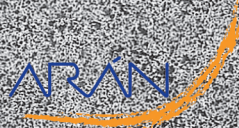
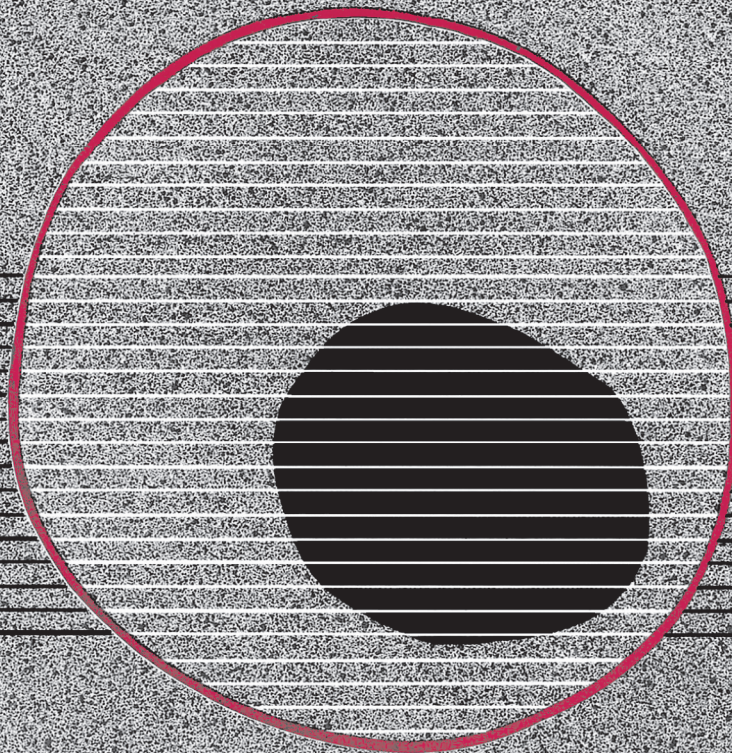


revisiones en

CANCER

ONCOGENES Y CÁNCER III

VOL. 13, NÚM. 3, 1999



revisiones en

CANCER

SUMARIO

VOL. 13

NÚM. 3

Importancia de la biología molecular en la práctica oncológica P. España, F. Bonilla, R. Cubedo	87
Transducción de señales mitogénicas y de diferenciación celular A. M. Martínez Valverde, M. Lorenzo	100
Receptores y factores de crecimiento tirosina-quinasa M. Lorenzo, A. M. Valverde	110
Carcinogénesis humana S. Ramón y Cajal	116
Moléculas de adhesión y cáncer E. Aranda Aguilar, J. R. De La Haba Rodríguez, I. C. Barneto Aranda	129

Importancia de la biología molecular en la práctica oncológica

P. ESPAÑA, F. BONILLA, R. CUBEDO

Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. Madrid

La biología molecular ha entrado a formar parte de la clínica médica recientemente. Desde finales del siglo pasado se conocía la asociación de algunos cambios cromosómicos con tumores malignos, pero las pequeñas alteraciones en la función de los genes no han podido conocerse hasta que la tecnología a nivel molecular ha permitido su identificación y ha estudiado su repercusión en el organismo humano. En 1976 D Stehelin (1) identificó la presencia de partículas de ADN similar al del virus del sarcoma aviar (de Rous) en el ADN normal de los pollos. Peyton Rous había descrito en 1911 (2) la transmisión de los sarcomas aviares por medio de inóculos de filtrados acelulares de sarcomas en animales sanos. El virus identificado posteriormente recibió el nombre de RSV o virus del sarcoma de Rous.

En menos de 25 años las técnicas de biología molecular se han comenzado a aplicar en un numeroso grupo de enfermedades humanas, utilizándolas tanto para el diagnóstico, como en la evolución de las enfermedades o en su tratamiento. De especial interés son las aplicaciones en Oncología donde juegan un papel fundamental en estudios de prevención, diagnóstico precoz, clasificación de los tumores, factores pronósticos, diagnóstico de la enfermedad residual y de la recaída de la enfermedad y también en la selección de los fármacos más eficaces en determinados tumores (Tabla I).

EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología molecular se está desarrollando extraordinariamente gracias al reconocimiento de genes específicos mutados en cánceres humanos. El examen de estos genes permite, en teoría, desentrañar la relación entre factores ambientales inductores y determinadas alteraciones genéticas. El ejemplo más ilustrativo es el del estudio de las distintas mutaciones de p53 relaciona-

TABLA I
APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN
ONCOLOGÍA

-
- Epidemiología
 - Diagnóstico histológico
 - Diagnóstico y tipificación de los síndromes linfoproliferativos
 - Diagnóstico precoz
 - Diagnóstico de la enfermedad residual
 - Pronóstico
 - Terapia génica
 - Normalización de la apoptosis
 - Reversión de multirresistencia a fármacos
 - Vacunas antitumorales
 - Vectores virales de muerte selectiva
 - Vehículos no víricos
 - Genes suicidas
 - Terapia antisentido
 - Modificación del efecto de la Radioterapia
 - Inhibición selectiva de objetivos moleculares
 - Diagnóstico predictivo
-

das con productos cancerígenos conocidos y que dan lugar a la aparición de cánceres concretos: aflatoxinas y cánceres de hígado, exposición al sol y cánceres de piel o benzopirenos y cáncer de pulmón (3,4). Estas tres relaciones parecen bien establecidas si aceptamos los criterios de Bradford-Hill sobre valoración de causas que incluyen la fuerza de la asociación (consistencia, especificidad y temporalidad), y de las razones biológicas. En el caso de las aflatoxinas ingeridas a través de los alimentos se ha observado que la exposición a AFB₁ produce mutaciones en el codón 249^{ser} (AGG → AGT) de p53 durante el proceso del desarrollo de hepatocarci-

nomas humanos, como se ha demostrado en estudios hechos en distintos países (5-7). La detección y cuantificación de los aductos carcinógenos (unión de mutágeno, carcinógeno o sus metabolitos y ADN) es un campo de gran interés en el terreno de la epidemiología, como utensilio de medida de la exposición al carcinógeno y para la valoración del riesgo de desarrollar el cáncer. En un trabajo prospectivo de casos-controles en carcinomas hepáticos, en Shanghai, se estudió la presencia de aductos de ADN - AFB₁ en la orina, encontrándose relación positiva con el riesgo de desarrollo posterior de hepatocarcinoma, riesgo que aumentaba si los individuos eran además seropositivos para el virus de la hepatitis B (8).

La exposición a los rayos UV de la luz solar puede causar cánceres de piel, tanto de células escamosas como de células basales, con una doble mutación característica de p53 (CC → TT), infrecuente en otros tipos de cánceres humanos (9). Estas mismas mutaciones pueden observarse en los cánceres cutáneos de enfermos con xeroderma pigmentoso (10) y en modelos de cultivos celulares y bacterianos expuestos a rayos UV (11).

En el cáncer de pulmón las mutaciones de p53 encontradas con mayor frecuencia, en relación con la exposición a benzopirenos del tabaco, se sitúan en los codones 157(GTC → TTC), 248(CGG → CTG), y 273. Otros aductos carcinógenos relacionados con el cáncer de pulmón son los PAH-ADN (hidrocarburos aromáticos policíclicos), que pueden detectarse en los tejidos donde se producen cánceres relacionados con el tabaco, como el de pulmón, vejiga o laringe y también en linfocitos (12). La medición de aductos de PAH en linfocitos y en células de lavados broncoalveolares pueden servir como marcadores (13) de exposición al carcinógeno y también para valorar la respuesta obtenida con diferentes quimiopreventivos. Los niveles de estos productos se modifican por factores nutricionales (β-caroteno y α-tocoferol) (14) y por factores genéticos de susceptibilidad como el fenotipo GSTM1 null (15).

