desarrollar tumores, especialmente de mama (Swift et 1987; Pippas et al, 1988; Borresen et al, 1990). El riesgo relativo de desarrollar cáncer de mama para esta población heterocigota se ha estimado en 3.9 (Easton et al, 1994).

Es difícil demostrar la implicación del gen ATM en el desarrollo del cáncer de mama debido a que al ser, en todo caso, un gen de susceptibilidad de baja penetrancia no es posible hacer estudios de ligamiento (Wooster et al, 1993; Greene M.H., 1997). Sin embargo, el hecho de que alrededor del 1% de la población general es portadora de un alelo del gen ATM mutado (Greene, M.H., 1997) convierte en urgente la necesidad de clarificar el papel de este gen en el desarrollo del cáncer de mama, pues de confirmarse, la cifra de cánceres de mama atribuibles a este gen superaría la cifra de cánceres atribuibles a la suma de los genes de susceptibilidad BRCA1 y BRCA2. Numerosos estudios encaminados a resolver esta cuestión han llegado a resultados contradictorios. Así por ejemplo, el grupo de Swift, estudiando familiares de pacientes con síndrome AT clínicamente reconocido, encontró un aumento significativo de la proporción de heterocigotos en las mujeres con cáncer de mama (Athma et al, 1996). Sin embargo el grupo de Haber, analizando mediante técnicas de PTT (ensayos de truncamiento de proteínas) el gen ATM en pacientes con cáncer de mama de aparición temprana, no encontró mayor frecuencia de mutaciones que en el grupo control de mujeres sanas (FitzGerald et al, 1997). Un estudio reciente refuerza la idea de que la proporción de tumores de mama asociados a mutaciones germinales en el gen ATM es mínima y sugiere además que ATM no se comporta como un gen supresor clásico ya que en los tumores no se pierde el alelo salvaje (Chen et al, 1998c).

ATM FORMA PARTE DE UNA RUTA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR QUE ACTIVA p53 CUANDO SE PRODUCEN ROTURAS EN LA DOBLE HEBRA DEL DNA

Antes de clonarse el gen ATM, se sabía ya que las líneas celulares de pacientes con síndrome AT son hipersensibles a las radiaciones ionizantes (R.I.) y son defectivas en diversos puntos de control del ciclo celular inducibles por R.I. Así, la parada del ciclo celular en

la fase G1 que se produce en respuesta a R.I. es un fenómeno apenas observable en estas líneas celulares. Esta parada del ciclo celular es dependiente de p53 (se induce la fosforilación de la Ser 15 lo que a su vez estabiliza la proteína y activa su capacidad transcripcional) y de hecho, lo que se observa en estas células es que R.I. no es capaz de aumentar los niveles ni la actividad de p53 (Kastan et al, 1992). Estos datos sugerían que las células AT eran defectivas en algún paso de una ruta de señalización celular que en respuesta a daños en el DNA activaba p53 (Kastan et al, 1992).

El gen ATM codifica para una proteína de 370 kDa con un dominio COOH-terminal similar a la subunidad catalítica de las PI-3 quinasas (Savitsky et al, 1995a). Estas quinasas están implicadas en transducción de señales mitogénicas, recombinación meiótica y control del ciclo celular (Savitsky et al, 1995b, Hoekstra, M.F., 1997).

Otras proteínas de la familia de las PI-3 quinasas como la DNA-PK son capaces de fosforilar *in vitro* p53 en las serinas 15 y 37 (Lees-Miller et al, 1992), sin embargo esta enzima no es necesaria para la parada del ciclo celular inducida por R.I (Rathmell et al, 1997).

ATM es capaz de interactuar físicamente con p53 (Watters et al, 1997).

Todos los datos sugerían pues que ATM era realmente una enzima con actividad quinasa y que p53 era uno de los sustratos de esta actividad. Dos trabajos recientes han demostrado claramente que en respuesta a los daños producidos por las radiaciones ionizantes en el DNA, ATM se activa fosforilándose (probablemente autofosforilándose) y fosforila específicamente la Ser 15 de p53 (Banin et al, 1998; Canman et al, 1998). Del mismo modo ATM se autofosforila y fosforila a p53 cuando se microinyectan fibroblastos con enzimas de restricción que cortan la doble hebra de DNA generando extremos romos (Nakamura, Y., 1998).

La supresión de ATM en líneas celulares deficientes en p53 hipersensibiliza las células frente a la radiación ionizante lo que sugiere que p53 no debe ser el único sustrato de ATM y que deben existir vías de señalización independientes de p53 que estimulen la reparación de los daños inducidos por radiaciones ionizantes en el DNA.

HRAS1/VNTR

En 3' del protooncogen HRAS1, en el locus genético 11p15, existe una región muy polimórfica que contiene un número variable de una secuencia repetida en tandem. (VNTR). Existe un trabajo que sugiere el hecho de que ciertos alelos de esta región estén asociados con un mayor riesgo (se duplica) de sufrir cáncer de mama (Krontiris et al, 1993). El aumento en el riesgo sugerido es relativamente pequeño, sin embargo son portadores de los alelos de alta susceptibilidad alrededor del 6% de la población general por lo que de confirmarse los datos, como ocurre con el gen ATM, estaríamos ante un problema epidemiológico grave. Otro trabajo relativamente contradictorio con el primero, sugiere que deter-

minados alelos de esta región cromosómica modifican el riesgo de desarrollar cáncer de ovario a portadoras de mutaciones en el gen BRCA1, pero no alteran el riesgo de sufrir cáncer de mama (Phelan et al, 1996). El mecanismo por el que estos alelos podrían influir en el desarrollo del cáncer de mama y/o de ovario se desconoce por completo pero se ha sugerido que los distintos alelos podrían influir en la regulación de la expresión de HRAS1, o bien estar ligados a determinados alelos de un posible gen adyacente no identificado.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta revisión se han comentado hallazgos recientes sobre el papel de los genes BRCA1, BRCA2, ATM, p53, PTEN/MMAC1 y HRAS en los síndromes hereditarios que confieren susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama.

Aunque el patrón de expresión de los genes BRCA1 y BRCA2 no esté completamente determinado, es claro que estos genes se expresan de modo constitutivo o inducible en numerosos tejidos, sin embargo, como hemos visto, los portadores de mutaciones en estos genes sólo presentan riesgo elevado para desarrollar cánceres de mama, ovario, y probablemente próstata (Struwing et al, 1997). BRCA1 y BRCA2 son, como ya se ha comentado, genes de alta *especificidad*.

Existen numerosos estudios que comparan tanto aspectos histológicos como la evolución y el pronóstico de los tumores de mama esporádicos con tumores asociados a mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, o bien que comparan estos últimos tumores entre sí. En general, estos estudios tienen el problema de contar con tamaños muestrales pequeños, lo que impide obtener resultados significativos desde un punto de vista estadístico. Sin embargo estos estudios parecen apuntar en la dirección de que realmente sí hay diferencias significativas entre los tumores esporádicos y los tumores asociados a mutaciones germinales, siendo los segundos tumores de mayor índice mitótico, distinto fenotipo histológico y poseedores de mayor número de alteraciones cromosómicas (Armes et al, 1998; Brody et al, 1998). Además, la frecuencia de tumores que no expresan el receptor de estrógenos (ER-) es mayor en los casos asociados a mutaciones en BRCA1 (apenas hay datos referentes a BRCA2) que en los casos esporádicos (Loman et al, 1998). No obstante, ningún estudio revela diferencias fundamentales entre los tumores de mama asociados a mutaciones en BRCA1 y los tumores asociados a mutaciones en BRCA2, ni en lo concerniente al tipo histológico ni en lo concerniente al pronóstico y/o supervivencia. A nivel molecular, los datos acumulados hasta la fecha sugieren que estos dos genes codifican proteínas que interactúan cooperando en un mismo mecanismo molecular.

Tomados en conjunto, los datos epidemiológicos, histológicos, clínicos y bioquímicos sugieren por tanto que defectos en los genes BRCA1 y BRCA2 anulan una misma "función celular" y que la falta de esta "función celular" facilita el desarrollo de tumores en el epitelio

mamario independientemente de que gen en particular esté mutado por vía germinal.

Aunque esta "función celular", que sin duda tiene que ver con la reparación del DNA, aún no esté bien definida, los datos experimentales comentados en esta revisión indican que RAD51 y probablemente BARD1 también están implicados en la misma. La pregunta es inmediata. Si BRCA1, BRCA2, RAD51 y BARD1 cooperan en el desarrollo de algún tipo de función celular y tanto BRCA1 como BRCA2 son genes de susceptibilidad al cáncer de mama, ¿serán RAD51 y BARD1 también genes implicados en el desarrollo de este tipo de cáncer? Hasta la fecha muy pocos datos apuntan en esta dirección. Se ha descrito en cáncer de mama la pérdida de heterocigosidad (LOH) en la región 15q15.1, región donde mapea hRAD51 (Wick et al, 1996). También se ha descrito como el bloqueo de la expresión del gen BARD1 en células epiteliales de mama en cultivo causa claras alteraciones morfológicas compatibles con un estado de premalignidad: forma celular alterada, mayor tamaño celular, aparición de células multinucleadas y pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto (Irminger-Finger et al, 1998). Sin duda son necesarios más estudios para poder determinar el posible papel de estos genes en el desarrollo del cáncer de mama.

Todos los datos presentados en esta revisión sugieren que BRCA1 y BRCA2 desarrollan su "función celular" a dos niveles distintos. Uno, al estar implicados directamente junto a RAD51 en procesos de recombinación asociados directamente a la reparación del DNA y dos, activando la expresión de genes supresores del ciclo celular y proapoptóticos, los primeros con objeto de dar oportunidad a la maquinaria reparadora para que actúe y los segundos con objeto de hipersensibilizar las células frente al proceso apoptótico en caso de que la reparación no pueda llevarse a término correctamente. Un modo de explicar el limitado patrón de cánceres atribuibles a estos genes (su alta especificidad) es suponer que BRCA1 y BRCA2 están implicados en la reparación de los daños producidos en el DNA por determinados carcinógenos cuyas dianas principales sean precisamente los epitelios de mama y ovario. Dicho de otro modo, la función celular desarrollada por BRCA1 y BRCA2 sólo es útil para prevenir el desarrollo de tumores en estos tejidos.

Una posibilidad atrayente es la de que estos carcinógenos sean los estrógenos, y más concretamente algunos de los metabolitos generados en su catabolismo. Numerosos datos sugieren que hay una relación directa entre los niveles de estrógenos en sangre y el cáncer de mama. Una menarquía temprana y una menopausa tardía son factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama (Hulka et al, 1995). Los hábitos alimentarios que conducen a un aumento de estrógenos circulantes parecen ser también factores de riesgo (Prentice et al, 1990; Hunter et al, 1996). En general, las mujeres con el riesgo más bajo, chinas y japonesas, son también las que tienen los niveles de estrógenos en sangre más bajos (López-Otín et al, 1998). El estudio del efecto carcinogénico de los estrógenos se ha centrado preferentemente

en su papel como *promotor tumoral*, papel que desarrolla al interactuar con el receptor de estrógenos y regular así la expresión de numerosos factores de crecimiento que estimulan la proliferación del epitelio mamario. Sin embargo, se sabe que los estrógenos son, además, agentes genotóxicos. La metabolización del 17 β -estradiol genera compuestos intermedios electrófilos que forman enlaces covalentes con el nitrógeno N7 de las guaninas presentes en el DNA. La formación de estos aductos provoca una rotura de enlaces glicosídicos y una pérdida de la base nitrogenada correspondiente (Cavaliere et al, 1997). Por tanto los estrógenos, además de comportarse como *promotores* tienen la posibilidad de actuar como *iniciadores* tumorales.

La familia de enzimas GST (Glutathion S-transferasas) está implicada en la eliminación de numerosos agentes electrófilos tóxicos para las células (Daniel et al, 1993). Individuos homocigotos para mutaciones en los genes GSTM1 y GSTT1 y ciertos alelos del gen GSTP1 parecen estar asociados a un mayor riesgo de desarrollar diversos tipos de cáncer, muy especialmente cánceres de próstata y mama (Harries et al, 1997; Helzlsouer et al, 1998). Además, el promotor del gen GSTP1 está frecuentemente hipermetilado en tumores esporádicos de mama y próstata, reprimiéndose en consecuencia su expresión (Lee et al, 1994; Esteller et al, 1998). Estos datos sugieren que, efectivamente, los estrógenos son agentes genotóxicos para las células del epitelio mamario, y que un modo por el que estas células se protegen es mediante la actividad destoxicante de GSTP1. Es razonable pensar que las células del epitelio mamario posean, además, mecanismos especializados en reparar los daños que se puedan producir en el DNA a pesar de esta acción destoxicante. BRCA1 y BRCA2 podrían estar precisamente implicados en este proceso. Es interesante señalar que los estrógenos son reguladores positivos de la expresión del gen BRCA1 (Gudas et al, 1995) lo que, en este modelo, aseguraría que en presencia de estrógenos se activasen los mecanismos de reparación de los daños producidos por los mismos en el DNA.

Esta posible función para BRCA1 y BRCA2 (esquemática en el modelo de la figura 3) no sólo explicaría razonablemente bien el espectro de tumores a los que se asocian estos genes, también explicaría por que no parecen tener un papel relevante en formas esporádicas de estos mismos tumores al entrar directamente en el concepto de genes *caretakers* (Kinzler and Vogelstein, 1997), genes cuya inactivación no está directamente implicada en el desarrollo de los tumores pero hace más probable su inicio al aumentar la inestabilidad genética (Kinzler and Vogelstein, 1997).

El papel de p53 como gen supresor en tumores esporádicos está profusamente descrito en numerosas revisiones. En general las mutaciones de p53 son un evento tardío (por tanto no directamente implicado en el inicio del proceso) y están asociadas a mal pronóstico. El papel de p53 como gen de susceptibilidad es mucho menos conocido. En el caso del cáncer de mama familiar, es posible que en las mujeres portadoras de un alelo de p53 mutado, la adquisición somática de una muta-

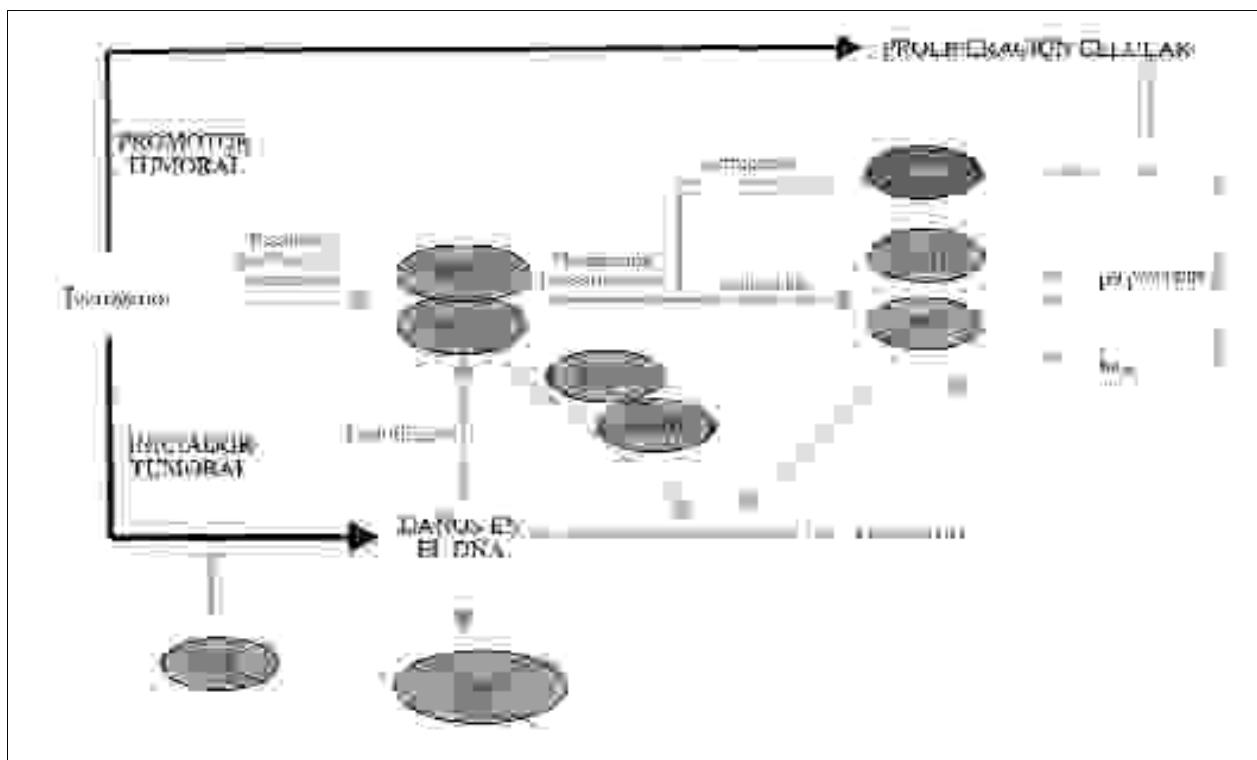


Fig. 3. Modelo propuesto para explicar la susceptibilidad genética a desarrollar cáncer de mama: El diagrama indica el doble papel de los estrógenos como iniciadores y promotores tumorales. Estos compuestos son capaces de activar la expresión de BRCA1 y probablemente la de BRCA2 puesto que numerosos estudios indican que la expresión de estos dos genes está perfectamente coordinada. En este modelo se propone que el complejo multiproteico BRCA1/BRCA2/RAD51/BARD1 está implicado en la reparación de los daños producidos en el DNA por compuestos electrófilos procedentes del catabolismo de los estrógenos. Además BRCA1 (y quizás BRCA2 aunque su papel como regulador transcripcional no está claro) modula la acción de diversos factores de transcripción provocando un cambio de la expresión génica que detiene la progresión del ciclo celular (y da por tanto oportunidad a que se reparen los daños del DNA) o induce apoptosis. Probablemente BRCA1 regule la expresión de numerosos genes. En el esquema se indica su papel como coactivador de p53 y STAT activando la expresión de p21 y bax y su papel como correpresor de cMyc (un oncogen frecuentemente sobreexpresado en cáncer de mama) reprimiendo la expresión de genes sin definir implicados en proliferación. El papel del gen ATM es completamente especulativo y se indica en líneas discontinuas. Los experimentos que sugieren todas estas relaciones se detallan en el texto. El color gris claro señala proteínas o rutas implicadas en supresión tumoral. El color gris oscuro indica proteínas o rutas implicadas en desarrollo tumoral.

ción en el segundo alelo provocase el mismo defecto funcional que una mutación en los genes BRCA1 o BRCA2 ya que cómo se ha comentado en esta revisión p53 está implicado en la misma ruta de señalización que BRCA1 y BRCA2 y de hecho BRCA1 y BRCA2 directamente actúan sobre p53. Siguiendo con el modelo propuesto (figura 3), las mutaciones en p53 también reducirían la eficacia con la que las células del epitelio mamario reparan los daños producidos en el DNA por los estrógenos. Por supuesto, el hecho de que esté mutado p53 va a tener además otras implicaciones que no tienen los genes BRCA1 y BRCA2 y estará probablemente asociado a peor pronóstico.

A pesar de los pocos datos que se tienen sobre el gen ATM, el hecho de que esté también implicado en reparación del DNA y module a p53 podría indicar que también incide en el mismo mecanismo causante de susceptibilidad.

Por contra, el papel del gen PTEN/MMAC1 parece ser completamente distinto, no está relacionado con reparación del DNA y está implicado en muy diversos

procesos tumorales, tanto esporádicos como asociados a síndromes familiares lo que sugiere que su función no está ligada a un proceso molecular particular del cáncer de mama.

Respecto a la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama que puedan conferir alelos particulares de la región VNTR en 3' del gen HRAS1 apenas existen datos epidemiológicos y no existe ningún dato bioquímico por lo que no es posible si quiera aventurar el mecanismo por el cual pudieran estar implicados en esta susceptibilidad.

Finalmente, en un artículo que ha revisado los conocimientos actuales sobre genes de susceptibilidad y cáncer de mama, parece necesario comentar los datos recientes sobre el posible papel profiláctico del tamoxifeno en este tipo de tumores. Los resultados preliminares del *Breast Cancer Prevention Trial* (BCTP, NSABP-P1) indicando una reducción del 45% en la incidencia del cáncer de mama en mujeres a las que se les administró tamoxifeno de modo profiláctico en principio abre una esperanza a las mujeres sanas portadoras

de una copia de uno de estos genes de susceptibilidad defectuosa y en consecuencia incrementa la utilidad práctica de detectar mutaciones en dichos genes. Sin embargo hay que ser enormemente cauto a este respecto. Los estudios citados, por evidentes dificultades técnicas, no se han centrado en el subgrupo de mujeres portadoras de mutaciones en los genes de susceptibilidad, probablemente el grupo de mujeres que *a priori* mayor beneficio obtendría de este tipo de tratamientos profilácticos. Un estudio centrado en este subgrupo que confirmase los resultados del BCTP sería de extraordinario interés, teniendo en cuenta además que existen razones para pensar que la eficacia preventiva del tamoxifeno en estos casos pudiera ser menor. Así, un estudio semejante al del BCTP, aunque realizado con un número

considerablemente menor de mujeres, en el que los criterios de inclusión incluían una historia familiar de cáncer de mama y por tanto, probablemente en muchos casos, la condición de portadoras de mutaciones en uno de estos genes (especialmente BRCA1 y BRCA2), no ha mostrado ningún efecto preventivo del tamoxifeno (Powles et al, 1998). Además, la eficacia del tratamiento con tamoxifeno de tumores ER- parece claramente menor a la de los tumores ER+ (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998) y como ya se ha comentado, precisamente una de las características de los tumores asociados a BRCA1 y probablemente a BRCA2 que los diferencia de los tumores esporádicos es la mayor proporción de tumores ER- .