Dando por válido que los factores ambientales son responsables de la mayor parte de los cánceres en humanos, los análisis moleculares pueden identificar y cuantificar esa relación y servir de base para diseñar estrategias de prevención o quimiopreención o para prevenir el desarrollo de los carcinomas invasores.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Con la llegada de las nuevas tecnologías de biología molecular se han modificado algunos de los métodos de clasificación tumoral histopatológica. Después de la inmunohistoquímica los patólogos han incorporado a sus métodos de estudio técnicas basadas en la biología molecular, con técnicas de hibridación que incluyen la hibridación *in situ* con técnicas de fluorescencia (FISH) y la PCR, aunque la mayor parte de los diagnósticos se realizan todavía mediante examen con las técnicas histológicas habituales (16), que mantienen su utilidad e identifican adecuadamente la gran mayoría de tumores

TABLA II (15)

<i>Tipo de tumor</i>	<i>Prueba diagnóstica</i>
Linfoma de células del manto	expresión de bcl1 t(11;14)(q13;q32)
Linfoma extranodal de la zona marginal	Reordenamientos del gen de inmunoglobulinas
Tumor intra abdominal desmoplástico de células pequeñas	t(11;22)(p13;q11.2-12)
Fibroblastoma de células gigantes	t(17;22)(q22;q13)
Tumor rabdoide cerebral	delección en 22q11.2
Mesotelioma	delección 1p, 3p, 22q
Sarcoma de Ewing, PNET, tumor neuroendocrino periférico	t(11;22)(q24;q12)
Tumores germinales	i(12p)
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11.2;q11.2)

humanos. Ejemplos característicos que han encontrado un sitio como método de diagnóstico tumoral se muestran en la tabla II.

El hallazgo de alteraciones idénticas en el gen *ews* ha servido para demostrar que el sarcoma de Ewing, los tumores neuroectodérmicos periféricos y el tumor de Askin son variantes morfológicas dentro de un mismo tipo de tumores (17); alteraciones por activación del mismo gen *ews* por fusión con otras proteínas como la WT1, ATF-1 y TEC, dan lugar a otros tumores de origen mesenquimal como el intra abdominal desmoplástico de células pequeñas redondas, el sarcoma de células claras o el condrosarcoma mixoide extra esquelético (18-20). Estos hallazgos han permitido una clasificación de un grupo de sarcomas agrupados bajo el nombre de "relacionados con EWS". La traslocación recíproca t(11;22)(q24;q12) se puede encontrar en más del 90% de los sarcomas de Ewing y en los tumores neuroendocrinos periféricos (21), tumor de Askin o estesioblastoma. La traslocación t(11;22)(p13;q12) es específica de los tumores desmoplásticos de células redondas y sus puntos de ruptura afectan a dos regiones cromosómicas conocidas por su relación con otros tumores, la 22q12 es el lugar del EWS (sarcoma de Ewing) y el 11p13 corresponde al gen WT1 (tumor de Wilms) y ambos genes están fusionados en estos tumores.

El diagnóstico diferencial entre mesotelioma maligno y adenocarcinoma del pulmón puede ser extremadamente difícil para los patólogos y para los clínicos tiene importancia para la decisión terapéutica y para el pronóstico de cada caso. Mediante técnicas de FISH se han podido observar delecciones de los cromosomas 1p, 3p o 22q en casos de mesotelioma, y que sirven para apoyar dicho diagnóstico frente al adenocarcinoma pulmonar y también frente a la hiperplasia mesotelial (22).

La presencia de una o más copias del isocromosoma del brazo corto del cromosoma 12, i(12p) se puede encontrar en el 80% de los tumores germinales tanto gonadales (testiculares u ováricos) como extragonadales.

Los sarcomas presentan con frecuencia alteraciones

específicas, entre las más interesantes por su repercusión clínica está la translocación entre el cromosoma Y y el 18, típica del sarcoma sinovial, que se puede ver tanto en el tumor original como en sus metástasis (23,24).

Diagnóstico y tipificación de los síndromes linfoproliferativos (SLP)

Hasta la llegada de las técnicas de biología molecular los análisis citogenéticos eran las únicas pruebas disponibles para la caracterización de los SLP después del estudio histopatológico. Las nuevas técnicas moleculares han aportado mayor rapidez y sensibilidad a la vez que permiten el estudio en todo tipo de tejidos, fresco, congelado o parafinado.