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, K. J., Xu, J., Yin, G.-Y., Lyons, R.H., Meisler, M.H., and Weber, B.L. (1995) Hum.Mol.Genet. 4 2265-2273.
- Andres, J.L., Fan, S., Turkel, G.J., Wang, J., Twu, N., Yuan, R., Lamszus, K., Goldberg, I.D., and Rosen, E.M. (1998) Regulation of BRCA1 and BRCA2 expression in human breast cancer cells by DNA-damaging agents. Oncogene. 16 2229-2241
- Armes, J.E., Matthew Egan, A.J., Southey, M.C., Dite, G.S., McCredie, M.R., Giles, G.G., Hopper, J.L., and Venter, D.J. (1998) The Histologic Phenotypes of Breast Carcinoma Occurring before Age 40 Years in Women with and without BRCA1 or BRCA2 Germline Mutations.
- Athma, P., Rappaport, R., and Swift, M. (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. Cancer Genet Cytogenet, 92 130-134
- Banin, S., Moyal, L., Shieeh, S.-Y., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., Ziv, Y. (1998) Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. Science 281 1674-1676.
- Bertwistle, David., and Ashworth, A. (1998) Functions of the BRCA1 and BRCA2 genes. Curr. Opin. Genetics. Develop. 8 14-20
- Blackwood, M. A., and Weber, B. L. (1998) BRCA1 and BRCA2: From Molecular Genetics to Clinical Medicine. J. Clinical. Oncol. 16(5) 1969-1977.
- Borden, K.L.B., Boddy, M.N., Lally, J., O'Reilly, N.J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E and Freemont, P.S. (1995) EMBO. J. 14 1532-1541.
- Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F., and Koonin, E.V. (1997) A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. FASEB J. 11 68-76.
- Borresen, A.L., Andersen, T.I., Tretli, S., Heiberg, A., Moller, P. (1990) Breast cancer and other cancers in Norwegian families with ataxia-telangiectasia. Genes Chromosomes Cancer. 2 339-340.
- Brody, L.C., and Biesecker, B. B. (1998) Breast Cancer Susceptibility Genes. Medicine. 77 208-226
- Bzovic, P.S., Mezas, J., King, M. C., and Kleivit. (1998) The Cancer -predisposing Mutation C61G Disrupts Homodimer Formation in the NH2- terminal BRCA1 RING Finger Domain. J. Biol. Chem. 273(14) 7795-7799.
- Burke, T.F., Cocke, K.S., Lemke, S.J., Angleton, E., Becker, G.W., Beckmann, R.P. (1998) Identification of a BRCA1-associated kinase with potential biological relevance. Oncogene. 16 1031-1040
- Canman, C.E., Lim, D.E., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998) Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. Science 281 1677-1679
- Callebaut, Y., and Mormon, J.P., (1997) From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. FEBS Lett. 400 25-30.
- Cavalieri, E.L., Stack, D.E., Devanesan, P.D., Todorovic, R., Dwivedy, Y., Higginbotham, S., Johansson, S.L., Patil, K.D., Gross, M.L., Gooden, J.K., Ramanathan, R., Cerny, R.L., and Rogan, E.G. (1997) Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. Proc. Natl. Sci. 94 10973-10942.
- Chapman, M., and Verma, I.M. (1996) Transcriptional activation by BRCA1. Nature 382 678-679.
- Chen, J. Silver, D.P., Walpita, D Cantor, S. B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F. J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M., and Scully, R. (1998a) Stable interaction between the Products of the BRCA1 and BRCA2 Tumor Suppressor Genes in Mitotic and Meiotic Cells. Mol. Cell. 2 317-328.
- Chen, P. H., Chen, C. F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, D, and Lee W.H. (1998b) The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment.
- Chen, J., Giesler Birrkholtz G., Lindblom, P., Rubio C., and Lindblom, A. (1998c) The role of Ataxia-Telangiectasia Heterozygotes in Familial Breast Cancer.
- Chen, Y.M., Farmer, A.A., Chen, C.F. Jones, D.C., Chen, P.L., and Lee, W.H. (1996). BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell-cycle dependent manner. Cancer Res. 56, 3168-3172.
- Compton, D. A., Szilak, Y. and Cleveland, D.W. (1992) Primary structure of NuMa, an intranuclear protein that defines a novel pathway for segregation of proteins at mitosis. J.Cell.Biol. 116 1395-1408
- Crook, T., Crossland, S., Crompton, M., Osin, P., and Gusterson, B. (1997) p53 mutations in BRCA1-associated familial breast cancer. The Lancet. 350 638-639.
- Crook T, Brooks LA, Crossland S, Osin P, Barker KT, Waller J, Philp E, Smith PD, Yulug I, Peto J, Parker G, Allday MJ, Crompton MR, Gusterson BA. (1998) p53 mutation with frequent novel condons but not a mutator phenotype in BRCA1 and BRCA2 associated breast tumours. Oncogene. 17(13) 1681-9.
- Cui, J., Wang, H., Reddy, E. S. P., and Rao, V. N. (1998) BRCA1 splice variants BRCA1a and BRCA1b associate with CBP co-activator. Oncol Rep. 5(3):591-5.
- Daniel, V. (1993) Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.

- 28 173-207
27. Dunnig,A.M., Chiano, M., Smith, N. R., Dearden,J., Gore, M., Oakes, S., Wilson, C., Stratton, M., Peto, J., Easton, D., Clayton, D., and Ponder, B.A.J. (1997) Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Human. Mol. Genet.* 6(2) 285-289
 28. Easton, D.F., (1994) Cancer risk in A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 66(suppl 6): S177-S182
 29. Early Breast Cancer Trialists's Collaborative Group. (1998) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *The Lancet* 351: 1451-1467
 30. Echols, H., and Goodman, M.F. (1991) Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 477-511.
 31. Ellisen, L.W., and Haber, D.A. (1998) Hereditary Breast Cancer. *Annu. Rev. Medicine.* 49 425-437
 32. Esteller, M., Corn, P.G., Urena, J.M., Gabrielson, E., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1998) Inactivation of glutathione S-Transferase P1 Gene by Promoter Hypermethylation in Human Neoplasia. *Cancer Research.* 58 425-4518.
 33. FitzGerald, M., Bean, J. Hegde, S., Unsal, H., MacDonal, D., Harkind, D., Finkelstein, D., Isselbacher, K., and Haber, D. (1997) Heterozygous ATM mutations do not contribute to early onset of breast cancer. *Nat Genet* 15 307-310.
 34. Ford, D. Easton, D.F., and Peto, J. (195) estimation of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to cancer incidence. *Am. J. Hum. Genet.* 57 1457-1462.
 35. Friedman, L.S., Thistlethwaite, F.C., Patel, K.J., P.C.C.Yu, V., Lee, H., Venkataraman, A.R., Abel, K.J., Carlton, M.B.L., Hunter,S. M., Colledge, W.H., Evans, M.J., and Ponder,B.A.J. (1998) Thymic Lymphomas in Mice with a Truncating Mutation in Brca2
 36. Fuks, F., Milner, J., Kouzarides, T. (1998) BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene.* 12;17(19):2531-4.
 37. Greenman, J., Mohammed, S., Ellis, D., Watts, S., Scott, G., Izatt, L., Barnes, D., Solomon, E., Hodgson, S., Mathew, C. (1997) Identification of missense and truncating mutations in the BRCA1 gene in sporadic and familial breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 6(2) 285-289.
 38. Greene, M.H. (1997) Genetics of Breast Cancer. *Mayo Clin Proc* 72 54-65
 39. Greenwell, P.W., Kronmal, S.L., Porter, S.E., Gassenhuber, J., Obermaier, P., Peters, T.D. TELL1, a gene involved in controlling telomere length in *S.Cerevisiae* is homologous to the human ataxia-telangiectasia gene. *Cell* 82 823-829
 40. Gudas,J.M., Nguyen, H., Li, T., and Cowan, K.H. (1995) Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cells. *Cancer Research.* 55(20) 4561-4565
 41. Haile, D.T., Parvin, J.D. (1999) Activation of Transcription in vitro by the Carboxyl-terminal Domain of BRCA1. *J. Biol. Chem.* 274(4) 2113-2117.
 42. Hakem, R., de la Pmpa, J.L., Sirad, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmair, A., Billia, F., Firpo, E., Hui, C.C., Roberts, J., Rossant, J., and Mark, T.W. (1996) The tumor suppressor gene BRCA1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell.* 85(7) 1009-1023
 43. Hakem, R., de la Pompa, J.L., Elia, A., Potter, J., and Mark, T.W. (1997) Partial rescue of BRCA1 (5-6) early embryonic lethality by p53 or p21 null mutation. *Nat. Genet.* 16(3) 298-302.
 44. Harries, L.W., Stubbins, M.J., Forman,D., Howard, G.C., and Wolf, C.R. (1997) Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular, and prostata cancer. *Carcinogenesis.* 18 641-644.
 45. Helzlsouer, K.J., Selmin, O., Huang, H.Y., Strickland, P.T., Hoffman, S., Alberg, A.J., Watson, M.,Comstock, G.W., and Bell, D. (1998) Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J.Natl. Cancer. Inst.* 90 512-518
 46. Hoekstra, M.F., (1997) Response to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoint by the ATM protein kinase family. *Curr.Opin. Genet. Dev.* 7 170
 47. Hoffman, J.D., Hallam, S.E., Venne, V.L., Lyon, E., and Ward, K. (1998) Implications of a novel cryptic splice site in the BRCA1 gene. *Am. J. Med. Genet.* 80(2) 140-142
 48. Holt, J.T., Thompson, M.E., Czabo, C., Robinson-Benion, C., Arteaga, C.L., King, M-C, and Jensen, R.A. (1996) *Nature Genet.* 9 298-302
 49. Hsu, L. C., and White, R. L. (1998) BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 12983-12988
 50. Hunter, D.J., Willett, W.C.(1996) Dietary factors. In: *Diseases of the Breast.* Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 859-863
 51. Husain, A., He, G., Venkatraman, E. S., and Spriggs, D. R. (1998) BRCA1 Up-regulation is Associated with Repair-mediated Resistance to cis-Diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.* 58 1120-1123.
 52. Irminger-Finger, Y., Soriano, J.V., Vaudan, G., Montesano, R., and Sappino, A.P. (1998) In vitro repression of Brca1-associated RING domain gene, Bard1, induces phenotypic changes in mammary epithelial cells. *J. Bio. Chem* 143(5) 1329-1339
 53. Jensen, D. E., Proctor, M., Marquis, S. T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodos, L.A., Ishov, A. M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Mina, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K. D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G. C., Rauscher III, F. J. (1998) BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 16 1097-1112.
 54. Johannesdottir G, Gudmundsson,J., Bergthorsson J.T., Arason, A., Agnarsson, B.A., Eiriksdottir, G., Johansson, O.T., Borg, A., Ingvarsson, S., Easton, D.F., Egilsson, V., and Barkardottir, R.B. (1996) High prevalence of the 999del5 mutation in icelandic breast and ovarian cancer patients. *Cancer Res.* 56 3663-3665.
 55. Johannsson, O., Ostermeyer, E.A., Hakanson, S., Friedman, L.S., Johansson, U., Sellberg, G., Brondum-Nielsen, K., Sele, V., Olsson, H, King, M.C., and Borg, A. (1996) Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden. *Am. J. Hum.Genet.* 58 441-450
 56. Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71 587-597
 57. Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1997) Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386 761-762.
 58. Koonin, E.V., Altschul, S.F., and Bork, P. (1996). BRCA1 protein products...Functional Motifs. *Naute Genet.* 13, 266-267
 59. Krontiris, T., Devlin, B., Karp, D. et al. (1993) An association between the risk of cancer and mutations in the HRAS1 minisatellite locus. *N. Eng. J. Med.* 329 517-523
 60. Magdinier, F., Ribieras, S., Lenoir, G.M., Frapart, L., Dante, R. (1998) Down-regulation of BRCA1 in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation patterns of the putative promoter region. *Oncogene* 17(24) 3169-3176
 61. Marmorstein, L.Y., Ouchi, T., and Aaronson, S.T. (1998) The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 13869-13874.
 62. Marsh, D.J., Dahia, P.L., Zheng, Z., Liaw, D., Parson, R., Gorlin, R.J., and Eng, C. (1997) *Nat. Genet.* 16 333-334
 63. Milner, J. Ponder, B., Hughes-Davis, L., Seltmann, M., and Kouzarides, T. (1997) Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature.* 386(6627):772-3.
 64. Monteiro, A.N.A., August, A., and Hanafusa, H. (1996) Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1-C-terminal region. *Proc. Natl. Acad. Science* 93 13595-13599
 65. Morrow, D.M., Tagle, D.A., Shiloh, Y., Collins, F.S., and Hietter, P. (1995) TELL1, an *S.Cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia-telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* 82 831-840.
 66. Nakamura, Y. (1998) ATM: the p53 booster. *Nature Medicine* 4(11) 1231-1232
 67. Liaw,D., Marsh, D.J, Li, J., Dahia, P.L.M., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Cal, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M et al. (1997) *Lancaster, 1998 Bri. J. Cancer*
 69. Larson, J. S., Tonkinson, J. L. and Lai, M.T. (1997) Cancer Res. A BRCA1 Mutant Alters G2-M Cell Cycle Control in Human Mammary Epithelial Cells. 57 3351-3355

70. Lengauer, C., Kenneth, W. K., Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396 643-649.
71. Lee, W.H., Morton, R.A., Epstein, J.I., Brooks, J.D., Campbell, P.A., Bova, G.S., Hsieh, W-H., Issacs, W.B., and Nelson, W.G. (1994) Cytidine methylation of regulatory sequences near the *p53*-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 11733-11737
72. Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ulrich, J., Appella, E., and Anderson, C.W. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12 5041
73. Li, J., Yen, C., Liaw, D., et al. (1997) PTEN, a putative tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science* 275
74. Liaw, D., Marsh, D., Li, J., et al. (1997) Germ-line mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.* 16 64-67
75. Lim, D. S., and Hasty, P. A. (1996) A mutation in mouse *rad51* results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in *p53*. *Mol. Cell. Biol.* 16 7133-7143.
76. Loman, N., Johannsson, O., Bendahl, P., Borg, A., Fernö, M., and Olsson, H. (1998) Steroid receptors in hereditary Breast Carcinomas Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations or Unknown Susceptibility Genes. *Cancer* 83(2) 310-319
77. López-Otín, C., and Diamandis, E.P. (1998) Breast and Prostate Cancer: An analysis of Common Epidemiological, Genetic, and Biochemical Features. *Endocrine Reviews* 19(4) 365-396
78. Ouchi, T., Monteiro, Alvaro N. A., Augst, Avery., Aranson, S. A., and Hanafusa, H. (1998) BRCA1 regulates *p53*-dependent gene expression.
79. Pati, D., Keller, C., Groudine, M. and Plon, S. E. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17 3037-3046
80. Pazin, M.J. and Kadonaga, J. (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription?. *Cell* 89 325-328
81. Petrij-Bosch, A., Peelen, T., van Vliet, M., van Eijk, R., Olmer, R., Drusedau, M., Hogervorst, F.B., Hageman, S., Arts, P.J., et al (1997) BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nature Genet.* 17 341-345
82. Phelan, C., Rebbek, T., Weber, B, et al. (1996) Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus. *Nat Genet.* 12 309-311.
83. Pippard, E.C., Hall, A.J. Barber, D.J., Bridges, B.A. (1988) Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia-telangiectasia and xeroderma pigmentosum in Britain. *Cancer Res* 48 2929-2932
84. Powles, T., Eeles, R., Ashley, S., Easton, D., Chang, J., Dowsett, M., Tidy, A., Viggers, J., and Davey, J. (1998) Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomised chemoprevention trial. *The Lancet* 352: 98-101
85. Prentice, R.L. Sheppard, L. (1990) Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiologic data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption. *Cancer Causes Control* 1 81-97
86. Prosser, J., Elder, P.A., Condie, A., MacFadyen, Y., Steel, C.M., Evans, H.J. (1991) Mutations in *p53* do not account for heritable breast cancer: a study in five affected families. *Br J Cancer* 63 181-184
87. Puget, N., Torchard, D., Serova-Sinilnikova, O.M., Lynch, H.T., Feunteun, J., Lenoir, G.M., and Mazoyer, S. (1998) A 1-Kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17. *Oncogene*. 17(14) 1807-1812
88. Puget, N., Stoppa-Lyonnet, D., Sinilnikova, O.M., Pagés, S., Lynch, H.T., Lenoir, G., and Mazoyer, S. (1999) Screening for Germ-Line Rearrangements and Regulatory Mutations in BRCA1 Led to the Identification of Four New Deletions. *Cancer Research* 59 455-461
89. Rathmell, W.K., Kaufmann, W.K., Hurt, J.C., Bird, L.L., and Chu, G. (1997) *Cancer Res.* 57 68
90. Savititsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y, Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, Y., Frydman, M., Harnik, R. et al. (1995a) A single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to PI-3 Kinase. *Science* 268 1749-1753.
91. Savititsky, K. et al. (1995) The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet.* 4 2025-2032
92. Schlichtholz, B., Bouchind'homme, B., Pagés, S., Martin, E., Liva, S., Magdelenat, H, Sastrer-Garau, X, Stoppa-Lyonnet, D., and Soussi, T. (1998) *p53* mutations in BRCA1-associated familial breast cancer. *The Lancet* 352 622-623
93. Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., et al. (1997a) Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.
94. Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D. M. (1997b) Dynamic Changes of BRCA1 Subnuclear Location and Phosphorylation State are initiated by DNA Damage. *Cell* 90, 425-435.
95. Siddique, H., Zou, J. P., Rao, V., and Reddy, E. S. P. (1998) The BRCA2 is a histone acetyltransferase. *Oncogene* 16 2283-2285.
96. Shao, N., Chai, Y. L., Reddy ESP, and Rao V.N. (1996). Induction of Apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1. *Oncogene* 13 1-7
97. Sharan, S. K., Wims, M., and Bradley, A. (1995) Murine BRCA1: sequence and significance of human missense mutations. *Mol. Genet.* 4 2275-2278.
98. Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C. Sands, A. Eichele, G. Hasty, P. and Allan, B. (1997) Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking *Brca2*. *Nature* 386 804-810.
99. Shen, S.X., Weaver, Z., Xu, X., Li, C., Weinstein, M., Chen, L., Guan, X.Y., Ried, T., Deng, C.X. (1998) A targeted disruption of the murine *Brcal* gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene* 17(24) 3115-24.
100. Shihihara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457-470.
101. Sidransky, D., Tokino, T., Helzlsouer, K., Zehnhuber, B., Rausch, G., and Shelton, B. (1992) Inherited *p53* gene mutations in breast cancer. *Cancer Res* 52 2984-2986
102. Stearns, T., and Kirschner, M. (1994) *Cell* 76 623-637.
103. Starink, T.M., van der Veen, J., Arwert, F., et al. (1986) The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin. Genet.* 29 222-233
104. Steck, P., Perhouse, M., Jasser, S., et al. (1997) Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 15 356-362
105. Struewing, J.P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S.M., Berlin, L., McAdams, M., Timmerman, M.M., Brody, L.C., and Tucker, M.A. (1997) The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Eng J Med* 336 1401-1408
106. Sturzbecher, H.W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., and Buchop, S. (1996). *p53* is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* 15, 1992-2002.
107. Swift, M., Reitnauer, P.J., Morrell, D., Chase, C.L. (1987) Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Eng J Med* 316 1289-1294.
108. Tamura, M., Gu, J., Takino, T.Y., and Yamada, K. (1999) Tumor Suppressor PTEN Inhibition of Cell Invasion, Migration, and Growth: Differential Involvement of Focal Adhesion Kinase and p130 Cas. *Cancer Research.* 59, 442-449
109. Tashiro, S., Kotomura, N., Shinohara, A., Tanaka, K., Ueda, K., and Kamada, N. (1996). S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene* 12, 2165-2170.
110. Thorlacius, S., Olafsdottir, G., Tryggvadottir, L., Neuhausen, S., Jonasson, J.G., Tavtigian, S.V., Tulinius, H., Ogmundsdottir, H.M., and Eyfjord, J.E. (1996) A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nature Genet.* 13 117-119
111. Tirkkonen, M., Johannsson, O., Agnarsson, B. A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., Tanner, M., Isola, J., Barkardottir, R. B., Borg, A., et al. (1997). Distinct Somatic genetic changes associated with Tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 Germ-line mutations. *Cancer Res.* 57 1222-1227.

112. Tonin, P., Weber, B., Offit, K., Couch, F., Rebbeck, T.R., Neuhausen, S., Godwing, A.K., Daly, M., et al. (1996) Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nature Medicine*. 2(11) 1179-1183.
113. Tonin, P., Mes-Massom A.M., Futreal, P.A., et al. (1998) Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families. *Am. J. Hum. Genet.* 63(5) 1341-1351
114. Wagner, T.M., Moslinger, R., Zielinski, C., Scheiner, O., and Breiteneder, H. (1996). New Austrian mutation in BRCA1 gene detected in three unrelated HBOC families. *Lancet* 347. 1263
115. Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K., and Greene, M.I. (1998) BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene* 17(15):1939-48.
116. Warren, W., Eeles, R.A., Ponder, B.A., Easton, D.F., Averill, D., Ponder, M.A. et al. No evidence for germ-line mutations in exons 5-9 of the p53 gene in 25 breast cancer families. *Oncogene* 7 1043-1046
117. Watters, D.J., Khamma K.K., Beamish H et al. (1997) Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene* 14(16) 1911-1921
118. Wick, W et al (1996) Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* 12 973-978
119. Wong, A.K., Ormode, P.A., Pero, R., Chen, Y., Lian, L., Salada, G., Berry, S., Lawrence, Q., Dayananth, P., Ha, P., Tavtavian, S.V., Teng, D.H., and Bartel, T.L. (1998) Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein. *Oncogene*. 17(18) 2279-85.
120. Wolffe, A.P. (1997) Transcriptional Control. *Sinfull repression*. *Nature* 382 319-324
121. Wooster, R., Ford, D., Mangion, J., Ponder, B.A., Peto, J., Easton, D.F., et al. (1993) Absence of linkage to the ataxia-telangiectasia gene locus in familial breast cancer. *Hum Genet.* 92 91-94
122. Wu, L.C., Wang, Z. W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., et al (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nature Genet.* 14, 430-440
123. Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E, and Sawyers, C.L. (1998) The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway.
124. Xu, C.F., Chambers, J.A., Nicolai, H. Brown, M.A., Hujeriat, Y, Mohammed, S., Hodgson, S., Kelsell, D.P., Spurr, N.K., Bishop, D.T., and Solomon, E. (1998) Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in U.K. breast/ovarian cancer families. *Int. J. Cancer.* 77(3) 354-360
125. Zhang, H. Tomblin, G., and Weber, B. L. (1998a) BRCA1, BRCA2, and DNA Damage Response: Collision or Collusion? *Cell.* 92 433-436
126. Zhang, H., Somasundaram, K., Peng, Y., Tian, H., Zhang, H., Bi, D., Weber, B. L., and El-Deiry, W. S. (1998b) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene.* 16 1713-1721.

Alteraciones genéticas en el cáncer colorrectal

T. CALDÉS LLOPIS

Laboratorio de Inmunología y Oncología Molecular. Hospital Universitario San Carlos Madrid

El cáncer colorrectal es la segunda enfermedad maligna diagnosticada más frecuentemente, y constituye la segunda causa más común de muerte por cáncer en el mundo occidental. Como mínimo un 5% de la población desarrollará un tumor colorrectal, pudiéndose incrementar este número debido al aumento de expectativa de vida. Por otro lado si consideramos los tumores colorrectales no malignos se puede decir que está afectada un tercio de la población (1-3).

Armitage y Doll (4), propusieron que el cáncer se producía como resultado de la acumulación de diferentes alteraciones. Hoy en día se sabe que en el proceso tumorigénico intervienen una serie de genes que regulan positiva (oncogenes) y negativamente (genes supresores) el ciclo celular y otros genes que intervienen en los mecanismos de reparación del ADN (genes mutadores). Las alteraciones en la expresión o en la estructura de estos genes, de manera hereditaria o somática, producen una perturbación del crecimiento celular.

GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL

Desde el punto de vista de genética molecular, un neoplasma se puede considerar como una proliferación clonal de células caracterizada por un crecimiento autónomo de una alteración genética heredada que posteriormente adquiere otra alteración genética somática (fig. 1).

En el cáncer colorrectal, se produce una progresión del tejido normal a Adenoma y de este a un Carcinoma invasivo, debido a la acumulación de expansiones clonales de una serie de alteraciones genéticas (5,6), necesitándose al menos cinco alteraciones somáticas para llegar a ese fenotipo invasivo (7). La acumulación de estas alteraciones genéticas en el epitelio colónico requiere algunos años, normalmente décadas, y esto está de acuerdo con la edad media de los pacientes diag-

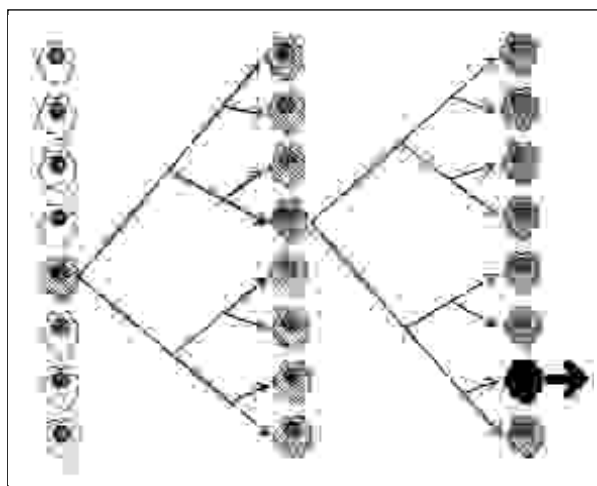


Fig. 1. Evolución clonal de las células tumorales. Una célula normal sufre una mutación y esta le confiere una ventaja en el crecimiento. Con el tiempo este clon se expande y una de las células hijas adquiere otra mutación, que le produce una ventaja adicional de crecimiento, la repetición cíclica de esta alteración produce la aparición de un tumor. Kinzler KW y Vogelstein B (61).

nosticados de cáncer colorrectal que suele ser alrededor de los setenta años (fig. 2). Resumiendo, se puede decir que las alteraciones que confieren ventajas proliferativas sobre una célula específica que va a dar lugar a un cáncer colorrectal y a otros cánceres, ocurren entre tres clases de genes:

—Proto-oncogenes, los cuales cuando están mutados se transforman en oncogenes y actúan promocionando el crecimiento celular (tabla I).

—Genes supresores de tumores, los cuales cuando están mutados pierden su regulación de la proliferación celular (tabla I).

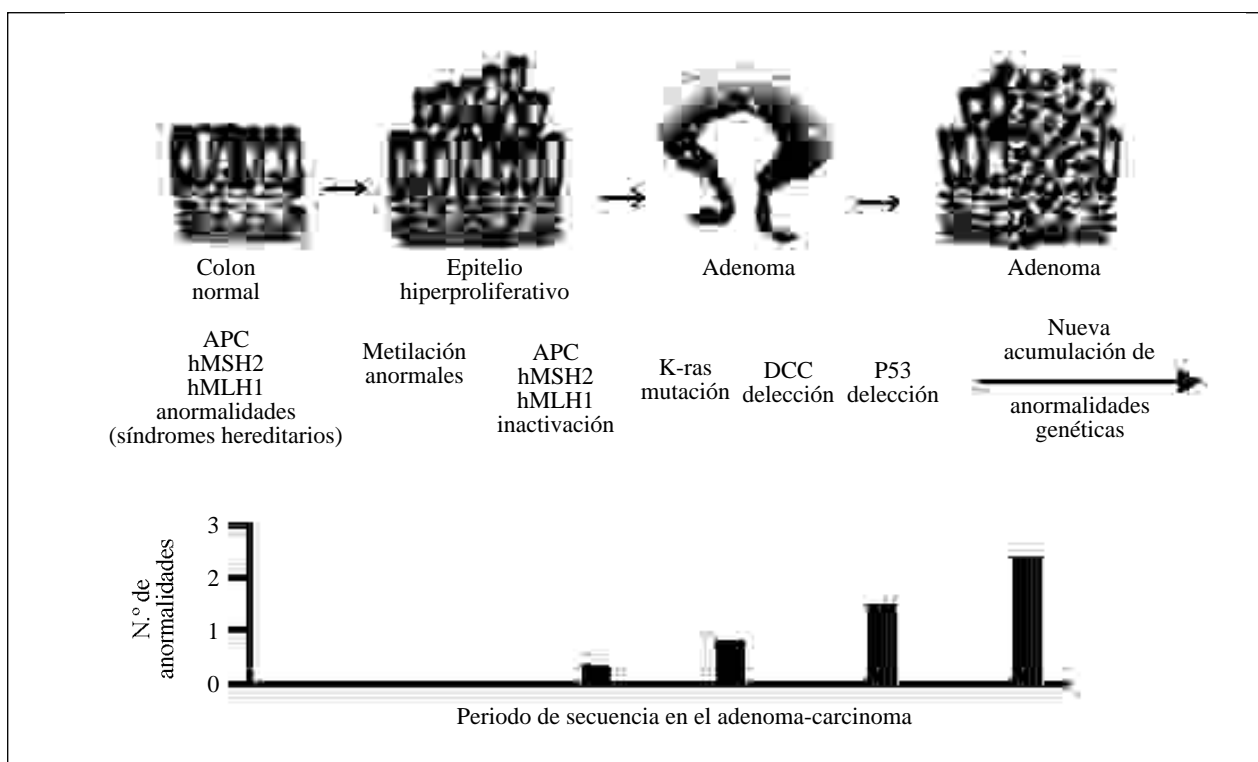


Fig. 2. Modelo genético de la tumorigénesis colorrectal. Secuencia de epitelio normal, epitelio hiperproliferativo, adenoma, carcinoma y metástasis, en la cuál van apareciendo las distintas alteraciones genéticas. El acúmulo de dichas alteraciones conduce a la malignidad celular. Tosibara y Sleisenger (62).

TABLA I
GENES IMPLICADOS EN LA CARCINOGENESIS COLORRECTAL

GEN	CROMOSOMA	PRESENCIA %	TIPO	FUNCIÓN	COMENTARIOS
k-RAS	12P12	30-40	oncogén	Transducción de señales	Mutaciones puntuales
Ciclinas	Varios	4	oncogén	Regulan ciclo celular	Sobreexpresión
Neu/her2	17	4	oncogén	Receptor factor de crecimiento	Amplificación
Myc	8	60	oncogén	Regula ciclo celular	Sobreexpresión
Nm23H1	17	-	Gen supresor	Inhibe metástasis	Sobreexpresión
Nm23H2	17	-	Gen supresor	Inhibe metástasis	Sobreexpresión
APC	5q21	60	Gen supresor	Adhesión celular	Pérdida heterocigotidad Mutaciones
DCC	18q21	70	Gen supresor	Adhesión celular	Pérdida heterocigotidad
P53	17p13.1	70	Gen supresor	Para el ciclo celular en G1	Mutación germinal Mutación puntual
P27	—	—	Gen supresor	Regulador ciclo celular	Pérdida de expresión
Bax	19Q13	50 en MMP+	Gen apoptosis	Inducir apoptosis	Mutaciones
TGF- RII	3P22	15 en MMP+	Gen supresor	Transducción de señales	Mutaciones
hMSH2	2p22	60	Gen susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutación germinal HNPCC
hMLH1	3p21	30	Gen susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutación germinal HNPCC
hPMS1	2q31-33	0-5	Gen susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutación germinal HNPCC
hPMS2	7p22	0-5	Gen susceptibilidad	Reparación del ADN	Mutación germinal HNPCC

MMP = cáncer colorrectal de fenotipo mutador de microsatélites; HNPCC = cáncer colorrectal hereditario de tipo no polipósico

—Genes reparadores del ADN, los cuales cuando están mutados se alteran los mecanismos de asegurar la fidelidad en la replicación del ADN, produciendo mutaciones en proto-oncogenes y en genes supresores de tumores (tabla I).

ONCOGENES

Los oncogenes fueron los primeros genes que se encontraron alterados en el cáncer (8). Codifican para proteínas que están implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular. Entre los mecanismos que activan los Proto-oncogenes están las mutaciones puntuales (K-ras, N-ras, H-ras), la amplificación génica (C-myc) o la translocación cromosómica (bcr/abl). Todas desregulan la expresión génica y producen una proteína con su función alterada. Aparte del oncogen K-ras pocos oncogenes se han visto implicados en el cáncer colorrectal. Un porcentaje pequeño de tumores colorrectales muestran mutaciones en Myc, Myb o Neu (9). Independientemente de las mutaciones puntuales, otro mecanismo por el cual se activan los Proto-oncogenes es por un aumento de su expresión. En el cáncer colorrectal se han detectado sobreexpresión de C-myc, C-myb, C-erb2/neu y de ciclinas D y E.

MUTACIONES PUNTUALES

Los oncogenes Ras están implicados en el 40% de los tumores colorrectales. La mayoría de las mutaciones (90%) se producen en K-ras, en los codones 12 y 13, siendo mínima la proporción encontrada en el codón 61, estas mutaciones son monoalélicas y aparecen pronto en el proceso tumorigénico colorrectal, aumentando su frecuencia entre los estadios de adenoma temprano y adenoma intermedio y manteniéndose su incidencia en adenomas tardíos y en los carcinomas (10,11). Este oncogén codifica para una proteína G de 21 kilodaltons, la cual está implicada en mecanismos de transducción de señales a través de la membrana. Las mutaciones en el oncogén K-ras, producen una proteína que se encuentra en estado activo (estado GTP). Esta proteína activa estimula continuamente los mecanismos de transducción de señales envueltos en la división celular (12).

AMPLIFICACIÓN GÉNICA

La amplificación específica de regiones pequeñas del genoma (amplificación génica) activa oncogenes en cierto tipo de tumores. En el cáncer colorrectal es muy raro que se produzca amplificación de genes específicos. Se han descrito casos aislados de amplificación génica de Myb (13), C-myc (14), Neu (15) y ciclinas (16). Los cánceres colorrectales con amplificación génica no se diferencian en su histología y comportamiento de otros tumores colorrectales.

METILACIÓN DEL ADN

La única modificación covalente conocida en el ADN de células normales de mamíferos ocurre en la citosina en posición 5 de los dinucleótidos 5'-CG-3'. Estos dinucleótidos están metilados en el 80% de las células somáticas y dicha metilación está implicada en el control de la expresión génica y condensación cromosómica (17). En la carcinogénesis colorrectal se produce una hipometilación del genoma, siendo este un hecho temprano que ha sido observado a menudo en adenomas pequeños (18). También ha sido observada una hipermetilación (19). A pesar de que las causas así como los efectos de estas diferencias en la metilación no han sido explicadas hasta el momento, si se piensa que estos cambios tienen un efecto significativo en la biología de la célula tumoral. Por ejemplo una metilación alterada podría en parte permitir la expresión de genes que en condiciones normales están silenciosos, como es el caso de las proteinasas, genes necesarios para la invasión celular, estos genes no se expresan normalmente en el epitelio colorrectal, pero podrían expresarse si se alterara la metilación. Alternativamente ha sido demostrado experimentalmente que una metilación reducida del ADN puede producir una condensación cromosómica aberrante (20), esto conduciría a una segregación cromosómica anormal. Las pérdidas cromosómicas son uno de los mecanismos más comunes de inactivación de genes supresores.

GENES SUPRESORES

En la carcinogénesis colorrectal, hay que destacar la gran importancia que tienen los genes supresores (tabla I). La función de estos genes es la de inhibir la proliferación celular. Mientras los oncogenes actúan de manera dominante, ya que la alteración de un único alelo es suficiente para producir la transformación celular, los genes supresores son de carácter recesivo, ya que la pérdida de función de estos genes necesita la inactivación de ambos alelos, la cual suele producirse por una mutación o por una delección, o bien por ambas alteraciones.

El concepto de gen supresor, proviene de la hipótesis de Knudson sobre el desarrollo del Retinoblastoma (21) para él se necesitaba que los dos alelos del gen estuvieran mutados para inactivar el gen y que se produjera el tumor Retinoblastoma. Un alelo se hereda mutado y el otro adquiere una mutación somática.

La primera evidencia molecular del papel de los genes supresores en la tumorigénesis colorrectal viene del estudio de las pérdidas alélicas (22,23). Los genes supresores pueden ser inactivados por diferentes mecanismos, mutaciones puntuales, delecciones, reordenamientos. La comparación de los alelos presentes en el tejido tumoral con respecto a los del tejido normal permite la identificación de delecciones como pérdidas de heterocigosidad (LOH).

El estudio de LOH en tumores colorrectales mostró que los cromosomas implicados más frecuentemente eran 5q, 8p, 17p, y 18q, (24) en los cuales se encontró

una pérdida de 36%, 50%, 73% y 75% de los casos respectivamente (fig. 3). Esta pérdida frecuente en determinados cromosomas, se ha aceptado como un paso previo en la inactivación de los genes supresores de tumores localizados en esos cromosomas (25).

Hasta la fecha han sido localizados los genes supresores localizados en los cromosomas 5q el gen APC, en 17p el gen P53 y en el 18q el gen DCC.

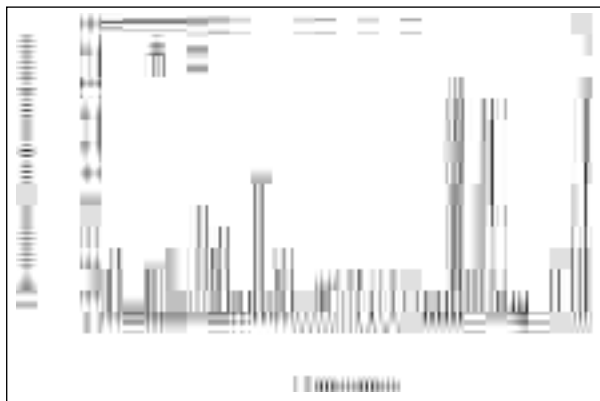


Fig. 3. Pérdidas de heterozigidad en 56 tumores colorrectales para los diferentes cromosomas. Las pérdidas alélicas están expresadas en % (61).

CROMOSOMA 5Q: GEN APC

Se han encontrado pérdidas alélicas del cromosoma 5q en el 20 al 50% de los tumores colorrectales, dependiendo de la región cromosómica ensayada (22, 26). Esta pérdida ocurre tanto en los tumores benignos pequeños como en los tumores malignos. Se puede decir que la inactivación del gen supresor en el cromosoma 5q, es un hecho temprano en la carcinogénesis colorrectal (fig. 2). Por otro lado, se vio por estudios citogenéticos, que los pacientes con poliposis adenomatosa presentaban una delección en el cromosoma 5q, encontrándose más tarde en estas familias un ligamiento común en la región 5q21. Cuatro genes fueron mapeados en esta región: MCC, TB2, SRP18 y APC (27, 28).

El gen APC se encuentra mutado en la Poliposis Familiar Adenomatosa (29, 30) y en los tumores colorrectales esporádicos (29). La mayoría de las mutaciones producen una proteína truncada y están localizadas en la primera mitad del último exón.

El gen APC se debe utilizar como factor diagnóstico de la Poliposis Familiar Adenomatosa, pero este gen también es importante en los tumores colorrectales esporádicos (31), ya que el 60% de estos tumores presentan mutaciones en este gen. Las mutaciones en este gen al igual que las pérdidas de heterozigidad del cromosoma 5q, ocurren al principio del proceso carcinogénico. Se encuentra el mismo porcentaje de mutaciones de este gen tanto en tumores benignos (63%) como en los malignos (60%), este hecho es diferente al que ocurre en otros genes como Ras, P53 o DCC, en los cuales su frecuencia aumenta con la progresión del tumor.

Aunque está claro que el gen APC, tiene un papel en la FAP y en los tumores esporádicos, sin embargo hasta la fecha muchas de sus funciones no están claras. Se puede decir que el gen APC controla el crecimiento celular por distintos mecanismos, entre ellos están: a) la regulación de la adhesión celular, b) el mantenimiento de la actina y microtubulo componentes del citoesqueleto y c) procesamiento de múltiples mecanismos de señalización celular incluyendo a aquellos envueltos en la progresión del ciclo celular y en la apoptosis.

GEN MCC

El gen MCC, está mutado en el cáncer colorrectal, y fue clonado durante la identificación de los genes del locus 5q21. Este gen está próximo al gen APC y se encuentra delecionado en las mismas alteraciones genéticas que producen las pérdidas alélicas en el locus de APC. Sin embargo la significación de estas delecciones no están claras (27). El gen MCC, codifica para una proteína de 829 aminoácidos, su secuencia al igual que la proteína APC tiene una similitud con la miosina y otras proteínas filamentosas. MCC tiene También una pequeña homología con la región m3MAChR que regula el acoplamiento a las proteínas G. Estas observaciones hacen pensar que MCC y APC, podrían funcionar en la misma vía.

GEN P53

El gen p53, se encuentra localizado en el cromosoma 17p21, siendo el gen supresor más ampliamente implicado en casi todos los tumores humanos (32). Se ha visto que las pérdidas alélicas localizadas en 17p están asociadas con las mutaciones puntuales de p53. Estas pérdidas alélicas son infrecuentes en los adenomas. Sin embargo aparecen en un 70% de los carcinomas, por lo cual la pérdida de función del gen p53, se asocia a la transición de un adenoma benigno a carcinoma (33). En las neoplasias colorrectales clasificadas según estadio, se ha visto también que las pérdidas alélicas del cromosoma 17p, son más frecuentes en los carcinomas avanzados, estando dicha pérdida asociada a la diseminación tumoral (34). Por lo tanto en ciertas neoplasias, la inactivación del gen p53 puede estar implicada en la progresión más que en la transformación tumoral. La mutación puntual del gen p53 se ha descrito aproximadamente en el 30-40% de los carcinomas colorrectales (35), aunque estas cifras varían de unos autores a otros. Con frecuencia esta mutación da lugar a una proteína de mayor estabilidad, que se acumula en los núcleos de la célula maligna y puede detectarse por ensayos inmunohistoquímicos. En las células normales la proteína es prácticamente indetectable por los métodos convencionales ya que su vida media es muy corta. En el cáncer de colon se detecta una sobreexpresión de p53 en un 40-70% de los tumores (36). Recientemente se han hecho estudios en los que se correlaciona la sobreexpresión de la proteína con las mutaciones, habiéndose comprobado

que no siempre que la proteína está sobreexpresada es debido a que existan mutaciones en el gen (37, 38). El valor pronóstico de p53 varía de unos autores a otros, encontrándose por lo general menor supervivencia en aquellos pacientes con sobreexpresión de la proteína o con mutaciones puntuales en el gen (39)

Las funciones bioquímicas de la proteína p53 son hoy por hoy objeto de estudio. Una de estas funciones, con importancia clara en la supresión tumoral, es la habilidad de unirse a secuencias específicas de ADN y activar la transcripción de genes, es decir su función como factor transcripcional. P53 transactiva la expresión de un gen supresor del ciclo celular denominado p21. La inducción del daño de ADN en la células, por diversos mecanismos, produce acumulación de p53, y detiene el ciclo celular en G1. En este periodo se efectúa la reparación del ADN o bien la célula se destruye mediante apoptosis. En un modelo propuesto por Lane (40), las células tumorales en las que p53 está inactivada no pueden acceder a la detención en G1. Por tal motivo se ha propuesto que estas células son genéticamente menos estables y tienen una mayor propensión a acumular lesiones genéticas, dando lugar a clones malignos que crecen continuamente. De esta forma se ha propuesto que p53 actúa como "guardián del genoma" controlando la integridad del mismo. Si esto es así las alteraciones del gen p53 determinarían el comportamiento clínico anatómopatológico y biológico de las neoplasias colorrectales, siendo de gran repercusión sobre el tratamiento y pronóstico clínico.

GEN P27

Estudios muy recientes muestran la implicación de otro gen supresor, el gen p27, en los mecanismos de la carcinogénesis. Loda y col (41), estudiaron la expresión de p27 en 149 carcinomas colorrectales, encontrando que los pacientes que expresaban p27 tenían una supervivencia media de 151 meses, mientras que los pacientes con baja expresión o sin expresión la supervivencia media era de 69 meses. En el estudio multivariable estos mismos autores encontraron que p27 es un factor pronóstico independiente. La pérdida de p27 se asocia con mal pronóstico, encontrándose un riesgo relativo de muerte de 2,9 ($p=0,003$). La ausencia de p27 es un poderoso marcador pronóstico negativo en el cáncer colorrectal y particularmente en pacientes con estadio II, por lo tanto, su estudio podría ayudar a seleccionar los pacientes en los cuales sería beneficioso una terapia adjuvante.

DCC Y OTROS GENES LOCALIZADOS EN EL CROMOSOMA 18

Estudios citogenéticos del cáncer colorrectal revelaron la existencia de pérdidas de heterocigosidad en el cromosoma 18. Posteriormente se localizaron estas pérdidas en el brazo largo de este cromosoma en la región

18q21. Aproximadamente entre un 60-80% de los cánceres colorrectales presentan pérdidas alélicas en este cromosoma (26). El gen DCC se clonó en esa región y es un gene supresor (42).

El gen DCC, produce una proteína que tiene una gran homología estructural con las moléculas de adhesión celular. Por inmunohistoquímica se ha visto expresión de la proteína DCC en los gránulos intracelulares de mucina en el epitelio del estómago y en la superficie luminal de la célula (43). La relación entre mutaciones en el gen DCC y la pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 18, no es tan directa como la existente entre las pérdidas de heterocigosidad en el 17p y mutaciones en p53 o las de 5q y el gen APC. Estudios recientes muestran la presencia de otros genes supresores en la región cromosomal 18q21, entre ellos el MADR2 y el DPC4 que están localizados en el mecanismo de señalización del TGF-

MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF-

A la superfamilia de TGF- β pertenecen proteínas con distintas funciones biológicas entre ellas están el control del crecimiento y la diferenciación celular, la morfología embrionaria y la inmunidad. La señalización del TGF- β envuelve la unión al receptor tipo II (TGF- β RII), la heterodimerización del TGF- β RII con el receptor tipo I y la posterior fosforilación. La señalización del TGF- β inhibe el crecimiento de los tejidos epiteliales (44, 45).

Recientemente se ha visto en tumores colorrectales de pacientes HNPCC (cáncer de colon de tipo hereditario no polipósico) la presencia de mutaciones en el TGF- β RII, produciéndose una inhibición de la señalización del TGF- β . Esto es cierto también en tumores colorrectales esporádicos que presentan inestabilidad de microsatélites (46). La mayoría de estos tumores, muestran inactivación de ambos alelos por la existencia de mutaciones que cambian el marco de lectura, produciéndose una proteína truncada. Mutaciones que tienen como resultado la pérdida de función de TGF- β RII han sido encontradas en aproximadamente un 15% de los tumores colorrectales (47).

Los genes DPC4 y MADR2 se encuentran mutados en un porcentaje pequeño de los cánceres colorrectales. Sin embargo en un estudio hecho en adenocarcinoma de páncreas, se encontró que el 48% de ellos presentaban deleciones homocigotas del gen DPC4 (48).

En estudios hechos por distintos autores se ha visto inactivación del camino del TGF- β , por TGF- β RII, DPC4 o MADR2 en una proporción sustancial de tumores colorrectales.