Las alteraciones más frecuentes en los distintos tipos de linfoma no Hodgkin han sido recogidas de forma muy sintética por Martínez Climent (25) y quedan reflejadas en la tabla III.

DIAGNÓSTICO PRECOZ

El diagnóstico precoz es una de las formas más eficaces para la reducción de la mortalidad por cáncer. Las técnicas de biología molecular facilitan la búsqueda de partículas específicas de las células tumorales, habitualmente proteínas, secretados en la sangre o en otros elementos corporales —orina, heces, esputo, etc.—. Para tener utilidad diagnóstica estas proteínas deben ser específicas de las células malignas y deben expresarse en estadios muy precoces de la enfermedad. Mutaciones bien estudiadas han sido las de *K-ras* en tumores digestivos. En el cáncer colorrectal se han encontrado alteraciones específicas en los codones 12,13 y 61 en el 50% de las muestras de heces de los tumores estudiados y en el 50% de los adenomas de tamaño mayor de 1 cm (26). También los cánceres pancreáticos exfolian células cuyo ADN puede estudiarse a partir de las heces mediante amplificación por PCR (27), pero su interés clínico y los medios para diferenciar los distintos tumo-

res digestivos que pueden ser origen de las células tumorales encontradas en las heces, deberán ser diluidos mediante nuevos estudios. La dificultad del aislamiento del ADN de las células del colon, en las muestras de heces, no ha permitido por el momento que esta práctica se haya extendido y por tanto es demasiado pronto para considerarlo marcador de diagnóstico precoz del cáncer de colon y recto.

En muestras de citología de orina se ha observado una delección del brazo corto del cromosoma 9, donde está localizado el gen supresor p16, y esta alteración era capaz de diagnosticar cáncer de vejiga o su recaída en el 95% de los casos estudiados (28,29).

Más recientemente, el desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido identificar ADN libre en el plasma de pacientes tumorales, con las mismas características que el ADN del tumor, por lo que pudiera ser útil como marcador tumoral (30).

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD RESIDUAL

El diagnóstico de la enfermedad mínima residual es un problema que ha centrado el interés de diversos grupos de investigadores, porque la permanencia de focos residuales de células tumorales se relaciona con mayor probabilidad de recaída y al mismo tiempo constituye una situación clínica peculiar, porque la reducida masa tumoral ofrece la condición adecuada para que las nuevas terapias con anticuerpos monoclonales específicos pudieran ser más eficaces. Recientemente se han publicado varios trabajos que describen pruebas altamente sensibles basadas en RT-PCR para la detección de células metastásicas en sangre periférica, médula ósea, tejidos, ganglios o bordes de piezas de resección quirúrgica. Con esta técnica se han podido detectar células tumorales con mutaciones específicas, iguales a las de los tejidos tumorales primitivos, en áreas donde no se había encontrado tumor empleando los métodos histopatológicos habituales. Este método ha sido utilizado en leucemias y linfomas buscando translocaciones específicas como BCR-ABL o PML-RAR, y en enfermos con tumores de cabeza y cuello, colon o pulmón, bus-

TABLA III

ALTERACIONES GENÉTICAS PRIMARIAS EN DIFERENTES LINFOMAS NO HODGKIN

	<i>Reordenamiento genético</i>								
<i>Histología</i>	<i>c-myc</i>	<i>BCL-1</i>	<i>BCL-2</i>	<i>BCL-6</i>	<i>+3q</i>	<i>BCL-3</i>	<i>PAX5</i>	<i>NMP/ALK</i>	<i>TCR</i>
Burkitt	100%	--	--	--	--	--	--	--	--
Folicular	--	--	90%	--	--	--	--	--	--
Del Manto	--	70-90%	--	--	--	--	--	--	--
Difuso célula G	<5%	--	20%	35%	--	--	--	--	--
Zona marginal	--	--	--	--	60%	--	--	--	--
LLCP-B / LLC-B	--	10%	--	--	--	5%	--	--	--
Linfoplasmocitoide	--	--	--	--	--	--	50%	--	--
Anaplásico Ki+	--	--	--	--	--	--	--	50%	--
LNH T	--	--	--	--	--	--	--	--	25-50%

Martínez-Climent JA (26).