MODELO MOLECULAR DE LA CARCINOGENESIS COLORRECTAL

Las mutaciones que ocurren en genes tumorales pueden venir inducidas por factores externos, del

ambiente o por errores espontáneos que se producen durante la replicación del ADN. La mayoría de las células cancerosas, comparten una inestabilidad genómica. El cáncer colorrectal puede inducirse a través de dos vías moleculares, la vía supresora y la vía mutadora (fig. 4). Pues bien, cada vía presenta una inestabilidad genómica característica. A la vía supresora, le acompaña una inestabilidad cromosómica; a la vía mutadora, una inestabilidad a microsátélites. La inestabilidad cromosómica se manifiesta en el desarrollo de tumores con aneuploidía y pérdidas frecuentes de heterocigosidad (LOH) en múltiples locus, así como mutaciones que activan oncogenes e inactivan o bloquean genes supresores. En el cáncer de colon, el oncogén Ras y los genes supresores APC y

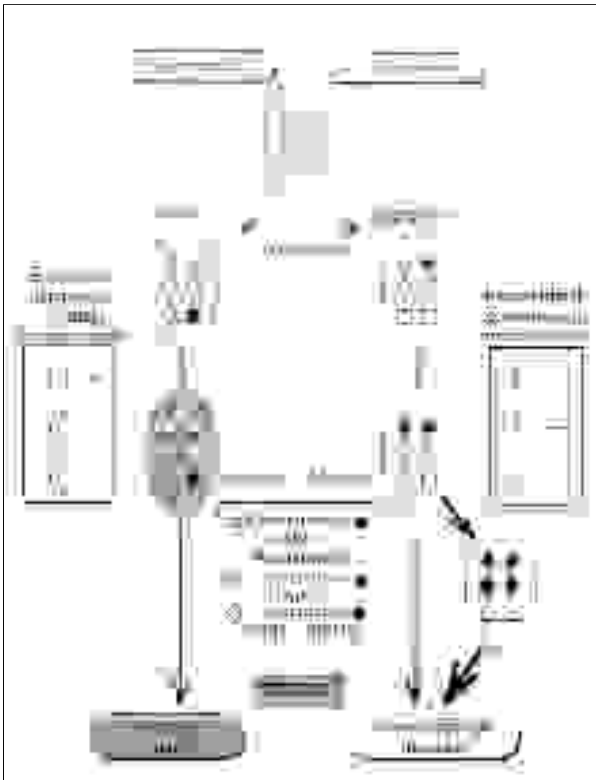


Fig. 4. Vías moleculares en la oncogénesis colorrectal. El modelo de Knudson se muestra en el caso de cáncer de colon de la vía supresora clásica. En este modelo se necesita que los dos alelos del gen supresor estén mutados para que se produzca el cáncer. La vía mutadora sigue un proceso similar, mediante la inactivación mutacional de los dos alelos mutadores. El grosor de las flechas refleja el aumento gradual de la probabilidad de producirse otras mutaciones en genes que se encuentran más abajo en la secuencia de la cadena oncogénica. M. Perucho (51).

p53 son los prototipos. Pertenecen a este grupo el 80% de los cánceres de colon de tipo esporádico (sin precedentes familiares) y los hereditarios de la poliposis familiar.

La mayoría de los tumores de colon hereditarios no polipósicos, así como el 15% de los esporádicos manifiestan inestabilidad a microsátélites. Este tipo

de inestabilidad genómica define a los tumores de la vía mutadora, que son mayoritariamente diploides o pseudodiploides. Además se observa en ellos una ausencia de mutaciones de los genes alterados habitualmente en los tumores de la vía supresora como APC, RAS y p53. Larry Loeb (49) fue el padre de la idea del fenotipo mutador, la propuso para explicar la presencia en células tumorales de un número de mutaciones superior del que se podría atribuir a la frecuencia espontánea de mutaciones de las células normales. Para Loeb, el cáncer solo se manifiesta cuando una célula adquiere capacidad de generar mutaciones con una frecuencia muy superior que las células normales, es decir expresa un fenotipo mutador (50).

A partir de 1991, Manuel Perucho empezó a estudiar la inestabilidad cromosómica en tumores de colon mediante el método de impresión de la huella dactilar (fingerprinting) (fig. 5), permitiéndoles investigar el grado de aneuploidia de los tumores (51). Por otro lado, al secuenciar las bandas que presentaban movilidad alterada, les permitió detectar deleciones somáticas de unos pocos nucleótidos. Estas deleciones, sucedían siempre en repeticiones monotonas de desoxiadenosinas en las terminaciones poly A de las secuencias repetidas de dinucleótidos

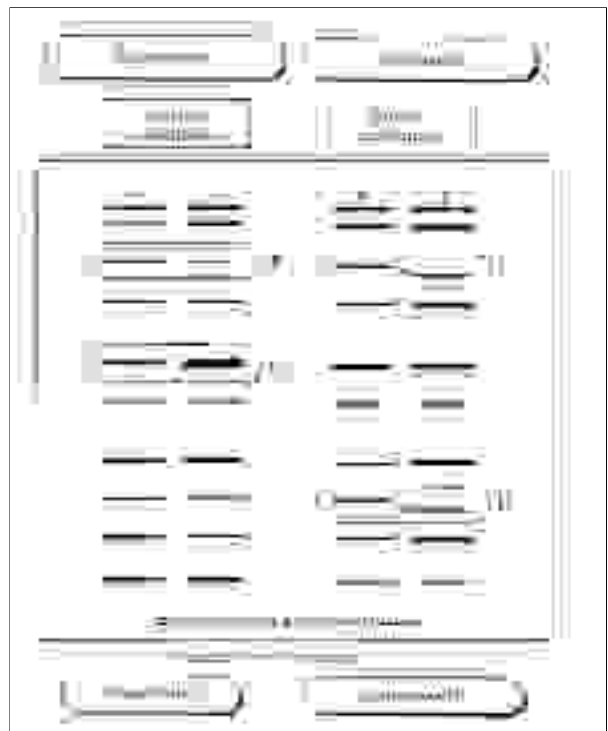


Fig. 5. Impresión de huellas dactilares de ADN de tejido normal (N) y tumoral (T) de pacientes de cáncer colorrectal. Los cuantitativos detectados en las huellas dactilares son diagnósticos de la inestabilidad cromosómica característica de la vía supresora. Los cambios cualitativos son debidos a la inestabilidad en secuencias repetidas y se producen en la vía mutadora del cáncer del fenotipo mutador de microsátélites. P y G representan pérdidas y ganancias de secuencias genómicas respectivamente. D significa deleciones intragénicas somáticas. Perucho M (51).

y trinucleótidos. Puesto que el fenómeno aparecía con cebadores diferentes, cabía suponer una tasa altísima de mutaciones en dichos tumores, llevando esto a pensar que la maquinaria de reparación del ADN se hallaba profundamente averiada. Es decir que las mutaciones en microsatélites eran consecuencia de otras mutaciones en otros genes que codificaban factores esenciales para mantener la fidelidad de replicación de dichas secuencias. Una vez mutado, el gen en cuestión promovía la aparición de muchas mutaciones más en el genoma. A estas mutaciones M. Perucho las llama mutaciones mutadoras (52, 53).

La comparación de las características de los tumores con mutaciones en microsatélites frente a los tumores sin mutaciones en estas secuencias reveló diferencias en el genotipo, como por ejemplo una asociación negativa con mutaciones en el oncogén K-ras y en el gen supresor p53. Las alteraciones en microsatélites manifestaban, pues la existencia de una vía molecular de oncogénesis distinta de la vía tomada por la mayoría de los cánceres de colon (acumular múltiples alteraciones genéticas, entre ellas mutaciones de K-ras y p53).

La vía mutadora es muy similar a la vía supresora. Aquella sigue también el modelo de los dos episodios mutacionales propuesto hace más de 20 años por A. Knudson (54), para Knudson el cáncer solo se manifiesta cuando sufren mutaciones los dos alelos del mismo gen (estudio hecho en el Retinoblastoma); esta hipótesis se ha generalizado con éxito a otros tipos de cánceres, entre ellos el colorrectal de la vía supresora y hoy se puede decir que también para el de la vía mutadora, ya que las mutaciones mutadoras se deben producir en los dos alelos del mismo gen mutador (fig. 4).

El fenotipo mutador de microsatélites tiene una predisposición hereditaria, relacionándose este como la manifestación molecular del síndrome de cáncer hereditario de colon no polipósico /HNPCC). Se han identificado algunas mutaciones mutadoras en los genes que intervienen en la reparación del ADN. Los primeros genes mutadores que se aislaron fueron el MSH2 (55, 56) y el MLH1 (57, 58). La inestabilidad a microsatélites asociada a mutaciones en estos genes o en otros genes mutadores que todavía no se han identificado, se utiliza hoy en día como criterio diagnóstico en los tumores del síndrome de Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC) y en el cáncer de estómago y endometrio. Se prevé que a lo largo de este año aparezcan más de 100.000 casos nuevos de cáncer del fenotipo mutador de microsatélites en todo el mundo.

En el 50% de los tumores de colon y en el 65% de los tumores de estómago del fenotipo mutador de microsatélites (MMP), se han encontrado mutaciones en la secuencia repetida de 8 desoxiguanosinas (G)8 en la región codificante del gen Bax. El gen Bax tiene un papel fundamental en los procesos de apoptosis. Bax está en equilibrio con Bcl2 y cuando este se rompe, aumentan los niveles intracelulares de la proteína

Bax, entonces la célula se suicida, por tanto las mutaciones inactivadoras del gen Bax impiden la apoptosis. El fenotipo mutador de microsatélites, se va manifestando poco a poco en un proceso en el que se va ejecutando la inactivación sucesiva de genes mutadores. Esto se debe a la existencia en los genes mutadores como MSH3, MSH6 y otros todavía por descubrir, de secuencias repetidas en sus regiones codificantes, produciéndose en ellas mutaciones, estas mutaciones se generan por la existencia de un fenotipo mutador previo. Es decir, un mutador muta a otro mutador. La inactivación de MLH1 por una mutación, genera un nivel de inestabilidad. Esta inestabilidad genómica conduce a mutaciones mutadoras secundarias en MSH3 y MSH6. Se acelera así la acumulación de mutaciones en los genes tumorales que impulsan la tumorigénesis.

El gen del receptor del factor transformante beta tipo II (TGF- β RII) y el gen pro-apoptótico Bax (59, 60) fueron los primeros genes tumorales cuya mutación se atribuyó al fenotipo mutador de microsatélites. Estas mutaciones no existen en los tumores de la vía supresora.

Como resumen se puede decir que en el cáncer de colon hay dos inestabilidades genómicas distintas. Una es la inestabilidad de microsatélites y la otra es una alteración profunda del balance cromosómico. A cada tipo de inestabilidad le corresponde una vía molecular diferente: por un lado los tumores pseudodiploides con inestabilidad a microsatélites de la vía mutadora y, por otro los tumores aneuploides de la vía supresora. Ambos tipos de tumores manifiestan diferencias en su fenotipo. Por ejemplo, en sus manifestaciones clínicas, los tumores del fenotipo mutador de microsatélites son en general menos agresivos y tienen mejor pronóstico que los tumores de la vía supresora. Por otro lado es importante resaltar que, los tumores de las dos vías no se pueden distinguir por el análisis microscópico tradicional de histopatología. Estas diferencias entre los tumores de una vía y otra se deben a las diferencias en los genes tumorales involucrados (61). El camino que conduce al cáncer es sumamente complicado por la enorme complejidad del genoma humano y de los mecanismos de protección de la pérdida del control de la proliferación celular. Pero una vez que se produce una alteración, la sucesión de otras alteraciones genómicas son en cierta medida irremediables.

Hoy en día es posible hacer análisis moleculares a las familias de alto riesgo de padecer cáncer de colon (HNPCC y FAP), pudiéndoseles ofrecer a los portadores de una mutación un consejo genético.

Por último es de esperar que el estudio de los genes implicados en el cáncer y sus consecuencias biológicas podrá conducir a un mejor conocimiento de los mecanismos que intervienen en el desarrollo de la enfermedad y contribuirá por tanto al desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Cohen AM, Shank B, Friedman MA: Colorectal cancer, in de Vita V, Hellman S, Rosenberg S (eds). *Cancer-Principles and Practice of Oncology*, 3d ed. Philadelphia, Lippincott, p895, (1989).
2. Jasss JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 33:783, (1992).
3. Lieberman D. Cost-effectiveness of colon cancer screening. *Am J Gastroenterol* 86:1789, (1991).
4. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multistage theory of carcinogenesis. *B J Cancer* 8:113, (1954).
5. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, Riggs AD, Orkin SH. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 47:4806, (1987).
6. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 238:193, (1987).
7. Peto R. Epidemiology, multistage models, and short term mutagenesis test. In: *Origins of human cancer*. Cold Spring Harbor (NY): Cold spring Harbor laboratory; p1403 (1977).
8. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779, (1987).
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759, (1990).
10. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, et al. K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 85:2004, (1993).
11. Forrester K, Almoguera C, Han K, Grizzle WF, Perucho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 327:298, (1987).
12. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366:643, (1993).
13. Alitalo K, Winqvist R, Lin CC, De la Chapelle A, Schwab M, Bishop JM. Aberrant expression of an amplified c-myc oncogene in two cell lines from a colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4534, (1984).
14. Finley GG, Schulz NT, Hill SA, Geiser JR, Pipas JM, Meisler AI. Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. *Oncogene* 4:963, (1989).
15. D'Emilia J, Bulovas K, D'Ercole K, Wolf BB, Steele G, Summerhayes IC: Expression of the c-erbB-2 gene product (p185) at different stages of neoplastic progression in the colon. *Oncogene* 4:1233, (1998).
16. Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res* 53:1986, (1993).
17. Bird DA: The essentials of DNA methylation. *Cell* 70:5, (1992).
18. Goetz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 288:187, (1985).
19. Silverman AL, Park JG, Hamilton SR, Gazdar AF, Luk GD, Baylin SB. Abnormal methylation of the calcitonin gene in human colonic neoplasms. *Cancer Res* 49:3468, (1989).
20. Schmid M, Haaf T, Grunert D. 5-Azacytidine-induced undercondensations in human chromosomes. *Hum Genet* 67:257, (1984).
21. Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Res* 45:1437, (1985).
22. Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass Jr, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 328:616, (1987).
23. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244:207(1989)
24. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759, (1990).
25. Reichmann A, Martin P, Levin B. Chromosomal banding patterns in human large bowel cancer. *Int J Cancer* 28:431, (1981).
26. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern se, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Boss JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319:525, (1988).
27. Kinzler KW, Nilbert MC, Su L-K, Vogelstein B, Brian TM, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253:593, (1991).
28. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Alberstsen H, Gelbert L et al. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 66:601, (1991).
29. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253:665, (1991).
30. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66:601, (1991).
31. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 340:626, (1992).
32. Hollstein M, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC. P53 Mutations in human cancer. *Science* 253:49, (1991).
33. Fearon ER, Jones Pa, Progressing towards a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 6:2783, (1992).
34. Khine K, Smith DR, Goh H. High frequency of allelic deletion on chromosome 17p in advanced colorectal cancer. *Cancer* 73:28, (1994).
35. Cchang F, Syrjanen K, Syrjjanen K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. *Am J Gastroenterology* 88:174, (1993).
36. Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P et al. Increased p53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival. *Br J Cancer* 66:758, (1992).
37. Dix B, Robbins P, Carrello S, House A, Lacopetta B. Comparison of p53 gene mutation and protein overexpression in colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 70:585 (1994).
38. Caldés T, Iniesta P, Vega FJ, Lopez JA, Diaz-Rubio E, Fernandez C, Cerdan J, Balibrea JL, Benito M. Comparative survival analysis of p53 mutations and protein accumulation in colorectal cancer. *Oncology* 55:249, (1998).
39. Iniesta P, Vega FJ, Caldés T, Benito M. p53 exon 7 mutations as a predictor of poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Letters* 130:153, (1998).
40. Lane DP. p53: guardian of the genome. *Nature* 358:1516, (1992).
41. Loda M, Cukor B, Tain SW et al. Increased proteasome dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Medicine* 3:231, (1997).
42. Fearon ER, Cho Kr, Nigro JM et al. Identification of a chromosome 18q gene which is altered in colorectal cancers. *Science* 247:49, (1990).
43. Hedrick I, Cho Kr, Fearon ER, et al. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 8:1174, (1994).
44. Massague J. The transforming growth factor-b family. *Ann Rev Cell Biol* 6:597, (1990).
45. Kingsley DM. The TGF-b superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133, (1994).
46. Markowitz S, Wang J, Myeroff L et al. Inactivation of the type II TGF-b receptor in colon cancer cell with microsatellite instability. *Science* 268:1336, (1995).
47. Parsons R, Myeroff LI, Liu B et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 55:5548, (1995).
48. Schute M, Hruban RH, Hedrick L et al. DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 56:2527, (1996).
49. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51:3075, (1991).
50. Loeb LA. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 54:5059, (1994).
51. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez 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* 89:10065, (1992).
52. Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biological Chem* 377:675, (1996).
53. Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nature Medicine* 2 n° 6:630, (1996).
54. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820, (1971).

55. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75:1027, (1993).
56. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75:1215, (1993).
57. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368:258, (1994).
58. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263:1625, (1994).
59. Rampino N, Hiroyuki Y, Ionov Y, Hisako Sawai YL, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275:967, (1997).
60. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, et al. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336, (1995).
61. Perucho M. Cáncer del fenotipo mutador de microsatélites. *Investigación y Ciencia*, junio:46, (1998).
62. Kinzler KW, Vogelstein B. Colorectal tumors. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D (eds) 7th Edition, Mc Grau-Hill, (1995).
63. Toribara NW, Sleisenger MH. Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 332:861, (1995).

Consejo genético en cáncer colorrectal

P. PÉREZ SEGURA

Servicio Oncología Médica. HCSC. Madrid

A pesar de los avances ocurridos en los últimos años en el tratamiento del cáncer colorrectal (CCR), con el aumento del diagnóstico de estos tumores en estadios más precoces así como la aparición de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad avanzada, dicha patología es la segunda causa de muerte por cáncer en la actualidad en los países desarrollados; anualmente se producen 131000 nuevos casos de CCR en los Estados Unidos (1), y aproximadamente la mitad de ellos acaban con la vida de los pacientes. Estos datos han animado a distintos grupos de investigadores a valorar la posibilidad de localizar individuos de alto riesgo de padecer esta enfermedad por su historia familiar, con la intención de prevenir, o al menos diagnosticar de manera precoz, la presencia de este cáncer u otros relacionados con él. De igual manera, el conocimiento de la biología de los cánceres heredofamiliares aporta datos de gran interés que se pueden aplicar con éxito a los tumores esporádicos que, no debemos olvidar, son la mayoría de las neoplasias que se diagnostican a diario (aproximadamente el 80-90% de todos los CCR pertenecen a este grupo).

A pesar de que los porcentajes sobre la incidencia de CCR hereditario nos puedan parecer desechables, si observamos los datos en cifras absolutas, alrededor de 10000 nuevos casos van a ser diagnosticados anualmente en un país como Estados Unidos; sin embargo, estamos hablando de un grupo de población en la que no nos interesan sólo los pacientes sino que los individuos sanos de familias de alto riesgo son también objeto y núcleo de estudio, ya que es sobre ellos donde podremos realizar una labor de profilaxis más útil; si tenemos en cuenta que en cada familia de riesgo puede haber varios miembros con mutaciones germinales que les predispongan a padecer esta enfermedad, podremos decir que estamos ante un problema sanitario y social de gran importancia.

HISTORIA FAMILIAR

La historia familiar es, sin lugar a dudas, el factor de riesgo más común en CCR (2). El riesgo de padecer CCR se multiplica por 2-3 veces en individuos sanos que presentan uno o más familiares en primer grado con esta enfermedad; si el número de familiares afectados es mayor, este riesgo puede incrementarse hasta ser de 4-6 veces por encima del de la población general (que en la actualidad, en los países desarrollados, es del 4-5%). Esta asociación entre CCR e historia familiar se incrementa cuando la edad de aparición es precoz o hay alta incidencia de CCR en colon proximal (3).

SÍNDROMES HEREDITARIOS EN CCR

Existen varios cuadros hereditarios en los que el CCR es la patología princeps; de ellos los más importantes, tanto por su repercusión social como por el número de individuos a los que puede afectar, son la poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el síndrome de Lynch o cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC). Enumeraremos a continuación estos síndromes haciendo una breve descripción de los mismos, centrándonos posteriormente en las dos entidades comentadas con anterioridad (Figura 1).

1) Síndrome de Peutz-Jeghers

Es una enfermedad de transmisión autosómica dominante, cuyo origen parece producirse en la mutación germinal de un gen denominado STK11, localizado en el cromosoma 19p13.3 (4). El cuadro

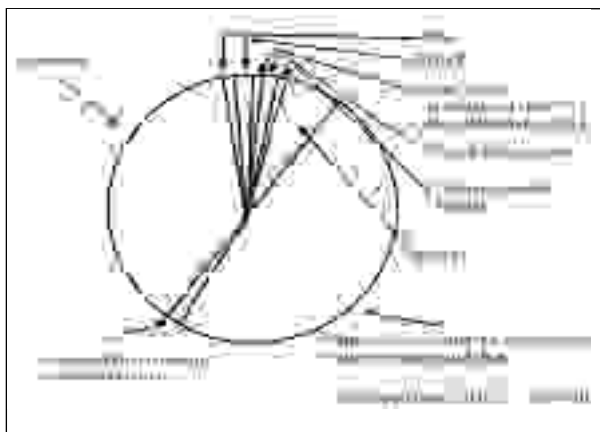


Fig. 1. Síndromes heredofamiliares en CCR.

clínico se caracteriza por la presencia de pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal, incremento en la frecuencia de neoplasias en dicho aparato, máculas melanocíticas mucocutáneas periorificiales y aparición de un tipo especial de cáncer de ovario como es el originado en los cordones sexuales. Se considera que la frecuencia de cáncer en este síndrome es 18 veces mayor que en la población general (5). Lynch y cols (6) recomiendan la realización de screening en estos individuos mediante sigmoidoscopia y test de sangre oculta en heces, comenzando en la segunda década de la vida; de igual manera aconsejan la realización de endoscopias digestivas altas y bajas cada 3 años, siendo obligada la resección de los pólipos que puedan aparecer al estudiar el tracto gastrointestinal. Se debe considerar la posibilidad de realizar una colectomía subtotal profiláctica si la aparición de demasiados pólipos y con características adenomatosas dificultan el control endoscópico de los mismos.

2) Poliposis juvenil familiar

Es una enfermedad autosómica dominante, en la que se localizan pólipos hamartomatosos en todo el colon, pero que también se pueden observar en estómago e intestino delgado. La aparición de pólipos juveniles de manera aislada no tiene una mayor incidencia de CCR pero la variante familiar si predispone a los individuos a padecer este tipo de cáncer. Un dato que nos debe alertar en un joven de la posibilidad de padecer este síndrome es la presencia de diarreas frecuentes, que en ocasiones pueden ser severas. La alteración molecular causante de este síndrome parece encontrarse en el gen PTEN. Es conveniente iniciar la realización de colonoscopias a la edad de 10-12 años, valorando la posibilidad de proceder a una colectomía subtotal profiláctica cuando el número de pólipos sea demasiado alto como para manejarlos endoscópicamente. El consejo genético se debe realizar a los adolescentes, pero también a sus padres.

3) Otros síndromes relacionados

El CCR de Burt y los pólipos adenomatosos colónicos en pequeña cantidad son otros cuadros que se puede englobar en este grupo. Tienen una herencia autosómica dominante y en el estudio endoscópico del colon encontramos un número moderado de pólipos adenomatosos. La incidencia de CCR está aumentada en relación a la población general, pero la edad de aparición es la misma que en el resto de los individuos. Se recomienda la realización de sigmoidoscopia cada 3 años, iniciándolas a la edad de 40 años.

Otro cuadro incluíble en este apartado es el del CCR familiar, en el que podrían estar implicados varios factores y la presencia de genes de baja penetrancia. El riesgo de padecer CCR se multiplica por 3 en estos individuos. Tanto la edad de aparición, como el número de pólipos como la localización del tumor primario en el colon estaría en relación con la incidencia y frecuencias normales observadas en la población general. Se aconseja realizar una colonoscopia inicial a los 35 años, repitiéndola cada 3 años.

Por último, incluiremos en este grupo la *colitis ulcerosa familiar* y la *enfermedad de Crohn*, cuyo patrón hereditario es desconocido en la actualidad aunque hay datos que apuntan a la posibilidad de que sea un trastorno autosómico dominante. Se caracteriza por la presencia de pseudopólipos en colon así como la presencia de CCR y/o linfomas del tracto gastrointestinal; otras alteraciones clínicas no tumorales que podemos observar en estos individuos incluyen artritis, colangitis esclerosante, pielodermatitis gangrenosa, eritemas anulares, etc. Se recomienda la realización de colonoscopia completa anual en pacientes con pancolitis de más de 8 años de duración. Se debe considerar la posibilidad de realizar una colectomía subtotal profiláctica en pacientes con displasia de alto grado persistente en la mucosa del colon, y en el caso de colitis ulcerosa, realizar una colectomía completa.

POLIPOSIS FAMILIAR ADENOMATOSA

La poliposis familiar adenomatosa (FAP) acontece en un 1% de todos los CCR. La historia de esta enfermedad parece comenzar en 1861 cuando se describió el primer caso de lo que podría haber sido una FAP (7); desde entonces se han ido añadiendo nuevos datos a este síndrome, lo que ha permitido un mejor conocimiento de su cuadro clínico, pronóstico, tratamiento y, en los casos en que es posible, prevención. En la década de los 80, Herrera y cols. (8) consiguen localizar el cromosoma donde se puede encontrar el gen responsable de esta enfermedad (5q21-22), y es 1991 cuando se consigue clonar el gen APC (9,10), cuya mutación da lugar a este síndrome.

Esta enfermedad presenta un patrón de herencia autosómica dominante con expresión variable, que afecta a 1 de cada 7000 individuos. El gen APC, cuya mutación es causante de esta enfermedad, presenta una penetrancia mayor del 90% y parece estar implicado en procesos apoptóticos.

La característica clínica fundamental de este síndrome es la presencia de cientos de pólipos en colon en individuos en la 2ª-3ª década de la vida. Sin embargo, no es ésta la única característica clínica de este síndrome; podemos encontrar pólipos adenomatosos en todo el tracto gastrointestinal, quistes cutáneos, adenomas suprarrenales, osteomas de mandíbula, tumores desmoides, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (CHRPE) y, por último, carcinomas de colon, periampulares, papilar de tiroides, sarcomas y tumores en SNC.

No todas las mutaciones en APC van a dar lugar al mismo fenotipo, ni el mismo fenotipo viene dado siempre por el mismo genotipo (11,12). Esto sugiere que, lógicamente, debe haber otros factores que modifiquen la expresión de este gen cuando se altera. Existe una variedad atenuada de FAP, también conocida como AFAP, la cual se caracteriza por la presencia de adenomas en colon, pero de predominio proximal y en menor cantidad que en FAP clásico, así como de pólipos en otros lugares del tracto digestivo, CCR y de ampolla de Water, pero no se observa ninguna de las otras entidades clínicas que comentamos se podían objetivar en la FAP. Si nos centramos en la localización de las mutaciones en el seno del gen APC podemos concluir que las mutaciones localizadas más proximales al extremo 5' en el gen APC van a dar lugar a esta forma atenuada de FAP, mientras que las que aparezcan más distales a dicho extremo producirán el cuadro clínico clásico (13). Otro dato de interés ya no sólo clínico, sino de cara a organizar el seguimiento de estos pacientes, es la relación entre mutaciones concretas y cuadros clínicos característicos; Caspari y cols (14) objetivaron que los individuos que presentaban mutaciones en los codon que van del 463 al 1387 presentaban regularmente CHRPE, mientras que las mutaciones que iban del 136 al 302 ó del 1445 al 1578 no presentaban esta enfermedad. De igual manera se pudo comprobar que la presencia de mutaciones en los codon que van del 1445 al 1578 predispone a estos pacientes a padecer osteomas de mandíbula y/o tumores desmoides.

La posibilidad de desarrollar CCR en los individuos afectados por este síndrome es del 100% a la edad de 40 años, si no se ponen en funcionamiento una serie de normas tanto de seguimiento como terapéuticas para evitarlo. El proceso por el cual estos pacientes acaban desarrollando CCR a edades tan precoces parece claro: la alteración de un gen "gatekeeper", como es APC, permite que se formen cientos, miles, de pólipos. Dada la gran cantidad de los mismos, la probabilidad de que uno de ellos degenera lo suficiente como para convertirse en CCR es muy alta. Por lo tanto, podríamos decir que lo que ocurre en estos pacientes es una producción acelerada de adenomas pero con una velocidad de degeneración neoplásica normal (todo lo contrario de lo que comentaremos al hablar de HNPCC, donde lo que se produce es una aceleración en el proceso degenerativo de un adenoma).

¿Y cómo podemos detectar una mutación en el gen APC? La mayoría de los grupos localizan las mutaciones del gen APC mediante un test de truncamiento de

proteína (PTT). Esta técnica detecta un 80%-85% de las mutaciones (15), por lo que casi un 20% de individuos con mutaciones no van a ser detectados mediante estas determinaciones (este dato es importante a la hora de organizar el seguimiento de estos sujetos como comentaremos posteriormente). Alrededor de un tercio de las familias con FAP van a presentar mutaciones de novo, lo que quiere decir que una de cada tres familias con este síndrome no va a presentar historia familiar típica que nos ayude a diagnosticar esta enfermedad; por lo tanto, la posibilidad de disponer de una técnica de diagnóstico molecular como es la determinación del truncamiento de proteína en el gen APC, nos va a permitir localizar individuos sin aparente historia familiar de FAP pero con cuadro clínico sugerente, dándonos la opción de prevenir lo que sería, sin lugar a dudas, un final trágico para el individuo y otros familiares.

La realización de una Consulta de Consejo Genético en un individuo con características clínicas sugerentes de FAP debe seguir una mecánica prefijada y exhaustiva. Este proceso conlleva una serie de pasos a realizar obligatoriamente.

1) Consulta pretest

En esta primera visita, la cual puede (y debe) durar entre 1 y 2 horas, debemos informar al probando y sus padres de los siguientes puntos: qué es este síndrome, su cuadro clínico, su historia natural, su prevención, su tratamiento; cómo se determinan las alteraciones moleculares, aclarando la posibilidad de falsos negativos y falsos positivos; la posibilidad de afectación de otros familiares; de las repercusiones físicas, psíquicas, sociales, éticas y legales que puede tener el resultado de dicha prueba; de las implicaciones que tendría un resultado positivo o negativo, tanto a nivel médico como psicológico. En este último apartado es interesante detenerse un momento para valorar la incidencia de respuestas emocionales de todo tipo en los individuos a los que se realiza esta prueba, en función del resultado obtenido en el estudio de mutaciones (no debemos olvidar que estamos tratando con jóvenes o sujetos sanos a los que se les comunica la posibilidad de padecer una enfermedad grave, y que hasta ese momento no habían tenido conciencia de esa situación); si el resultado es positivo, es decir, se localiza una mutación en el gen APC, los sujetos pueden reaccionar de manera positiva entendiéndose que se les da la posibilidad de prevenir una enfermedad mortal en un porcentaje alto de los casos mediante un seguimiento concreto e, incluso, la realización de cirugía profiláctica; además, intentará que otros elementos de su familia se realicen dicha determinación con el fin de que también se beneficien de esas maniobras de seguimiento. Entre las reacciones negativas encontramos rabia, impotencia, desmoralización, ansiedad, preocupación sobre lo que pensarán los demás, temor a la enfermedad, a la muerte o a los tratamientos que puedan alterar su forma de vida actual, preocupación por sus hijos o generaciones venideras, sensación de culpabilidad en los padres por pensar que han trans-

mitido a sus hijos una enfermedad, visión de la enfermedad como un "castigo divino" por algo malo que hicieron y que tendrán que pagar sus descendientes, miedo a la pérdida del puesto de trabajo o problemas con las compañías aseguradoras (esta situación no se contempla en la actualidad en Europa pero sí en otros países, y es necesario que se legisle esta posibilidad para evitar problemas que pueden aparecer en poco tiempo), dejadez y pérdida de ilusión en jóvenes sobre su futuro tanto personal como familiar, etc. Si el resultado es negativo (no mutación), la mayoría de las reacciones son positivas: descarga de la ansiedad, alegría por no tener más riesgo que la población general de padecer CCR, tranquilidad de que sus hijos no están afectados, etc; entre las reacciones negativas la más frecuente es el sentimiento de culpabilidad del sujeto cuyo resultado ha sido negativo ("superviviente culpable") en el seno de una familia con test positivo lo que puede conllevar una situación de automarginación por no poder acompañar al resto de sus parientes en la situación que se está desarrollando.

Es obligado explicar a los individuos que se realizan esta prueba que un resultado negativo (siempre y cuando tengamos otros parientes en estudio que hayan obtenido resultados positivos) no les confiere una sobreprotección a desarrollar CCR, sino que presentan una posibilidad igual al resto de la población de padecer dicha enfermedad.

Cuando se les ha explicado todos estos puntos a los sujetos candidatos a realizarse un test de mutaciones en APC, y estamos seguros de que han comprendido perfectamente los mismos, pasamos a la parte más importante de la Consulta de Consejo Genético, que atañe a la realización de una historia familiar amplia y detallada sobre los antecedentes tumorales (tipo de tumor, localización, edad de aparición, edad de fallecimiento, historia de poliposis) y no tumorales (trastornos visuales, etc); es necesaria, en la medida de lo posible, la confirmación de estos datos mediante informe clínico-patológico o por contacto directo con los médicos que trataron a dichos sujetos.

Tras la realización de esta historia familiar, si creemos que el sujeto candidato a realizarse el estudio molecular podría beneficiarse del mismo, debemos ofrecerle un ejemplar del Consentimiento Informado para que lo firme, antes de realizar cualquier otra maniobra. La Asociación Americana de Oncología Clínica (ASCO) publicó en 1996 (16) los principios que debe reunir todo consentimiento informado utilizado en consejo genético, los cuales incluyen:

- 1.- Información específica sobre el test que se va a realizar.
- 2.- Implicaciones de un resultado positivo o negativo.
- 3.- Posibilidad de que el test no sea informativo.
- 4.- Opciones de estimación del riesgo sin realizar test genético.
- 5.- Riesgo de transmitir la enfermedad a los hijos.
- 6.- Fiabilidad técnica de la prueba.
- 7.- Información sobre el test y el consejo genético.
- 8.- Riesgo de problemas psicológicos.

9.- Riesgo de discriminación laboral o en seguros.

10.- Confidencialidad de los resultados.

11.- Opciones y limitaciones de la vigilancia médica tras la realización de la prueba.

Cuando el sujeto ha firmado el consentimiento se puede proceder entonces a la extracción sanguínea necesaria para la realización del test.

Un tema controvertido es la realización a menores de edad de este tipo de pruebas (17,18). La mayoría de los países no permiten la realización de ningún tipo de prueba de cara a un consejo genético a menores de edad (aunque sigue sin existir una legislación concreta a este respecto, como ya se comentó anteriormente); el razonamiento para tomar esta decisión es claro: por un lado la persona no es legalmente independiente como para tomar la decisión de participar o no en la realización de dicha prueba y, por otro lado, en la mayoría de los casos no se va a iniciar ninguna maniobra de screening o tratamiento hasta que el sujeto no tenga 25 ó 30 años, por lo que no se va a beneficiar en ese momento de ningún estudio; además, la repercusiones psicológicas que puede conllevar la realización de este tipo de pruebas en un adolescente pueden ser demoledoras, tanto para su futuro profesional como personal. Sin embargo, la patología que estamos tratando en este punto tiene la característica de producirse en niños o adolescentes, y es este grupo poblacional el que realmente se va a beneficiar de un estudio de este tipo, por lo que es obligado incluir a los niños de entre 10 y 12 años en este tipo de pruebas cuando existan datos clínicos que nos hagan sospechar que nos encontramos ante una FAP (este mismo razonamiento se aplica a otros síndromes oncológicos hereditarios infantiles, como retinoblastoma, etc.).

2) Consulta posttest

Tras la obtención del resultado del estudio de mutaciones en el gen APC deberemos concertar una nueva entrevista con los sujetos en estudio para la comunicación de resultados. Este contacto nunca debe realizarse por teléfono o por escrito sino que debe existir un contacto directo con los individuos a la hora de comentar dichos resultados. Es preferible que la comunicación de los resultados se realice por separado con cada sujeto, y no con la familia al completo (19); sin embargo, en el caso de los niños, sus padres deben estar presentes en el momento de la comunicación de los resultados (no así al contrario). Estos se pueden clasificar en positivos (se detecta una mutación), negativos (no existe mutación) o no informativos (no podemos descartar la presencia o no de mutaciones). En el momento de la comunicación de los datos debemos insistir en la importancia de que todos los datos que se comentaron en la consulta pretest quedaron claros y que no existe ninguna duda sobre ninguno de ellos. Se debe ofrecer a los sujetos y sus familias apoyo psicológico por parte de personal especializado y una serie de normas sobre las medidas que deben tomar para evitar, en la medida de lo posible, el desarrollo de CCR (este punto se comentará ampliamente con posterioridad).

3) Seguimiento

En los sujetos en los que hemos obtenido un resultado positivo es obligada la realización de una consulta de seguimiento en 2 ó 3 meses tras la comunicación de los resultados para cerciorarnos del cumplimiento de las medidas recomendadas en la consulta posttest y para valorar la situación psicosocial en la que se encuentra. De igual manera, en los individuos con test negativo es conveniente realizar también esta visita para insistir en su participación en programas de screening de sujetos de alto riesgo de padecer CCR, y valorar la posibilidad de alteraciones psicológicas o emocionales dentro del ámbito familiar en el que se desarrolla.

Tras haber comprobado que el sujeto en estudio presenta una mutación en el gen APC, ¿qué programa de screening podemos recomendarle? Es necesario, desde el primer momento, tratar con los niños, poco a poco, de que en algún momento deberán someterse a una colectomía subtotal profiláctica, de manera que esta actitud no altere en gran manera su forma de vida; deberemos estar preparados para contestar multitud de preguntas sobre el quirófano, la técnica quirúrgica, el miedo a los hospitales, etc. Mientras tanto, las medidas de screening que se recomiendan son las siguientes (20) (Figura 2):

1) En sujetos con mutación en APC:

—Sigmoidoscopia basal entre los 10 y 12 años (edad a la que se recomienda realizar consejo genético), repitiéndola anualmente.

—Endoscopia digestiva alta cada 1-3 años, iniciándolas cuando aparezcan pólipos por primera vez.

—Rectoscopia anual tras colectomía subtotal profiláctica.

—En el caso de FAP atenuada, se recomienda colonoscopia y endoscopia digestiva alta anualmente, iniciándolas a la edad de 20 años (edad a la que se recomienda realizar consejo genético).

—En función de la localización de la mutación, se recomendará screening de otras patologías asociadas, que ya se comentaron previamente.

2) Test APC negativo:

—Sigmoidoscopia basal de inicio a los 18 años, y posteriormente a los 25 y 35 años (si fuese negativa, no se realizarán más) (19).

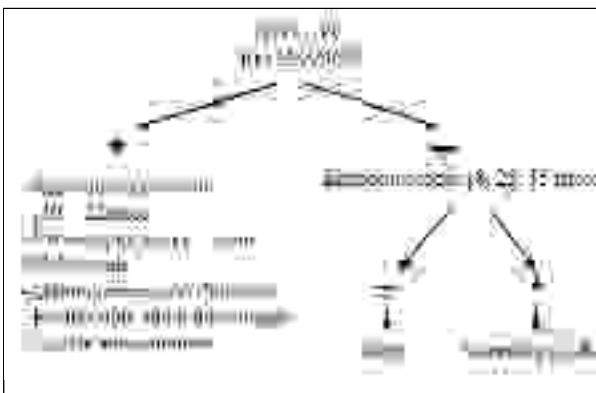


Fig. 2. Seguimiento de individuos con mutaciones en gen APC.

3) Test APC no realizado, en paciente de riesgo:

- Sigmoidoscopia basal anual, iniciándolas a los 10-12 años.

—En sujeto con riesgo de padecer FAP atenuado, colonoscopia y endoscopia digestiva alta cada 2 años, iniciándolas a los 20 años.

La utilización de la cirugía profiláctica es inevitable en los sujetos en los que hemos encontrado una mutación en el gen APC, ya que el 100% de ellos va a desarrollar CCR alrededor de los 40 años. La técnica recomendada es una colectomía subtotal con anastomosis ileorectal baja; en algunos casos se puede realizar mucosectomía rectal con anastomosis ileoanal, en situaciones en las que existan muchos pólipos rectales o si el seguimiento del recto restante va ser precario. Y, ¿cuándo decidimos realizar esta cirugía? En general, esta decisión va a venir determinada por el número de pólipos colorrectales y las características de los mismos, y no por el genotipo del sujeto. No debemos olvidar que estos individuos son proclives al desarrollo de tumores desmoides de predominio abdominal (tumores de gran agresividad local), y que estas neoplasias se pueden ver desencadenadas por un traumatismo quirúrgico, como puede ser una colectomía profiláctica (21,22), por lo que deberemos tener en cuenta también este dato a la hora de valorar el momento idóneo para la cirugía.

Un campo de gran interés en este grupo de pacientes es el de la quimioprofilaxis, donde el uso de AINEs, y específicamente los inhibidores de la COX-2, ha demostrado la disminución del número de pólipos así como la posibilidad de degeneración de los mismos, tanto en población general (23,24) como en la FAP (25,26).

CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO (HNPCC)

Cuando en 1895 el patólogo Aldred Warthin hablaba con su joven y deprimida secretaria sobre el miedo de ésta a morir de la misma enfermedad que el resto de su familia (cáncer digestivo o ginecológico) y a edad precoz, poco sospechaba este patólogo que iba a ser ésta la primera familia descrita (Familia G) afecta por el síndrome de Lynch (conocido ahora también como HNPCC) (27). Aquella mujer falleció, efectivamente, por un cáncer de endometrio, y desde entonces se han sucedido las publicaciones de familias con alta densidad de casos de cáncer digestivo (casi siempre de colon) asociados a otros tipos de neoplasias. (Figura 3)

En la actualidad se considera que entre un 5%-6% de todos los CCR pertenecen a este síndrome aunque, probablemente, esta prevalencia esté infravalorada, ya que se basa en criterios muy estrictos de selección de familias, como son los *Criterios de Amsterdam*, redactados en 1991 (28): 1) Al menos tres parientes con CCR, siendo uno de ellos familiar en 1º grado de los otros dos; 2) Al menos dos generaciones sucesivas afectas; 3) Al menos 1 paciente con CCR menor de 50 años; 4) Poliposis excluida. En la actualidad se considera que estos criterios, con una utilidad exclusivamente investi-

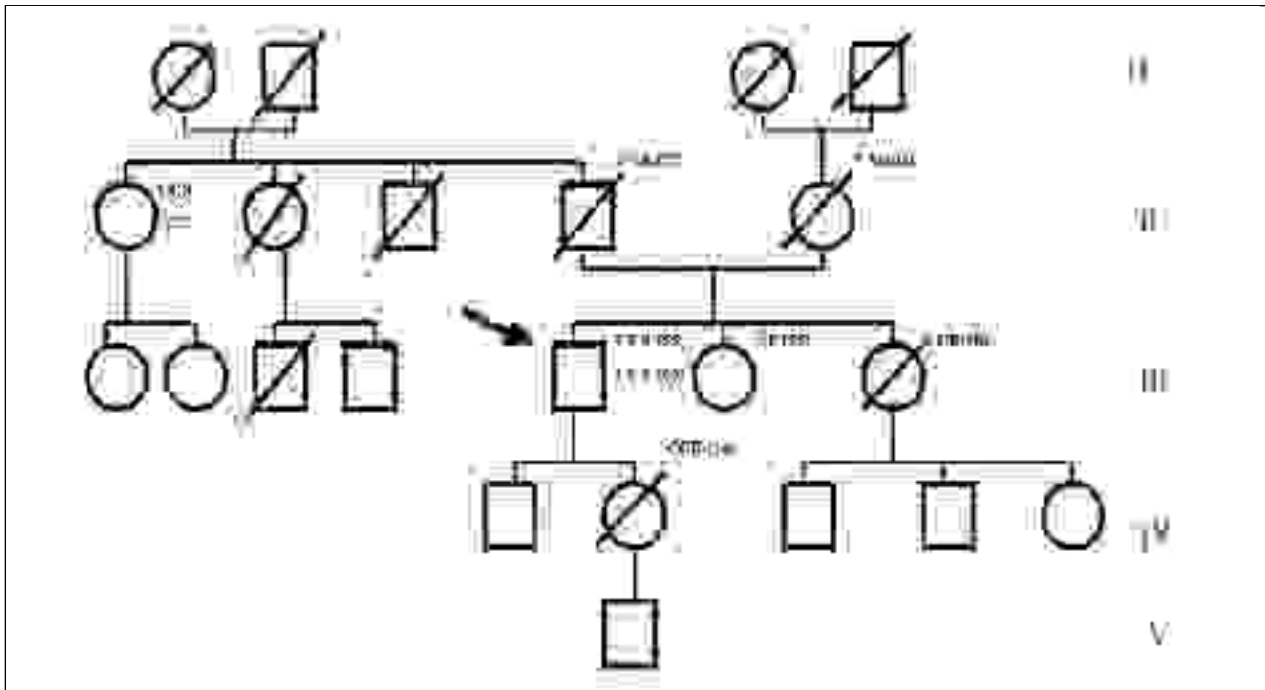


Fig. 3. Ejemplo de familia HNPCC (Familia CC-8 de la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología Médica del HCSC de Madrid). CCR: Cáncer colorrectal; CE: Cáncer endometrio; CM: Cáncer mama. (72): Edad del diagnóstico.

gacional, son demasiado restrictivos, y así, en 1997, se redactaron los *Criterios de Bethesda*, más en concordancia con la realidad de este síndrome; en ellos se incluye la posibilidad de aparición de otros tumores relacionados con esta enfermedad, así como la presencia de adenomas: 1) Criterios de Amsterdam; 2) Pacientes con 2 tumores relacionados con HNPCC (se comentarán más adelante); 3) Pacientes con familiar en 1º grado con cáncer relacionado con HNPCC, uno de los cánceres antes de los 45 años o adenoma antes de los 40; 4) Pacientes con CCR o endometrial menores de 45 años, especialmente si es de colon derecho o histología típica (también se comentará posteriormente); 5) Pacientes con adenomas antes de los 40 años.

Los estudios de ligamiento de familias con gran densidad de tumores digestivos, además de otras neoplasias, dio lugar al descubrimiento de unos genes que se conocían a nivel de levaduras y bacterias: los genes reparadores de ADN (MMR). Estos genes, cuando estaban mutados en estos cultivos daban lugar a una incidencia de mutaciones en otros genes que podía llegar a ser 700 veces mayor que en células normales; en el ser humano se ha comprobado que esta cifra se puede elevar hasta 1000 (29).