cando mutaciones de TP53 o K-RAS. En pacientes con cáncer de cabeza y cuello se han detectado mutaciones de p53 en los márgenes quirúrgicos, aparentemente libres de tumor. En un estudio sobre 25 enfermos con ese diagnóstico y mutaciones de p53 que fueron tratados quirúrgicamente, con aparente resección completa, según los informe de Anatomía Patológica, se observaron mutaciones de p53, en alguno de los márgenes de 13/25 (52%) pacientes. Cinco de los 13 casos (38%) presentaron recaída local, mientras que ninguno de los pacientes con márgenes negativos por estudio de biología molecular, recayeron. También en ganglios en los que no se habían visto metástasis por métodos histopatológicos se observaron mutaciones en p53 (31), lo que confirma su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad residual.

En enfermas con cáncer de mama el estudio cuantitativo de CK-19 (citoqueratina 19) puede ayudar a detectar los casos con mayor probabilidad de progresión de la enfermedad (32).

Otra de las aplicaciones potencialmente interesante es la detección de células tumorales de melanoma en los ganglios extraídos mediante la técnica del ganglio centinela (33), con el fin de identificar enfermos con mayor riesgo de recaída y peor pronóstico y seleccionarlos como candidatos a tratamiento quimioterápico adyuvante.

GAGE es un marcador específico tumoral que puede ser de utilidad para la valoración de la persistencia tumoral tras tratamiento. No se encuentra en tejidos normales excepto en el testicular y se expresa en numerosos tumores, como el neuroblastoma, cáncer de mama, de pulmón, sarcomas, cáncer de colon o de tiroides y puede tener interés como marcador tumoral con valor pronóstico (34).

PRONÓSTICO

Las publicaciones sobre marcadores tumorales y su supuesto valor pronóstico son abundantes pero en la práctica clínica muy pocos de los factores estudiados han demostrado claramente su valor.

Tanto las mutaciones como las variaciones de la expresión de los genes ofrecen la posibilidad de ser empleadas clínicamente como marcadores de valor pronóstico y como predictor de la respuesta al tratamiento. Se han relacionado mutaciones en línea germinal del gen BRCA1 con la supervivencia de las enfermas (35), y pérdidas alélicas de su región cromosómica, 17q21, con mayor malignidad histológica (36). Tanto la amplificación de HER-2/neu como su sobreexpresión se han estudiado en mujeres con cáncer de mama como método de predicción de recaída. Los resultados han sido contradictorios. En varios trabajos se encontró que los niveles altos de HER2/neu correspondían a resistencia frente a la quimioterapia u hormonoterapia (37-39), mientras que otros estudios no encuentran esa relación (40-42).

Otros marcadores de valor pronóstico son las pérdidas en el brazo largo del cromosoma 18 o la expresión

anormal de DCC en los cánceres de colon (43,44) o a las deleciones en el brazo corto del cromosoma 1 y a la amplificación de N-MYC en los neuroblastomas (45).

FACTORES DE RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD AL TRATAMIENTO

Aunque la contribución de la apoptosis a la muerte celular inducida por quimio o radioterapia es materia de controversia, los estudios clínicos relacionan las mutaciones antiapoptóticas con fracaso en el tratamiento. Las mismas alteraciones genéticas que influyen en la apoptosis durante el desarrollo tumoral también modulan la sensibilidad frente a los fármacos o la resistencia a los mismos (46).

Los fármacos quimioterápicos sólo son eficaces cuando destruyen con mayor rapidez las células tumorales que las sanas circundantes, para lo cual se necesita que las células tumorales sean más sensibles a la apoptosis que las del tejido normal. Los mecanismos que inhiben la apoptosis tales como la falta de función de p53 o la sobreexpresión de bcl-2, her-2/neu, ras, c-jun, c-fos pueden producir resistencia a los fármacos quimioterápicos, que pudiera ser en muchos casos un fenómeno no adquirido sino relacionado con alteraciones producidas durante el desarrollo del tumor y que simultáneamente confieren resistencia a los fármacos.

El mecanismo de acción de muchos de los fármacos quimioterápicos empleados actualmente – doxorubicina, cisplatino, etoposido, ciclofosfamida, etc.- es a través de la inducción de apoptosis (47). En estos casos la apoptosis se produce por la inducción de la expresión de los “receptores de la muerte” como Fas/CD95 y CD95L(ligando), TNF (tumor necrosis factor), DR3, DR4 o DR5 que conducen a la activación de la vía de las caspasas, que está mediada por p53 (48). Se han hecho numerosos estudios de correlación entre p53 y pronóstico de la enfermedad o resistencia al tratamiento. En general la presencia de p53 nos hace pensar en un peor pronóstico y peor respuesta al tratamiento. Mutaciones específicas como p53His175 o p53His179 que parecen conferir resistencia frente a etoposido y concentraciones bajas de cisplatino (49). La búsqueda de estas mutaciones específicas de p53 puede tener utilidad clínica, permitiendo el reconocimiento de enfermos con resistencia a determinados fármacos. Mutaciones específicas de p53 que pueden tener interés en la práctica clínica las mostramos en la tabla IV.

En pacientes de Taiwan, con carcinoma pulmonar, se ha encontrado que polimorfismos en el codón 72 de p53 conferían peor pronóstico a los enfermos, especialmente si estos eran varones de entre 60-69 años y su tumor era de la variedad de células escamosas (50).

No se dispone por el momento de una técnica estandarizada para el estudio de p53. La técnica ideal debe ser rápida, fácil, realizable en muestras clínicas, barata, de alta sensibilidad y alta especificidad. Las técnicas más en uso, como las de inmunohistoquímica, tienen grandes fallos a la hora de discriminar entre niveles altos de p53 normal y proteína mutada y detectan un

TABLA IV
P53 MUTACIÓN Y TIPO DE CÁNCER

<i>Tumor</i>	<i>tipo de mutación</i>
Carcinoma escamoso de piel Hepatocarcinoma (aflatoxina)	cambio de bases codón 249 transversión G a T en el 3ª de bases
Cáncer de pulmón por radón Cáncer en relación con tabaco (esófago, cabeza - cuello)	2ª base del codón, G:T249 G:C a T:A
Tumores del tracto urinario Resistencia a etopósido, cisplatino	G:C a C:G p53His175,p53His179

gran número de alteraciones de p53 que luego no se demuestran en la secuenciación del gen.

La técnica de SSCP goza de gran aceptación; sus resultados son muy específicos pero poco sensibles y presenta una gran variabilidad entre observadores. El mejor método es la secuenciación del gen, aunque esta técnica es larga y costosa (51) por lo que se están buscando otros métodos eficaces pero más baratos, con lo que se puedan alcanzar los mismos resultados.

Los tumores con niveles altos de la proteína HER2 responden mejor al tratamiento con doxorubicina o otras antraciclinas que los tumores HER2 negativos y presentan en general mayor sensibilidad frente a la radioterapia. Hay datos que asocian la sobreexpresión de HER2 con aumento de la resistencia al tamoxifeno y a la ciclofosfamida. La cuantificación de HER2 puede ser un complemento de gran ayuda a la hora de decidir el tratamiento con o sin doxorubicina en mujeres con cáncer de mama, tanto en la indicación de tratamiento adyuvante como en el de la enfermedad diseminada. Su uso no se ha generalizado todavía, debido principalmente a la falta de estandarización de los diversos métodos para determinar HER2. Los dos principales métodos de determinación son inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (FISH) que detecta amplificación del gen. La inmunohistoquímica es más barata y más inconsistente, mientras que las técnicas FISH presentan menos variabilidad pero necesitan equipos especializados y más costosos. Es probable que la estandarización de los métodos se optimice en un plazo breve dado el interés clínico que se ha despertado con la aprobación del nuevo tratamiento con anticuerpos anti HER2, trastuzumab®, (herceptina).

La sobreexpresión de genes de la familia bcl-2 (bcl-xL, bax) provoca resistencia frente a un buen número de fármacos a través del bloqueo de la apoptosis (52). En protocolos de terapia antisentido contra bcl-2 se ha visto que existe una relación inversa entre quimiosensibilidad y niveles de bcl-2, sugiriendo que la bcl-2 endógena contribuye al estado de resistencia a fármacos y quizá se puedan obtener buenos resultados terapéuticos anulando su función.