La función de estos genes, como su nombre indica, es la de reparar errores que se producen durante el procesamiento del ADN; entre ellos tenemos hMLH1 (30,31), hMSH2 (32,33), PMS1 (34), PMS2 (34) (entre estos cuatro engloban el 70% de las mutaciones encontradas en sujetos incluíbles en HNPCC), hMSH6/GTBP (de reciente descubrimiento (35)).

La mayoría (>90%) de los CCR en HNPCC presen-

tan un fenotipo RER+, o lo que es lo mismo, inestabilidad a microsátélites (36). Este aspecto confiere unas características especiales (37) a estos tumores como son: predominio en colon proximal, pobre diferenciación histológica, alta incidencia de CCR metacrónico/sincrónico (la cual puede llegar a ser del 30% a los 10 años tras cirugías limitadas y del 50% a los 15 años) (38,39), abundante producción de mucina extracelular, respuesta linfocítica tipo Crohn y mejor supervivencia. Los tumores RER+ no son exclusividad del colon sino que en estas familias también se han encontrado carcinomas endometriales con este fenotipo (75%) (40).

Pero, ¿qué cuadro clínico característico engloba HNPCC? Se trata de un trastorno de herencia autosómica dominante de aparición precoz de tumores malignos (alrededor de los 40-45 años), siendo el cáncer princeps el CCR, pero donde pueden aparecer neoplasias de otras histologías y localizaciones. El riesgo de padecer CCR en HNPCC es del 68% al 75% a los 65 años.(42,43)

El CCR en este síndrome viene derivado, en la mayoría de las ocasiones, de la malignización acelerada de algún adenoma; estos pacientes presentan un número similar de adenomas colónicos en comparación con la población general; lo que ocurre es que éstos adquieren el fenotipo mutador por la pérdida, mutación o inactivación del alelo salvaje de alguno de los genes reparadores del ADN (el otro alelo ya estaba alterado desde la concepción del individuo), provocando la progresión a carcinoma de una manera mucho más rápida que en otros individuos (44).

Como ya se ha comentado previamente, estos pacientes parecen presentar un mejor pronóstico en

comparación con los CCR esporádicos; un estudio danés (41) comparaba la supervivencia de 108 pacientes con HNPCC frente 870 con CCR esporádicos; la supervivencia en el primer grupo fue 56% frente 30% en el grupo de esporádicos; en los estadios localizados no hubo diferencias entre ambos grupos pero en los estadios con afectación ganglionar existían diferencias estadísticamente significativas (62% frente 39%). Otro estudio de interés fue realizado por Percesepe y cols (45) donde se comparó la supervivencia entre 85 pacientes con HNPCC frente 377 con CCR esporádico. Se demostró diferencia estadísticamente significativa a favor del primer grupo para la supervivencia a 5 años (55% frente 43%).

Pero no sólo se observa un aumento de CCR en estas familias; otros tumores frecuentes en este síndrome son:

—*Cáncer de endometrio*: el riesgo acumulado de padecer este tumor en HNPCC es del 30% al 39% a los 70 años de edad (46) y, además, la edad media de aparición disminuye hasta 15 años, pasando de los 65 años a los 45-50 años;

—*Cáncer de estómago*: existe una incidencia aumentada de estas neoplasias, sobretudo en las primeras familias descritas, aunque en estos momentos la incidencia ha disminuido, probablemente en relación con la disminución en la población general; parece que el tipo histológico más frecuente es el intestinal (47);

—*Cáncer de intestino delgado*: el riesgo aumenta hasta 25 veces sobre la población general;

—*Cáncer de vía biliar*: se observa un 5% de riesgo en esta población;

—*Cáncer transicional de vías urinarias (uréter y pelvis)*: alrededor de un 15% de riesgo en estos sujetos (46);

—*Cáncer cutáneo*: en el síndrome de Muir-Torre, una variedad de HNPCC donde se han objetivado mutaciones en MSH2, existen adenomas y carcinomas sebáceos y queratoacantomas múltiples (48);

—*Tumores cerebrales*: existe un aumento en la incidencia de glioblastomas multiformes en pacientes con síndrome de Turcot (41);

—*Cáncer de ovario*: existe una incidencia aumentada en las mujeres con mutaciones en los genes reparadores de ADN (49);

—*Cáncer de mama*: no presentan diferencias estadísticamente significativas sobre la incidencia de dicho tumor en mujeres incluídas dentro de este síndrome, pero parece que la edad de aparición es más precoz (46).

—*Otros cánceres recogidos en este síndrome*: sarcomas, carcinomas de laringe, páncreas, neoplasias hematológicas.

CONSEJO GENÉTICO EN HNPCC

El proceso a seguir en la Consulta de Consejo Genético con los individuos con mutaciones en alguno de los genes causantes de este síndrome es similar al comentado previamente para la poliposis familiar adenomatosa. Existen algunas diferencias que se comentan a continuación:

1) La posibilidad de desarrollar CCR en estos sujetos nunca llega a ser del 100%, de hecho, la probabilidad acumulativa máxima ronda el 85% a la edad de 75-80 años; por lo tanto, las medidas preventivas que podemos ofrecer a estos individuos deberán ir en consonancia con el beneficio terapéutico que puedan obtener.

2) Este tipo de tests diagnósticos no se realizarán a sujetos menores de edad mientras no exista una legislación al respecto; esto es así por dos motivos: por un lado, la persona no es legalmente independiente para decidir sobre la realización o no de esta prueba, y menos para firmar el Consentimiento Informado; y por otro, las medidas preventivas que podemos utilizar en sujetos afectados de mutaciones en algunos de los genes MMR no se empiezan a realizar hasta los 25-30 años, por lo que una prueba de este tipo no les produciría ningún beneficio a este grupo poblacional y sí podría alterar su situación psicosocial.

3) La edad media de aparición del CCR en este síndrome es más elevada que en FAP, por lo que nos tendremos que enfrentar a otra serie de problemas psicológicos y actitudes distintas a las que podemos encontrar en la población adolescente.

Y en la práctica, ¿qué pasos se siguen para decidir que individuos son de alto riesgo de padecer una mutación en alguno de los genes responsables de HNPCC y, en el caso de que aparezca dicha alteración, qué recomendaciones se pueden hacer?

En cuanto a la primera parte de la pregunta tenemos dos opciones (Figura 4): por un lado, podemos recibir en nuestra consulta un sujeto que reúne claramente los criterios de HNPCC descritos anteriormente (Criterios de Amsterdam o Bethesda); en este caso, realizaremos directamente el estudio de mutaciones en los genes MMR. En el caso que este sujeto no cumpla a la perfección todos los criterios previos pero la historia familiar nos permita sospechar que puede haber una relación oncológica familiar tenemos dos opciones: si nuestro laboratorio nos lo permite, realizaremos el estudio de estas alteraciones igual que en el caso anterior (no debemos olvidar que el estudio de estos genes es caro y muy laborioso) o podemos hacer estudio de inestabilidad a microsátélites para determinar si el tumor del sujeto en estudio es RER+, lo que nos haría suponer que podría

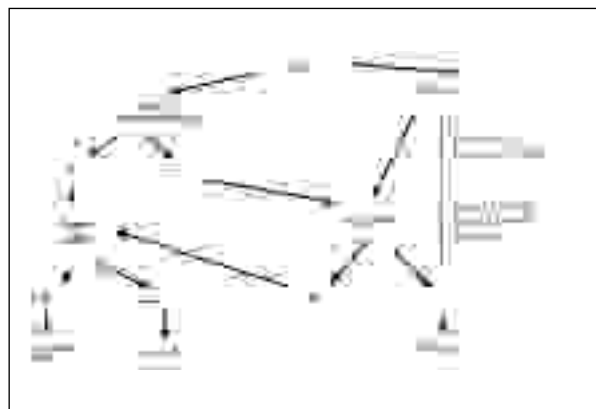


Fig. 4. Valoración de la realización de estudio de mutaciones en genes MMR en HNPCC.

tener alguna mutación en estos genes y pasaríamos a su estudio. En la actualidad se han aceptado dos maneras de estudiar los tumores de estos pacientes para poder llegar a la conclusión de que son RER+: por un lado podemos estudiar 5 microsatélites concretos (BAT25, BAT26, Mfd 15, D2S123 y D5S346) y, podremos hablar de "alta inestabilidad" cuando haya más de un microsatélite inestable, o de "baja inestabilidad" cuando sólo haya uno; la otra opción es el estudio de unos 30 microsatélites publicados en un panel de expertos en Bethesda de manera que si existe inestabilidad en el 30%-40% de los mismos podremos pensar que esa persona puede tener alguna mutación en uno de los genes MMR y proceder al estudio de los mismos.(50) En el caso que tras realizar dichos estudios no encontrásemos ninguna mutación, el sujeto en cuestión deberá seguir las Normas de Consenso sobre Screening en CCR de individuos de riesgo.(51) En el caso de los individuos en los que se ha encontrado alguna mutación, tenemos tres opciones: seguimiento, cirugía y quimiopprofilaxis.

1) Seguimiento (51,52)

- Colonoscopia cada 1-3 años (Inicio: 20-25 años)
- Test de sangre oculta en heces anual (Inicio: 20-25 años)
- Aspirado endometrial o eco transvaginal anual (Inicio: 25 años)
- Mamografía anual (Inicio: 40 años)
- Eco transvaginal/Doppler color y Ca 12.5 anual (Inicio: 25-30 años)
- Endoscopia alta (en los casos de familias con alta incidencia de cánceres gástricos y/o intestino delgado)
- Estudio de citología y/o sangre en orina (en familias con alta densidad de casos con tumores urológicos).

2) Cirugía profiláctica

—Colectomía subtotal: está indicada en todos los individuos con mutaciones conocidas en alguno de los genes MMR, que vayan a ser intervenidos por la presencia de CCR; en los sujetos que han sido intervenidos por CCR, como profilaxis de aparición de un segundo CCR; individuos que no van a poder realizar el seguimiento recomendado; y por último, pacientes con múltiples adenomas (esta indicación está basada en la rápida malignización de los mismos en estos individuos, en la presencia de adenomas planos o irregularidades en la mucosa colónica en estos sujetos que pueden pasar desapercibidos al endoscopista y que pueden degenerar en un CCR, así como en las dificultades técnicas que puede entrañar una resección endoscópica segura en algunos adenomas).

—Histerectomía y doble anexectomía: en el caso de realizarse debe ser entre los 35-40 años, ya que la edad de las neoplasias ováricas y endometriales se adelanta en 15-20 años en estas mujeres, respecto a la población

general. Estaría indicada en mujeres que van a ser intervenidas por CCR y/o mujeres que no desean tener más hijos.

3) Quimiopprofilaxis: la recomendación de llevar una vida más sana (más ejercicio, dieta más equilibrada, no fumar, etc.) se presupone que se realiza en toda la población a través de campañas de educación general, colegios, etc.; sin embargo en estos sujetos puede ser de especial interés ya que, hasta la fecha, no existen datos claros de qué interrelación existe entre las alteraciones genéticas comentadas previamente y factores exógenos como la dieta o el sedentarismo.

En el campo de los fármacos existen estudios con antiinflamatorios no esteroideos (sobre todo los que inhiben la ciclooxigenasa-2) que demuestran una disminución de la incidencia de adenomas así como de la progresión a CCR en la población general (24,53), así como en individuos afectados por FAP (26,54).

CONCLUSIÓN

En los últimos años los avances moleculares nos han permitido localizar individuos de alto riesgo de padecer algunos tipos de cánceres. Aunque el número de casos de cáncer familiar es mínimo en comparación con el total de los tumores diagnosticados en el mundo anualmente, su repercusión social es tal que requiere un equipo de profesionales (médicos, investigadores básicos, psicólogos, etc.) encargados exclusivamente de este campo; no se trata solamente de extraer una muestra de sangre y obtener un resultado que nos pueda indicar qué persona tiene más o menos riesgo de padecer un determinado tipo de cáncer; se trata en realidad de realizar un tipo de medicina global en individuos enfermos y, lo que es quizá más importante, sanos, a los que debemos ofrecer un apoyo científico y psicológico, en el ámbito más amplio de la palabra. En un artículo publicado por Giardello y cols en 1997 (55) se valoraba del uso y la interpretación que se hace de determinados tests genéticos, en una enfermedad como la FAP, mediante el análisis de mutaciones en el gen APC; el dato quizá más interesante de este artículo era que solamente el 18.6% de los sujetos a los que se les había realizado esta prueba habían recibido consejo genético pretest, que solamente el 16.9% había recibido un consentimiento informado previo a la extracción sanguínea y, por último, que se había producido un error en la interpretación de los resultados de esta prueba por parte del médico en un tercio de los casos. Por lo tanto, es necesario que este tipo de medicina se realice en Unidades preparadas a tal efecto de manera que se pueda asegurar el máximo beneficio para la población con el mínimo margen de error.

BIBLIOGRAFÍA

1. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1998. CA Cancer J Clin 1998; 48: 6-29.
2. Burt RW. Screening of patients with a positive family history of colorectal cancer. Gastrointest Endosc Clin North Am 1997; 7: 65-79.
3. Negri E, Braga C, La Vecchia C, Franceschi S, Filiberti R, Montanella M, Falcini F, Conti E, Talimini R. Family history of cancer and risk of colorectal cancer in Italy. Br J Cancer 1998; 77: 174-179.
4. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R,

- Müller O, Back W, Zimmer M. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serin threonine kinase. *Nat Genet* 1998; 18: 38-44.
5. Giardello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhans GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH, Luk GD. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987; 316: 1511-1514.
 6. Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. Genetics and cancer of the gastrointestinal tract; in Wanebo HJ (ed): *Surgery for Gastrointestinal Cancer: A Multidisciplinary Approach*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997, pp 59-86.
 7. Luschka H. Weber polyose vegetationionen der gesaten dickdarmschleimhaut. *Arch Path Anat Phys Klin Med* 1861; 20: 133-142.
 8. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg A. A Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Gene* 1986; 25: 473-476.
 9. Kinzler KW, Nilbert MC, Su L, Vogelstein B, Bryan T, Levy DB, et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253: 661-665.
 10. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-669.
 11. Giardello FM, Krush AJ, Petersen GM, et al. Phenotypic variability of familial adenomatous polyposis in 11 unrelated families with identical APC gene mutation. *Gastroenterology* 1994; 106: 1542-1547.
 12. Paul P, Letteboer T, Gelbert L, et al. Identical APC exon 5 mutations result in a variable phenotype in familial adenomatous polyposis. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 925-931.
 13. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, Lanspa S, Cavalieri J, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) phenotypically and genotypically distinctive variant FAP. *Cancer* 1995; 76: 2427-2433.
 14. Caspari R, Olschwang S, Friedl W, Mandl M, et al. Familial adenomatous polyposis: Desmoids tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 337-346.
 15. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1982-7.
 16. Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* 1996; 5: 1730-1736.
 17. Wertz DC, Fanos JH, Reilly PR. Genetic testing for children and adolescents. Who decides? *JAMA* 1994; 272: 875-881.
 18. Pelias MZ. Genetic testing in children and adolescents: unresolved issues. *Am J Hum Genet* 1994; 55: A21.
 19. Petersen GM, Boyd PA. Gene tests and Counseling for Colorectal Cancer Risk: Lessons From Familial Polyposis. *J Natl Cancer Inst Monog* 1995; 17: 67-71.
 20. Lynch HT, Lynch JF. Genetics in Colonic Cancer. *Digestion* 1998; 59: 481-492.
 21. Lynch HT, Fitzgibbons R Jr, Chong S, et al. Use of doxorubicin and dacarbazine for the management of unresectable intra-abdominal desmoid tumors in Gardner's syndrome. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 260-267.
 22. Lynch HT, Fitzgibbons R Jr. Surgery, desmoid tumors and familial adenomatous polyposis: Case report and literature review. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2598-2601.
 23. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MT, et al. Aspirin use and the risk of colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 1994; 121: 241-246.
 24. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DG, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995; 333: 609-614.
 25. Giardello FM, Hamilton SR, Krush AJ, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 328: 1313-1316.
 26. Nugent KP, Farmer KCR, Spielman AD, et al. Randomized controlled trial of the effect of sulindac on duodenal and rectal polyposis and cell proliferation in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1993; 80: 1618-1619.
 27. Warthin AS. Hereditary with reference to carcinoma. *Arch Intern Med* 1913; 12: 546-555.
 28. Vasen HFA, Mecklin J-P, Meerakhan P, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 424-425.
 29. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, et al. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6319-6323.
 30. Bronner CE, Baker SM, Morrison PJ, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-261.
 31. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei Y, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 262: 1625-1629.
 32. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-1038.
 33. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a MutS homolog in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75: 1215-1235.
 34. Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Lin B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994; 271: 75-80.
 35. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, et al. Germline mutation of hMSH6 on the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997; 17: 271-272.
 36. Lin B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 169-174.
 37. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-156.
 38. Mecklin J-P, Jarvinen HJ. Clinical features of colorectal carcinoma in cancer family syndrome. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 160-164.
 39. Lynch HT, Harris RE, Lynch PM, et al. Role of heredity in multiple primary cancer. *Cancer* 1977; 40: 1849-1854.
 40. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, et al. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5100-5103.
 41. Myrholm T, Bisgaard ML, Bernstein I, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: clinical features and survival: results from the Danish HNPCC Register. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 572-576.
 42. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1114-1125.
 43. Aarnio M, Mecklin J-P, Altonen LA, et al. Lifetime risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995; 64: 430-433.
 44. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 839-847.
 45. Percepe A, Benatti P, Roncucci L, Sassatelli R, et al. Survival analysis in families affected by hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 1997; 71: 373-376.
 46. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993; 71: 677-685.
 47. Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen La, et al. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1997; 74: 551-555.
 48. Lynch HT, Fusaro RM. Muir-Torre syndrome: Heterogeneity, natural history, diagnosis, and management. *Prob Gen Surg* 1993; 10: 1-14.
 49. Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutations analysis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1020-1027.
 50. International Workshop on Microsatellite Instability and RER Phenotypes in Cancer Detection and Familial Predisposition Meeting, Bethesda, MD, 1997.
 51. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, et al. Colorectal Cancer Screening: Clinical Guidelines and Rationale. *Gastroenterology* 1997; 112: 594-642.
 52. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for Follow-up Care of Individuals With an Inherited Predisposition to Cancer. I. Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer. *JAMA* 1997; 277: 915-919.
 53. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991; 325: 1593-1596.
 54. Giardello FM, Hamilton SR, Krush AJ, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 328: 1313-1316.
 55. Giardello FM, Brensinger JD, Petersen G, et al. The use and interpretation of commercial APC gene testing for familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1997; 336: 823-827.

Citoquinas

C. RONCERO

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

Las citoquinas son, en general, proteínas de secreción que se caracterizan por su función común como señales intercelulares. A diferencia de las hormonas, las citoquinas influyen las actividades celulares en gran medida en medioambientes confinados, de una manera autocrina o paracrina, y normalmente no consiguen mantener niveles detectables en la circulación. El progreso de la biología molecular ha permitido la identificación, aislamiento y caracterización de los genes para esta gran familia de proteínas así como el de sus receptores celulares. Entre los miembros de esta superfamilia se incluyen las interleuquinas (IL; linfoquinas y monoquinas), interferones (IFN), las familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), de las inmunoglobulinas, algunas quimoquinas y ciertos factores de crecimiento peptídicos. En general, las citoquinas son glicoproteínas de 100 a 200 residuos aminoacídicos. La mayoría de ellas se traducen con un péptido señal amino-terminal que dirige a la cadena polipeptídica hacia el retículo endoplásmico para su posterior procesamiento y secreción. Una vez liberadas al exterior celular, las citoquinas se unen a receptores específicos de alta afinidad, localizados en las membranas plasmáticas de las células diana. Esta unión a su(s) receptor(es) confiere a las citoquinas su extremada potencia aún en un rango de concentraciones que oscila entre picomolar y nanomolar. Tras la ocupación del receptor, se desencadenan varias señales intracelulares, como la activación de proteína quinasas, la regulación de factores transcripcionales de respuesta temprana y la síntesis *de novo* de proteínas específicas. Estos eventos intracelulares median la señal extracelular de la citoquina en efectos biológicos tales como la proliferación, diferenciación celular, la quimotaxis, la secreción de proteínas o la muerte celular por apoptosis.

El avance en el estudio de los mecanismos de acción de las citoquinas ha revelado que éstas moléculas com-

parten las características de pleiotropía y redundancia. Así, si bien en un principio se pensó que cada citoquina ejercía un efecto específico en una determinada célula diana, estudios posteriores han determinado que la mayoría de las citoquinas exhiben un amplio espectro de efectos biológicos sobre varios tejidos y tipos celulares. Un ejemplo de pleiotropía lo constituye la interleuquina-6 (IL-6), identificada en un principio como un factor de diferenciación de las células B para la inducción terminal de su maduración en células productoras de anticuerpos; estudios posteriores revelaron su implicación no solo en el sistema inmune sino también en los sistemas hematopoyético, endocrino, hepático y neural. Las citoquinas también funcionan de una forma redundante, siendo varias las citoquinas que sobre un tipo específico celular pueden tener acciones semejantes. Así, no solo la IL-6 promueve la diferenciación de células B en células productoras de anticuerpos sino también las interleuquinas 2, 4 y 5 y el interferón- γ (IFN- γ), entre otros. Otro ejemplo de redundancia bien caracterizado lo constituyen el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) e IL-6. Si bien ambas citoquinas y sus receptores son distintos, son capaces de inducir de forma similar proteínas de fase aguda en hepatocitos, la maduración de magacariocitos, la formación de plaquetas, la activación de osteoclastos y la resorción ósea (1,2). De forma análoga, la mayoría de los procesos mencionados anteriormente también pueden ser activados por la Oncostatina M y la IL-11 (3-6). La redundancia de las citoquinas se ha demostrado con la consecución de animales transgénicos donde se han anulado selectivamente la expresión de citoquinas específicas; los fenotipos de los animales transgénicos suelen presentar características casi normales en la mayoría de los casos. El descubrimiento de los mecanismos de acción de las citoquinas ha permitido corroborar la redundancia de éstas proteínas en tipos celulares específicos; como se discutirá

más adelante, algunas citoquinas comparten la característica de activar las mismas proteínas implicadas en sus rutas de transducción de señal.

En general, las rutas de transducción activadas por citoquinas no son específicas de ellas, ya que otras moléculas como ciertas hormonas (Hormona de Crecimiento, Prolactina, Eritropoyetina, Leptina) o ciertos factores de crecimiento (Factor de crecimiento Epidérmico, EGF; Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, PDGF) son capaces de generar respuestas similares en tipos celulares específicos (7). De igual forma, rutas de transducción normalmente asociadas a factores de crecimiento pueden también resultar activadas por citoquinas. Una característica que comparten muchas citoquinas es la implicación de una proteína transductora de membrana necesaria para la activación de rutas de señalización. Estas proteínas transductoras interactúan con el receptor activado por ligando, lo cual conlleva la interacción con otras proteínas implicadas en la ruta de señalización. En este breve resumen destacaremos aquellas rutas mayoritariamente asociadas a citoquinas, las cuales se agruparon clasificadas por homología de sus receptores. Atendiendo a la homología entre los distintos receptores de citoquinas, estos se han clasificado en tres tipos generales: tipo I, tipo II y familia del TNF/NGF.

RECEPTORES DE TIPO I

Un gran número de citoquinas, denominadas en su conjunto hematopoyetinas, se unen a receptores de tipo I. Estos receptores comparten una serie de motivos con-

servados en sus dominios extracelulares que consisten en dos dominios tipo III de fibronectina, de aproximadamente unos 100 aminoácidos cada uno (8). En el dominio amino terminal del receptor existen 4 residuos de cisteína con un espaciado en la secuencia característico, y el motivo WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser) que se encuentra en una región que separa los dominios tipo III de fibronectina y está implicado en la interacción ligando-receptor (Figura 1).

A diferencia de los receptores con actividad tirosina quinasa, los receptores de esta familia no tienen dominio quinasa, presentando solo una ligera similitud entre sus dominios citoplasmáticos. A pesar de esto, la unión de la citoquina a su receptor desencadena rápidamente procesos de fosforilación de varios substratos celulares así como de los propios receptores, lo cual es posible gracias a la interacción con los receptores activados por ligando de proteínas con actividad tirosina quinasa. Dentro de esta familia de receptores, las citoquinas pueden a su vez clasificarse dependiendo del tipo de proteína transductora que presenten. Así, la familia *gp130* se caracteriza por la interacción de esta proteína (*gp130*) con los receptores específicos para IL-6, IL-11, IL-12, LIF (factor inhibidor de la leucemia), OnM (oncostatina M), CNTF (factor neurotrófico ciliar) y G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos). La familia *gp140* engloba a IL-3, IL-5 y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Por último, la familia γ -C engloba a las interleuquinas 2, 4, 7, 9, 13 y 15 (Figura 2).

La secuencia de eventos que suceden a la unión del ligando con el receptor implica de forma sucesiva: (1) la formación del complejo citoquina-receptor-transductor,

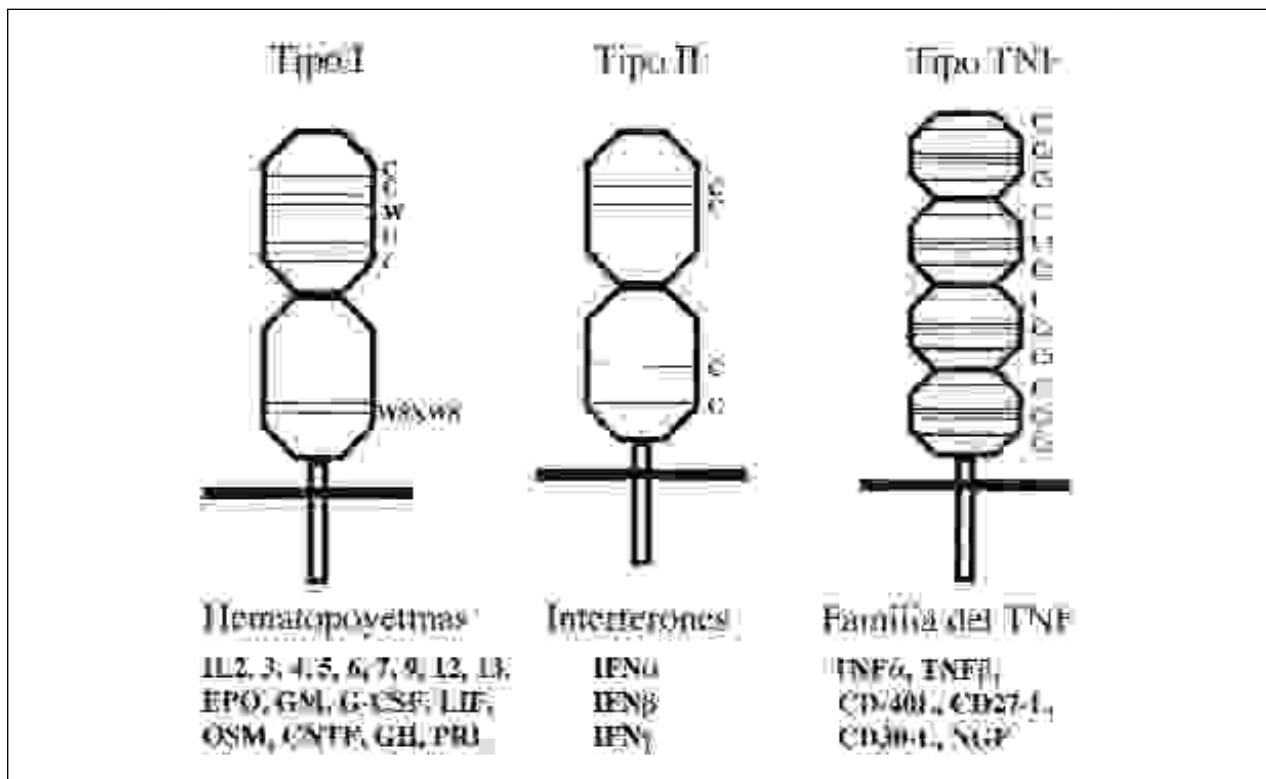


Fig. 1. Familias de receptores de citoquinas. C: cisteína, W: triptófano, S: serina.

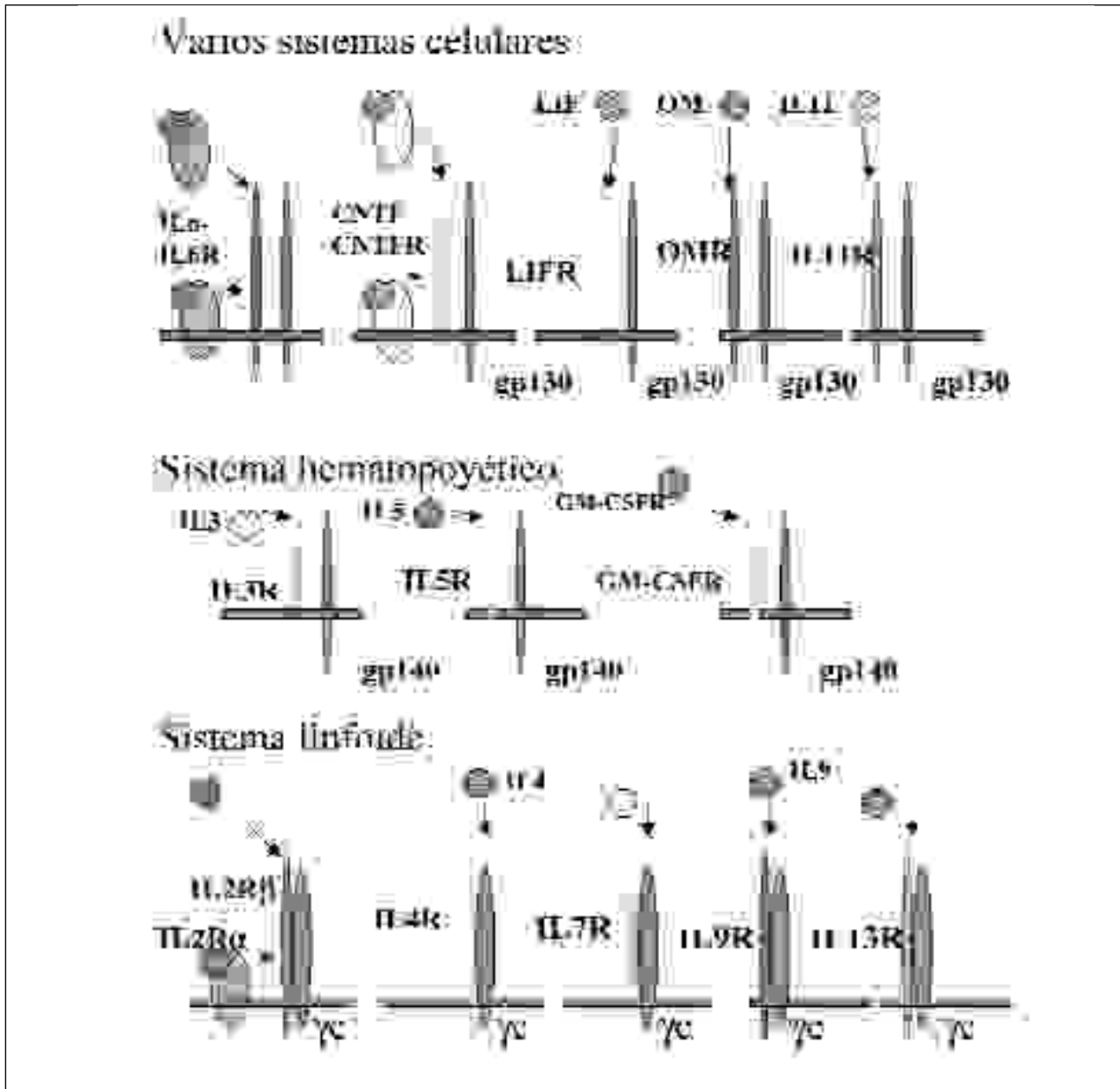


Fig. 2. Receptores de tipo I agrupados por el tipo de proteína de membrana plasmática transductora utilizada en la activación de rutas intracelulares. Los receptores para IL-6 y CNTF pueden encontrarse en forma soluble.

(2) la activación de proteínas con actividad tirosina quinasa, denominadas JAK (Janus Kinase), consistente en la fosforilación de forma cruzada de éstas proteínas (autofosforilación), (3) la fosforilación de los receptores por JAKs en determinados restos tirosina, creándose sitios de reconocimiento para proteínas con dominios SH2, (4) la interacción con el receptor de otras proteínas con dominios SH2 (fundamentalmente proteínas STAT; ver más adelante), y (5) la fosforilación y consecuente activación de estas proteínas STATs por las JAK. Las proteínas STATs (Signal Transducer and Activators of Transcription) activadas pueden formar homodímeros o heterodímeros y translocarse al núcleo celular. Mediante su unión a secuencias específicas de los promotores génicos o bien mediante su interacción con otros facto-

res transcripcionales, pueden modular la expresión génica de la célula diana (9-11).

La característica común de todas estas citoquinas es su capacidad de activar a uno o más miembros de la familia de las JAK (Janus Kinase). Se conocen cuatro quinasas en esta familia: JAK1, JAK2, JAK3 y tyk2; todas tienen actividad tirosina quinasa y masas molares comprendidas entre 125 y 135 kDa. Estas quinasas presentan unas características estructurales comunes, presentando siete dominios conservados de entre los cuales destacan dos dominios tirosina quinasa de los cuales tan solo uno es funcional. La activación de estas quinasas por las citoquinas de tipo I suele ser dependiente de la molécula transductora; así los miembros de la familia gp140 activan a JAK2, los de la familia -C activan a

JAK1 y JAK3, mientras que los de la familia gp130 activan a JAK1, JAK2 y tyk2. Estudios más recientes sugieren que la especificidad de la ruta de transducción activada por cada citoquina reside en el reconocimiento por las proteínas STATs de los restos fosfotirosina de cada receptor. Por ejemplo, en linfocitos, STAT 4 reconocería con mayor afinidad al receptor de IL-12 y al de IFN γ (12), mientras que STAT 6 interactuaría de forma eficiente solo con los receptores de IL-4 o IL-13 (13, 14). Por el contrario, las proteínas STAT 1, 3, 5A y 5B pueden resultar activadas por gran variedad de ligandos.

La fosforilación del receptor permite la interacción de éste con otras proteínas, además de las STATs, que contengan dominios SH2, como es el caso de Shc, proteína adaptadora, que tras su asociación con GRB2 está implicada en la activación de Ras, que puede a su vez activar la ruta de las MAPK (15). Otras proteínas que pueden ser activadas, a través de sus dominios SH2, por los receptores de citoquinas son la subunidad reguladora de la enzima fosfatidil-inositol 3-quinasa (16) y la fosfatasa de células hematopoyéticas HSP (17,18). De igual forma, algunos receptores de citoquinas pueden interactuar con otras proteína quinasas como Lyn, Lck o Fyn, para el caso del receptor de IL-2 (19),

Por su parte, las proteínas STAT al fosforilarse pueden homo- o heterodimerizar y translocarse al núcleo

donde, tras el reconocimiento de elementos de respuesta específicos, pueden modular la transcripción génica. En la actualidad se han clonado 7 proteínas distintas con elevada homología entre ellas. Están compuestas por aproximadamente 800 aminoácidos y presentan una serie de dominios invariables: dominio de unión al ADN, dominio de dimerización, dominio SH2, dominio SH3. Algunas además (STAT-1) presentan la capacidad de interacción con proteínas coactivadoras de la transcripción del tipo CBP/p300. Todas las proteínas STAT presentan próximo al extremo carboxilo terminal un resto de tirosina susceptible de fosforilación por las proteínas JAK. La fosforilación de dicho residuo crea en el monómero STAT un sitio de reconocimiento SH2 que puede ser reconocido por otra proteína STAT para la formación de homo- o heterodímeros, los cuales son competentes para interactuar con los elementos de respuesta en el ADN.

Un ejemplo de este tipo de activación múltiple lo supone la fosforilación de STAT 3 en células T, donde la interacción de IL-2 con su receptor controla la progresión de la fase G1 a S, la expansión clonal y la diferenciación funcional. La interacción de IL-2 con sus receptores supone la activación de JAK1 y JAK3 y la consecuente fosforilación de STAT3 en su residuo Tyr-703 (Figura 3). Por otra parte, la fosforilación del receptor de IL-2 (cadena β) favorece su interacción con Shc y la consecuente activación de Ras, que conduce a la fos-

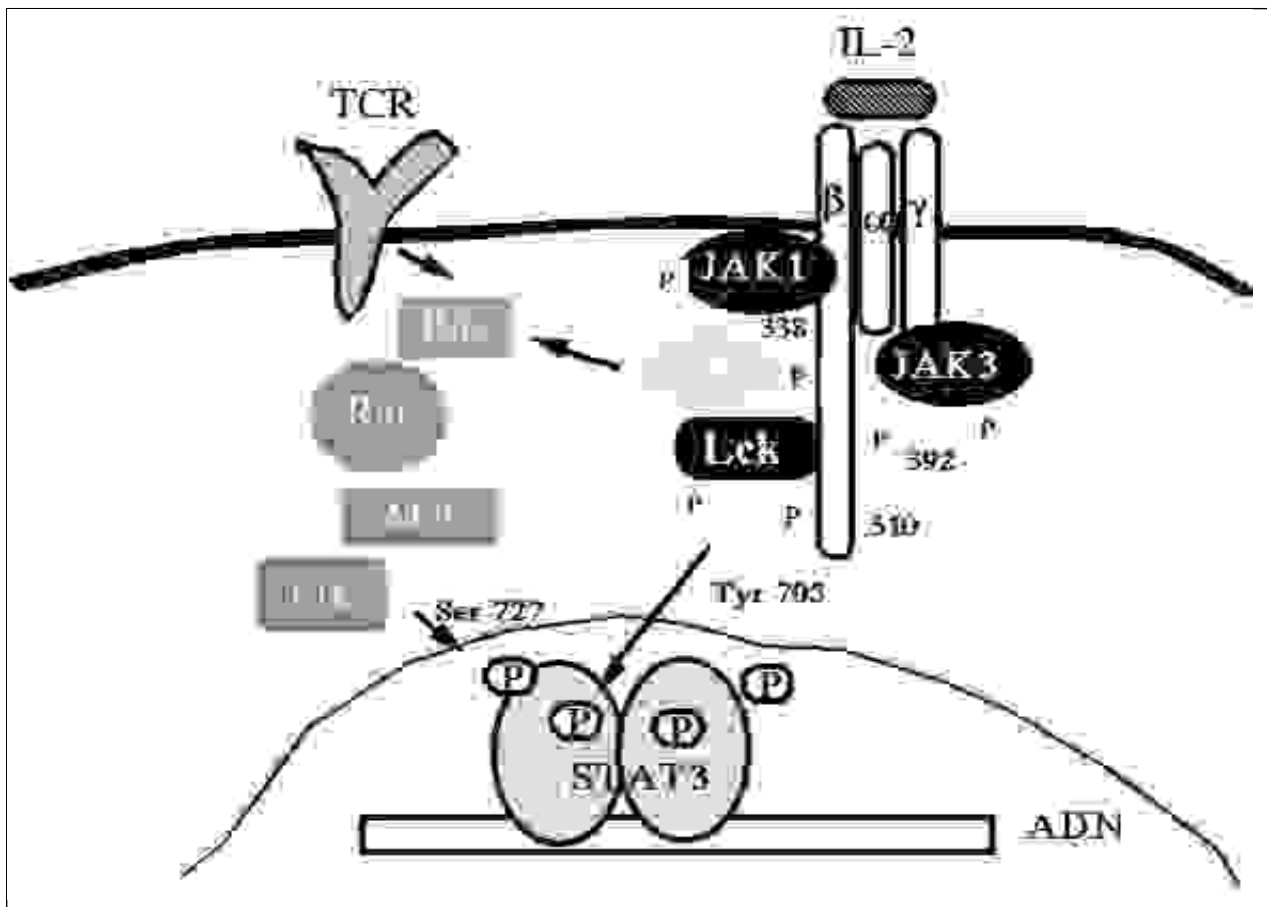


Fig. 3. Convergencia de rutas en la regulación de STAT3 en células T. Ver texto para más detalles.

forilación de STAT3 en su residuo Ser-727, proceso mediado por las ERKs (Extracellular Regulated Kinases). Esta segunda ruta que lleva a la fosforilación del residuo de serina también puede desencadenarse por el receptor de la célula T (TCR) (20).

RECEPTORES DE TIPO II

Los interferones se clasificaron inicialmente por el tipo de célula productora como interferones de leucocitos, de fibroblastos o inmunes. La nomenclatura actual se basa principalmente en su secuencia; y así designa a los interferones de leucocitos como IFN- α e IFN- β , a los de fibroblastos como IFN- γ y a los de tipo inmune como IFN- δ . En humanos, hay al menos 18 genes no alélicos de interferon- α , de los cuales cuatro de ellos son pseudogenes, y al menos 6 de IFN- β (cinco de ellos pseudogenes). Estos genes, junto con el único gen IFN- γ forman un grupo en el brazo corto del cromosoma 9 y se caracterizan por la ausencia de intrones. El único gen de IFN- δ presenta 3 intrones y se localiza en el cromosoma 12, siendo producido únicamente por linfocitos, células T y NK (21). Los IFN- α y β comparten el mismo tipo de receptor mientras que los IFN- γ presentan un receptor específico. El último componente de esta familia lo constituye la IL-10. Al igual que las citoquinas nombradas en el apartado anterior, los IFNs y la IL-10 modulan sus principales efectos a través de la activación de JAK, siendo dicha activación también selectiva, ya que IFN- α / β activan preferentemente JAK1 y tyk2, IFN γ activa a JAK1 y JAK2 e IL-10 activa a tyk2.

Las proteínas de la familia de los IRF, tales como IRF2 (22), ICSBP (23), e ICSAT (24), se unen a los elementos de respuesta a interferón y regulan de forma negativa la expresión de los genes asociados. Estos represores pueden ayudar a prevenir la expresión de los genes estimulados por interferón en la ausencia de señalización por interferón, así como también modular la respuesta cuando se produzca la activación de los procesos celulares inducidos por los interferones. El tratamiento de muchos tipos celulares con interferón en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas prolonga la transcripción de genes estimulados por interferón, lo cual indica que algunas de las proteínas inducidas por el interferón pueden controlar de forma negativa la respuesta celular.

Por otra parte, la cantidad de proteína STAT1 activa puede regularse además por varios procesos, tales como la desfosforilación (25) o la degradación mediada por el proteosoma (26).

FUNCIONES INDUCIDAS POR LOS INTERFERONES

Los interferones están implicados en el desencadenamiento de procesos celulares que afectan la supresión del cáncer y la infección. En general, pueden hacerse cuatro grandes apartados: funciones antivirales, inhibición de la proliferación celular, control de la apoptosis y modulación del sistema inmune.

ACTIVIDAD ANTIVIRAL

La capacidad de los interferones para conferir un estado antiviral a las células fue la característica que permitió su descubrimiento. Los interferones son esenciales para la supervivencia de los vertebrados dado que suministran una primera línea de defensa contra las infecciones virales, que se establece desde horas a días antes que se desarrollen las respuestas inmunes. Este papel de los interferones se ha puesto de manifiesto mediante experimentación en ratones transgénicos que carecen de la expresión de los receptores celulares para interferones (27). A lo largo de la evolución han emergido múltiples y a veces redundantes mecanismos para combatir la infección viral. Al mismo tiempo los virus han desarrollado varios mecanismos compensatorios para defenderse de la respuesta celular. Cualquier estado en el desarrollo replicativo viral puede ser bloqueado por los interferones (28), desde la entrada a la célula (retrovirus), la transcripción (virus de la influenza, virus de la estomatitis vesicular), estabilidad de los ARN (picornavirus), iniciación de la traducción (reovirus, adenovirus, vaccinia) o de la maduración proteica, ensamblaje y liberación de las partículas virales (retrovirus).

Las rutas celulares antivirales inducidas por interferones mejor caracterizadas utilizan a la proteína quinasa dependientes de ARN de doble cadena (PKR), el sistema 2-5A, y las proteínas Mx. La PKR es una serina-treonina quinasa con múltiples funciones en el control de la transcripción y la traducción proteica (29). Esta enzima normalmente se encuentra en estado inactivo pero tras la unión de ARN de doble cadena, sufre un proceso de autofosforilación y la subsecuente activación produciendo la fosforilación de substratos, de forma ya independiente al ARN de doble cadena. El reconocimiento del ARN por la PKR se produce a través de dos motivos proteicos bien conservados en la mitad reguladora amino terminal de su estructura. Dicho reconocimiento se produce por la conformación del ARN sin que medie la secuencia de bases de sus cadenas y provoca un cambio conformacional en la PKR de forma que activa el dominio catalítico. El efecto antiviral de la PKR se debe a su capacidad de fosforilar la subunidad alfa del factor de iniciación proteico eIF2. Esta fosforilación da como resultado la formación de un complejo inactivo de dicho factor que promueve una rápida inhibición de la traducción. Como se discutirá más adelante el proceso apoptótico puede también estar implicado en los procesos antivirales de la PKR. La sobreexpresión de esta enzima conduce a la supresión de la replicación del virus de la encefalomiocarditis en células en cultivo.

El sistema 2-5A es un mecanismo multienzimático mediante el cual ciertas 2-5A sintetasas inducibles por interferones, resultan estimuladas por ARN de doble banda, usualmente de origen viral, para producir una serie de 2',5'-oligoadenilatos (2-5A) que activan a la ARNasa L (30,31). La activación de esta ruta conduce a la rotura, mediante su actividad ribonucleásica de ARN de cadena sencilla. Las sintetasas 2-5A, de las cuales se han caracterizado unos 7 tipos distintos que oscilan des-

de 40 a 100 kDa, son codificadas por múltiples genes que residen en diferentes partes de la célula (32-35). Los oligoadenilatos se unen a la ARNasa L que normalmente se encuentra en forma monomérica e inducen la formación de homodímeros que conduce a su activación (36,37). El dominio amino terminal de estas proteínas presenta una función represora y contiene nueve repeticiones de tipo anquirina que están implicadas en el reconocimiento y unión de los oligoadenilatos. El dominio carboxi-terminal consta de una región de homología a proteína quinasas, un dominio rico en cisteína y el dominio con actividad ribonucleasa. Las funciones del sistema 2-5A se han explorado mediante la manipulación genética de la ARNasa L. Así células que expresan un derivado dominante negativo de esta proteína eran incapaces de desarrollar las capacidades antivíricas y antiproliferativas inducidas por interferones, mientras que la sobreexpresión de la ARNasa L bloquea la replicación de virus tales como el HIV-1 o el de vaccinia (38-41). La capacidad de la ARNasa L de ser activada por pequeñas moléculas abre la posibilidad de diseño y desarrollo de drogas específicas.