En la cascada de acontecimientos que conduce a la apoptosis, intervienen entre otros elementos la activa-

ción de caspasas (proteasas cisteinil aspartato específicas), hecho que se ha aprovechado por los investigadores para preparar fármacos o productos que las activen para que éstas a su vez activen los receptores de las células tumorales sin activar los de las células normales (53).

TERAPIA GÉNICA

El conocimiento de parte de las alteraciones genéticas que participan en el desarrollo de los tumores malignos ha sugerido a los investigadores la idea de combatir la enfermedad a nivel molecular, tratando de reemplazar genes defectuosos o ausentes, o de contrarrestar los efectos de la sobreexpresión de proteínas que facilitan la aparición o el crecimiento del tumor. El empleo de la terapia génica para el cáncer no tiene una base conceptual firme; inicialmente se pensó que las enfermedades con mayor probabilidad de beneficiarse con este tratamiento serían las debidas a un defecto monogénico y no tanto el cáncer que es una enfermedad poligénica, en la que se precisa la mutación de varios genes para que el tumor se desarrolle, y en la que desconocemos por el momento muchas de las mutaciones que conducen a su aparición y progresión. Los nuevos genes deben introducirse de forma repetida a lo largo de toda la vida excepto que se consiga, por medio de la perpetuación del nuevo gen, su transducción en las células progenitoras como las de la médula ósea (54).

La terapia basada en objetivos moleculares tiene diversos enfoques que se exponen a continuación.

Normalización de la apoptosis

Los genes supresores de tumores y especialmente p53 son una diana clave en el tratamiento de los tumores. La forma de restituir su función puede ser bien reemplazando el gen mutado o bien imitando o suplantando su función por medio de otras moléculas. Homólogos de p53 son p63 y p73. La existencia de una vía de apoptosis mediada por estos homólogos puede explicar el que ratones sin p53 puedan alcanzar un desarrollo normal durante algún tiempo, pero desconocemos de que forma interactúan con p53 (55).

La introducción de una copia normal de p53 en cultivos celulares con alelos mutantes de este gen consigue detener el crecimiento celular e inducir la apoptosis, pero los intentos de reproducir estos resultados en tumores humanos se encuentran con la dificultad de transferencia de las copias normales a cada uno de las células tumorales, que pueden estar diseminadas por todo el organismo.

Los estudios realizados hasta ahora han mostrado escasa toxicidad a corto y largo plazo y gran capacidad de transferencia y expresión en las células tumorales, tanto si se usan vectores víricos como vectores no víricos. Se han observado regresiones tumorales con protocolos que emplean técnicas diferentes, unas basadas en ADN recombinante y otras en terapia génica, de reem-

plazo de genes, aunque la distinción entre las dos formas es académica. Las respuestas no han sido muy elevadas pero debido a la escasa toxicidad de los productos, se piensa que pueden ser y es aconsejable probarlas en enfermos con cánceres menos avanzados para valorar apropiadamente su eficacia (56).

Reversión de la multirresistencia a fármacos (MRD)

La resistencia a un conjunto de diversos fármacos quimioterápicos está relacionado con una sobreexpresión de la glicoproteína P (Pgp), que se encuentra en tejidos tumorales y también en tejidos sanos y que es codificada por el gen *mdr1* y cuya expresión puede modificarse mediante dosis bajas, por debajo de las empleadas terapéuticamente, de fármacos como la mitomicina C o el cisplatino y que podrían ser útiles como moduladores de la resistencia a otros fármacos empleados como segundos agentes citotóxicos (57).

Desde hace casi 20 años se trabaja en experimentos que puedan revertir la MRD especialmente a través de la inhibición de Pgp. Resultados prometedores se han observado en enfermos con cáncer de pulmón, empleando dosis bajas de ciclosporina además de la quimioterapia estándar (58).