Las proteínas Mx son GTPasas de 70 a 80kDa de masa molar, relativamente abundantes y pertenecen a la superfamilia de la diyamina (42,43). Estas proteínas se auto-ensamblan formando complejos oligoméricos tanto en sistemas libres de células como en células intactas e interfieren con la replicación viral impidiendo el crecimiento de virus como el de la influenza, a nivel fundamentalmente de la transcripción viral. La proteína MxA humana inhibe el crecimiento de los virus de sarampión, parainfluenza tipo 3 y otros virus ARN de cadena negativa. En general se considera que las proteínas Mx interfieren el tráfico celular o la actividad de las polimerasas virales.

En los últimos años se han puesto de manifiesto múltiples mecanismos mediante los cuales los virus se defienden no solo de las defensas inmunológicas en general, sino también de los sistemas de interferones. En ambos casos, los virus han desarrollado mecanismos para saltarse las defensas del organismo que consisten en la síntesis de proteínas capaces de imitar o de interferir las funciones de las proteínas antivíricas; así, por ejemplo, la síntesis de receptores de interferones por poxvirus, de proteínas inhibitoras de la actividad RNAasa L por el virus de la encefalomiocarditis (44), de ARN capaz de inhibir la actividad PKR, como es el caso de adenovirus (45) o de proteínas capaces de inhibir la actividad PKR mediante una interacción directa, como el caso de la proteína TAT de HIV (46). La muerte celular en respuesta a una infección viral puede ser mediada por apoptosis o por necrosis. En ciertos casos, poxvirus y virus de sarcoma de Kaposi, se sintetizan proteínas virales que son capaces de bloquear el proceso de muerte celular inducido por interferones en respuesta a la infección viral, suprimiéndose el suicidio celular y la respuesta inflamatoria (47,48). Finalmente, existen estrategias virales que consistentes en bloquear la acción de los interferones a nivel transcripcional, como las proteínas E6 y E7 del virus de papiloma humano o la proteína E1A de adenovirus (49,50).

CRECIMIENTO CELULAR Y APOPTOSIS

Si bien, hasta el momento, no se ha descrito la existencia de genes modulados por IFN que afecten directamente la actividad proliferativa celular, los IFNs pueden modular algunos de los componentes específicos de la maquinaria de control del ciclo celular. Así, el IFN α mediante la inhibición en la actividad del factor de transcripción E2F, inhibe la transcripción del proto-oncogen c-myc (51). En otros tipos celulares, el tratamiento con IFNs modula el estado de fosforilación de pRB, mediante la supresión de ciclina D3, impidiendo la activación de cdk-2-ciclina E y la fosfatasa cdc25A (52). En general, los mecanismos de supresión de crecimiento utilizados por los IFNs son diferentes a los utilizados por otras citoquinas inhibitorias, como el TGF- β , ya que no parece que impliquen la inducción de inhibidores de cdk, tales como p21, p27 o p57.

Con respecto al proceso apoptótico, los IFNs pueden tener acciones contrapuestas dependiendo del tipo celular y del grado de diferenciación. Así, por ejemplo, el IFN γ puede inducir o inhibir la apoptosis de células B no diferenciadas o de células B de leucemia linfocítica crónica (53,54). Los estudios realizados sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales los IFN inducen la apoptosis se han centrado en la implicación de las enzimas antivirales, tales como la PKR (55) y la RNAasa L (56) o la identificación de otras proteínas relacionadas con la ruta apoptótica. Así, se han clonado varios genes que, cuando se afecta a su expresión, quedan suprimidas las actividades apoptóticas o antiproliferativas de los IFNs (57-64). El bloqueo de la expresión de estos genes, denominados DAP (Proteínas Asociadas a Muerte), mediante oligonucleótidos antisentido, bloquea la actividad apoptótica, pero no el efecto citostático de IFN α .

SISTEMA INMUNE

Esta bien establecido que los IFNs pueden afectar prácticamente a todas las fases de las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas. Mientras que el IFN α producido en respuesta a estímulos inmunes o inflamatorios, activa el desarrollo y las acciones de las células inmunes efectoras, los IFN β / γ actúan fundamentalmente promoviendo los procesos celulares que suministran al huésped con mecanismos inmunes adaptativos para resistir la infección. Así, todos los interferones son capaces de regular la expresión de proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, promoviendo, por tanto, el desarrollo de las células T CD8+, pero solo el IFN γ es capaz de inducir la expresión de proteínas MHC de clase II, facilitando la respuesta de células T CD4+ (65). Los interferones también están implicados en la regulación de la expresión de varias de las proteínas requeridas en la generación de péptidos antigénicos. El IFN γ modifica la actividad de los proteosomas regulando la expresión de componentes tanto enzimáticos como no enzimáticos, incrementando de esta forma la cantidad y el reper-

torio de péptidos que pueden asociarse con proteínas MHC de clase I (65, 66).

Otro de los efectos bien caracterizados de IFNs se centra en el proceso de activación de macrófagos. Estas células juegan un papel central tanto en las respuestas inmunes adaptativas como innatas. Para ello deben de sufrir el proceso de activación que consiste en una serie de cambios reversibles, a nivel bioquímico y estructural, y que les confieren la actividad citocida (67). Dicha activación, que es conseguida por IFN pero no por IFN / consiste en una variedad de mecanismos de entre los que destacan la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (68).

Finalmente, los IFNs también están implicados en la regulación de la inmunidad humoral, pudiendo realizar dicha modulación de forma indirecta, mediante la promoción y desarrollo de determinados tipos de células T o directamente sobre las células B. En este caso, los IFNs actúan regulando tres de las funciones especializadas de las células B: desarrollo y proliferación, secreción de inmunoglobulinas y el cambio de cadena pesada de las inmunoglobulinas (69,27).

RECEPTORES DE LA FAMILIA TNF/NGF

El TNF alfa y la linfoxina o TNF beta, los productos respectivos de macrófagos y células T activadas están implicados en la mediación primaria de la regulación inmune y la respuesta inflamatoria, habiéndose claramente demostrado la implicación del TNF en procesos tales como el shock séptico y ciertos desordenes autoinmunitarios. (70). Desde la clonación de sus dos tipos de receptores, P75 y P55, se han ido identificando numerosas proteínas que se han agrupado en la familia de receptores del TNF. Las respuestas celulares distintas pero a veces solapadas que producen dichas proteínas claramente definen redes reguladoras y de desarrollo que implican prácticamente a la totalidad de tipos celulares si bien son más representativas de los sistemas linfoides y hematopoyético.

Los receptores, con dos excepciones, son proteínas de membrana con elevada homología de secuencia en sus regiones extracelulares (71). Las excepciones son las proteínas T2 y A5-3R que son productos génicos de poxvirus tratándose de formas solubles de receptores de TNFalfa (72). Estas proteínas funcionan acomplejando y, por consiguiente inactivando las moléculas de TNF producidas por el huésped. La proteína T2 es claramente una forma adquirida del receptor celular P75, mientras que la proteína A5-3R dado que solo une a TNFalfa y presenta menor homología de secuencia, puede tratarse de un tercer tipo de receptor para el TNF. La virulencia del poxvirus myxoma que causa la muerte del huésped (conejo) queda reducida cerca del 50% cuando el huésped queda infectado por virus recombinantes donde el gen T2 fue inactivado (73). Dicho producto también se ha encontrado posteriormente en el genoma de la viruela para humanos (74).

El motivo canónico de todos los receptores de esta familia lo constituyen varias pseudorepeticiones ricas

en cisteína, formadas por unas 6 cisteínas dentro de una secuencia de 40 aminoácidos (figura 1).

Los ligandos tras la activación de sus respectivos receptores pueden inducir respuestas biológicas pleiotrópicas, tales como la diferenciación, proliferación, activación o muerte celular. Sin embargo, resulta evidente que la inmunidad mediada por las células T, particularmente aquella dirigida por antígeno y dependiente de contacto celular, es el paradigma de la forma de actuación de los complejos receptor-ligando (75).

El TNF es una citoquina pleiotrópica que funciona como un mediador de la regulación inmune, la respuesta inflamatoria y la apoptosis en algunos tipos celulares. Un exceso en la producción de TNF se ha ligado al desarrollo de ciertas enfermedades tales como el shock séptico y ciertos desordenes autoinmunes. Las respuestas celulares promovidas por el TNF se inician mediante su interacción con dos tipos distintos de receptores celulares, el receptor de tipo I (55 kDa) y el de tipo II (75 kDa). Ambos tipos de receptores forman parte de la familia de receptores del TNF entre cuyos miembros se incluyen el antígeno Fas (inductor de apoptosis, también llamado Apo-1 o

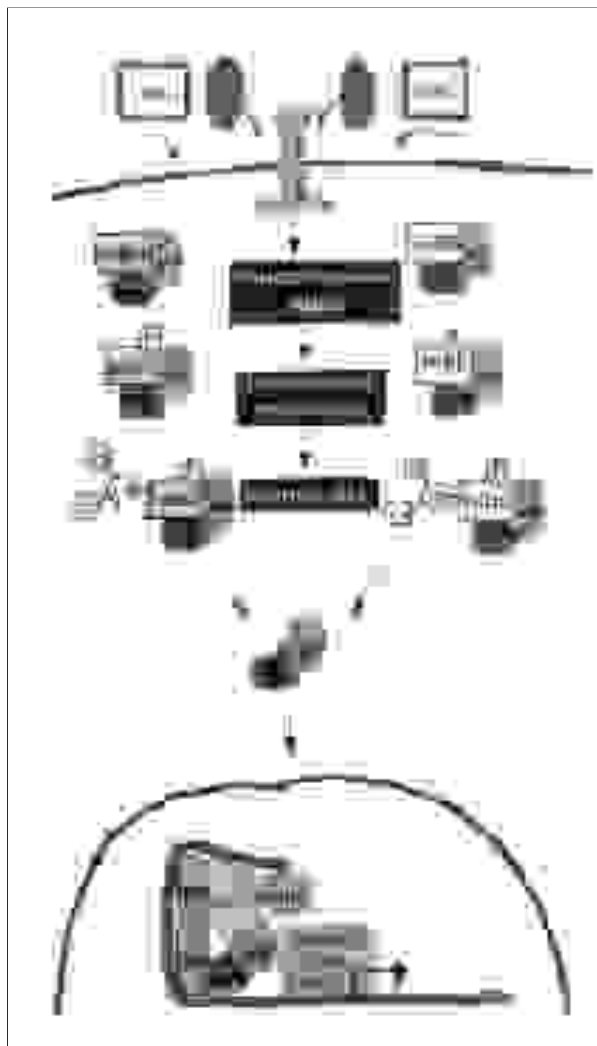


Fig. 4. Señalización en la activación del factor NF-kB.

CD95), CD27 (antígeno de activación de células T), CD30 (marcador del linfoma de Hodgkin) y CD40 (antígeno de células B), los cuales comparten la característica de secuencias ricas en cisteína en sus dominios extracelulares (figura 1). Esta familia de citoquinas generan respuestas celulares que incluyen la diferenciación, la proliferación, la activación de NF- κ B y la muerte celular, promoviendo la agregación de monómeros de receptores. En general los dominios citoplasmáticos de esta familia de receptores carecen de dominios comunes, lo cual sugiere que pueden utilizar mecanismos distintos. La excepción ocurre con el receptor tipo I del TNF y el antígeno Fas, ya que ambos presentan en su extremo carboxilo terminal un dominio de aproximadamente 80 aminoácidos que se ha denominado "dominio de muerte". A los dominios citoplasmáticos de los receptores pueden asociarse dos familias de proteínas denominadas TRAF (Factores Asociados al Receptor de

TNF) y TRADD y que están implicadas en la transducción de la señal al núcleo (60). La activación de este tipo de receptores, además de las vías de quinasas consideradas de estrés (Jun quinasa, p38), conlleva la activación de dos procesos contrapuestos en la célula: la activación de caspasas, proteasas intracelulares que dirigen el proceso apoptótico, y la activación de los miembros de la familia del factor nuclear NF- κ B que, mediante la activación génica, actúa como un factor de supervivencia. NF- κ B consiste en homo- o heterodímeros de proteínas con capacidad de unión al ADN y que guardan gran homología con el proto-oncogen c-rel. En la mayoría de las células, existe en una forma latente, localizada en el citoplasma, unida a proteínas inhibitoras (colectivamente denominadas I κ B) que enmascaran su señal de localización nuclear. Las citoquinas que activan NF- κ B lo hacen induciendo la fosforilación de I κ B que dirige a estas proteínas a la degradación por el proteosoma (76) (Figura 4).

BIBLIOGRAFÍA

- Hilton, D.J., Gough, N.M. Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J. Cell. Biochem.* 1991; 46, 21-26.
- Kishimoto, T., Akira, S., Taga, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 1992; 258, 593-597.
- Rose, T.M., Bruce, A.G. Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88, 8641-8645.
- Baumann, H. Schendel, P. Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 1992; 266: 20424-20427.
- Yin, T., Miyazawa, K., Yang, Y.-C. Characterization of interleukin-11 receptor and protein tyrosine phosphorylation induced by interleukin-11 in mouse 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* 1992; 151, 2555-2561.
- Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C. et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 11924-11928.
- Darnell, J.E. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277: 1630-1635.
- Bazan, J.F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 6934-6938.
- Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle F.W., Yamamoto, K. et al. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem. Sci.* 1994; 19: 222-227.
- Darnell, J.E. The JAK-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances. *Rec Prog Horm Res* 1996; 51: 391-404.
- Kishimoto, T., Taga, T., Akira S. Cytokine signal transduction. *Cell* 1994; 76: 253-262.
- Cho S.S., Bacon, C.M., Sudarshan, C., Rees, R.C., Finbloom, D., Pine, R., O'Shea, J.J. Activation of STAT by IL-12 and IFN- α : evidence for the involvement of ligand-induced tyrosine and serine phosphorylation. *J. Immunol.* 1996; 157: 4781-4789
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Brousseau, M., McKnight S.L. An Interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science*, 1994; 265:1701-1706.
- Schindler, C., Darnell, J.E. Transcriptional responses to polypeptide ligands: The JAK-STAT pathway. *Ann. Rev. Biochem.* 1995; 64: 621-651.
- Sato, N., Sakamaki, K., Terada, N., Arai, K., Miyajima A. Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common beta subunit responsible for different signaling. *EMBO J.* 1993; 12: 4181-4189.
- Damen, J.E., Mui, A.L., Puil, L., Pawson, T., Krystal, G. Phosphatidylinositol 3-kinase associates, via its Src homology 2 domains, with the activated erythropoietin receptor. *Blood* 1993; 81, 3204-3210.
- Yi, T., Mui, A. L-F., Kristal, G., Ihle, J.N. Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 7577-7586.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Rajan T.V., Yi, T. et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 1993; 73: 1445-1454.
- Minami, Y., Kono, T., Yamada, K., Kobayashi, N., Kawahara, A., Perlmutter, R.M., Taniguchi, T. Association of p56lck with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2-induced activation of p56lck. *EMBO J.* 1993; 12:759-768.
- Ng, J., Cantrell, D. STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 24542-24549.
- Sen, G.C., Lengyel, P. The interferon system. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 5017-5020.
- Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimurak Y, Murayama M, et al. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 1989; 58: 729-739.
- Nelson N, Marks MS, Driggers PH, Ozato K. Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 588-99.
- Yamagata T, Nishida J, Tanaka S, Sakai R, Mitani K. Et al. A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSA/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. *Mol. Cell. Biol* 1996; 16: 1283-94.
- David M, Grimley PM, Finbloom DS, Laraner AC. A nuclear tyrosine phosphatase downregulates interferon-induced gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 7515-21.
- Kim TK, Maniatis T, Regulation of Interferon-g-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1996; 273: 1717-19.
- van der Broek MF, Muller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM. Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J. Virol.* 1995; 69: 4792-96.
- Vilcek J, Sen GC. In *Fields virology*, ed, BN Fields, DM Knipe, PM Howley, pp. 375-400. Philadelphia. Lippincott-Raven, 3rd ed.1996.
- Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, et al. Molecular cloning and characterization of the human Double-stranded RNA-Activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 1990; 62: 379-90.
- Kerr IM, Brown RE. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75: 256-60.

31. Silverman RH, Cirino NM. In mRNA Metabolism and Post-Transcriptional Gene Regulation, ed. DR Morris, JB Harford, 295-309. New York: Wiley & Sons, 1997.
32. Chebath J, Benech P, Hovanessian AG, Galabru J, Revel M. Four different forms of interferon-induced 2'-5'-oligo(A) synthetase identified by immunoblotting in human cells. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 3852-57.
33. Ghosh SK, Kusari, J, Bandyopadhyay SK, Samanta H, Kumar R, Sen GC. Cloning, sequencing, and expression of two murine 2'-5'-oligoadenylate synthetases. *J Biol Bhem* 1991; 266: 15293-99
34. Rutherford MN, Kumar A, Nissim A, Chebath J, Williams BRG, The murine 2-5A synthetase locus: three distinct transcripts from two linked genes. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 1917-24.
35. Marie I, Hovanessian AG. The 69-kDa 2-5A synthetase is composed of two homologous and adjacent functional domains. *J.Biol.Chem* 1992; 267: 9933-39.
36. Dong BH, Silverman RH. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:4133-37.
37. Cole JL, Carroll SS, Blue ES, Viscount T, Kuo LC. Activation of RNase L by 2'-5'-oligoadenylates. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 19187-92.
38. Hassel BA, Zhou AM, Sotomayor C, Maran A, Silverman RH. A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J.* 1993; 12: 32974-304
39. Dong B, Silverman RH. Platelet-derived Growth Factor-stimulated secretion of basement membrane proteins by skeletal muscle occurs by tyrosine kinase-dependent and independent pathways. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2236-42.
40. Sidrauski C, Walter P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing unfolded protein response. *Cell* 1997; 90: 1031-39.
41. Diaz-Guerra M, Rivas C, Esteban M. Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology* 1997; 227:220-28
42. Horisberger MA. Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152-S67-S71
43. Arnheiter H, Frese M, Kambadur R, Meier E, Haller O. Mx transgenic mice-animal models of health. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996; 206: 19-47.
44. Cayley PJ, Knight M, Kerr IM. Virus-mediated inhibition of the ppp(A2'p)nA system and its prevention by interferon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982; 104: 376-82
45. Jutahewski J, Schneider RJ, Safer B, Munemitsu SM, Samuel CE, et al. Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell* 1986; 45: 195-200
46. Roy S, Katze MG, Parkin, NT, Edery I, Hovanessian AG, Sonnenberg N. Control of the Interferon-induced 68 kDa protein kinase by the HIV-1 tat gene product. *Science* 1990; 247:1216-20.
47. Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Geenstreet TA, Sleath PR, et al. Viral inhibition of inflammation: Cowpox Virus encodes an inhibitor of the Interleukin-1b Converting enzyme. *Cell* 1992; 69: 597-604.
48. Tome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E. Et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 1997; 386:517-21.
49. Reich N, Pine R, Levy D, Karnell JE. Transcription of interferon-stimulated genes is induced by adenovirus particles but is suppressed by E1A gene products. *J. Virol.* 1988; 62: 114-19.
50. Ackrill AM, Foster GR, Laxton CD, Flavell DM, Stark GR, Kerr Im. Inhibition of the cellular response to interferons by products of the adenovirus type 5 E1A oncogene. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 4387-93.
51. Melamed, D., Tiefenbrun, N., Yarden, A., Kimchi, A. Interferons and interleukin-6 suppress the DNA-binding activity of E2F in growth sensitive hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 12: 5255-65.
52. Tiefenbrun, N., Melamed, D., Levy, N., Resnitzky, D., Hoffman I. et al., Alpha interferon suppresses the cyclin D3 and cdc25A gene, leading to a reversible G0-like arrest. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16: 3934-44.
53. Grawunder, U., Melchers, F., Rolink, A. Interferon-gamma arrests proliferation and causes apoptosis in stromal cell/interleukin 7-dependent normal murine pre-B cell lines and clones in vitro, but does not induce differentiation to surface immunoglobulin-positive B cells. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23:544-51.
54. Rojas, R., Roman, J., Torres, A., Ramires, R., Carracedo, J. Inhibition of apoptotic cell death in B-CLL by interferon gamma correlates with clinical stage. *Leukemia* 1996; 10: 1782-8.
55. Lee, S.B., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M. The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2, and involves ICE-like proteases. *Virology* 1997; 231: 81-88.
56. Zhou, A., Paranjape, J., Brown, T.L., Nie, H., Naik, S., et al., Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2'-5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J.* 1997; 16: 6355-63.
57. Deiss, L.P., Feinstein, E., Beressi, H., Cohen, O., Kimchi, A. Identification of a novel serine/theonine kinase and a novel 15 kD protein as potential mediators of the gamma interferon induced cell death. *Genes and Dev.* 1995; 9:15-30.
58. Deiss, L.P., Kimchi, A. A genetic tool used to identify thioredoxin as a mediator of growth inhibitory signals. *Science* 1991; 252:117-20
59. Kissil, J.L., Deiss, L.P., Bayewitch, M., Raveh, T., Khaspekov, G., Kimchi, A. Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-g-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 27932-36.
60. Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., Varfolomeev, E. The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20: 342-44.
61. Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., Kimchi, A. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, FAS/APO-1 and TNF-alpha. *EMBO J.* 1996; 15: 3861-70.
62. Levy-Strumpf, N., Deiss, L.P., Berissi, H., Kimchi, A. DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon-induced programmed cell death. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17: 1615-25.
63. Cohen, O., Feinstein, E., Kimchi, A. DAP-kinase is a Ca2+/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J.* 1997; 16: 998-1008.
64. Kissil, J.L., Feinstein, E., Cohen, O., Jones, P.A., Tsai, Y.C. y col. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 1997; 15: 403-7.
65. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 749-95.
66. York, I.A., Rock, K.L. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 369-96.
67. Adams, D.O., Hamilton, T.A. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 1984; 2: 283-318.
68. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Ann. Rev. Immunol.* 1997; 15: 323-50.
69. Snaper, C.M., Peschel, C., Paul, W.E. IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol* 1988; 140: 2121-27.
70. Beutler, B. Tumor Necrosis Factors: The Molecules and Their Emerging Role in Medicine (New York: Raven Press) 1992.
71. Smith, C. A., Farrah, T., Goodwin R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; 76: 959-962.
72. Smith, C. Davis, T., Wignall, J. Din, W. Farrah, T. Upton, C. McFadden, G. And Goodwin, R. T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176, 335-342.
73. Upton, C., Macen, J., Schreiber, M. And McFadden, G. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to tumor virulence. *Virology* 1991; 184, 370-382.
74. Schoenfeld, H., Poeschi, B., Frey, J., Loetscher, W., Hunziker, W., Lustig, A., and Zulauf, M. Efficient purification of Recombinant Human TNF-a from E. coli yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 1990; 266, 3863-3869.
75. Wallach, D. Cell death induction by TNF: a matter of self control. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 107-109.
76. Stancovski I., Baltimore, D. NF-kB activation: The Ikb kinase revealed. *Cell* 1997; 91: 299-302.