Anticuerpos (Ac) monoclonales contra genes sobreexpresados

En 1975 Hóhler y Milstein recibieron el Premio Nobel por el descubrimiento de la producción de anticuerpos monoclonales. La nueva tecnología molecular ha abierto un nuevo camino terapéutico que ha conducido a la elaboración de nuevos productos que ya están siendo usados en la clínica para el tratamiento de linfomas, (anti CD-20), o cánceres de mama (anti HER2/neu). Estos anticuerpos, y los 17-1A y anti erb-B que están en fase avanzada de investigación para tratamiento del cáncer de colon y de gliomas malignos, son los primeros representantes de un nuevo grupo con mecanismo de acción diferente al de los quimioterápicos clásicos.

Para conseguir la mayor eficacia de los Ac Monoclonales es preciso que existan 1) antígenos específicos asociados al tumor, 2) que la unión antígeno – anticuerpo sea estable, 3) que no exista respuesta inmune o que ésta sea mínima, y 4) que puedan aportar una potente actividad citotóxica. Para aumentar su eficacia pueden conjugarse con partículas radioactivas como ^{131}I o ^{90}Y , que producen localmente su efecto transportadas y conducidas al lugar necesario mediante los anticuerpos específicos (59).

En 1998 se aprobó en España el primer anticuerpo monoclonal para tratamiento del cáncer, fue el Ac antiCD-20, rituximab. La presencia de antígeno CD20 no se puede medir serológicamente porque no es excretado por las células y no circula en la sangre de los enfermos, por lo que su determinación debe realizarse en los tejidos tumorales mediante técnicas de inmu-

nohistoquímica. Rituximab®, es un Ac quimérico (humano-murino) que se une al antígeno de diferenciación CD20, que se encuentra en más del 90% de los linfomas no Hodgkin de células B y es capaz de inducir la apoptosis de las células tumorales. Ha mostrado su utilidad tanto en linfomas de bajo grado como en los de grado alto y su eficacia mejora cuando se asocia a quimioterápicos.

El desarrollo de trastuzumab® (Herceptin) ha sido posible gracias a las técnicas de biología molecular. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado contra el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento HER2/neu, que induce la diferenciación de las células, disminuyendo la tasa de crecimiento del tumor, y que se está empleando en enfermas con cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de HER2/neu. En enfermas que han recaído después de tratamiento quimioterápico, se han apreciado 15%- 62% de respuestas, algunas de ellas completas (36% en el trabajo de Slamon), con una supervivencia media de 13 meses. En pacientes que recibieron doxorubicina junto con el anticuerpo se observó toxicidad cardíaca grado 3-4 en un 18%, porcentaje superior al que se encuentra en enfermas tratadas con poliquimioterapia que contiene doxorubicina. El porcentaje de respuestas fue mayor en el grupo tratado con la combinación de fármacos (60-63). Al igual que ocurre con el anti CD-20, el anti HER2/neu es más eficaz combinado con quimioterapia especialmente con taxol.

Vacunas

La existencia de antígenos específicos tumorales, codificados por genes, es la base de las vacunas tumorales. Las vacunas se producen bien a partir de células tumorales completas, de extractos enteros o bien de extractos purificados. Uno de los elementos más estudiados para la elaboración de vacunas antitumorales es el gangliósido GM2, que se encuentra en la membrana celular de un gran número de células del melanoma y en tejidos normales como el sistema nervioso central. Otro gangliósido en fase de investigación es el GD3.

Uno de los aspectos negativos de las vacunas es la presencia de gangliósidos en tejidos normales, que podrían ser dañados y ocasionar toxicidad importante, aunque los investigadores creen que si la respuesta antitumoral es buena, la disminución de la toxicidad podría alcanzarse introduciendo algunas modificaciones.

Más interesantes parecen las proteínas intracelulares que se expresan en la superficie celular en forma de pequeños péptidos y se unen a los complejos mayores de histocompatibilidad entre las cuales destacan los derivados de proteínas codificadas por los genes MAGE, localizados en el cromosoma X, que se encuentran en melanomas, cánceres de pulmón, de mama y del tracto digestivo. Estas proteínas también se expresan en algunos tejidos normales como el testicular, por lo que no son estrictamente específicas de tejidos tumorales. Los antígenos BAGE y GAGE (64) son otras familias

de genes con patrón de expresión similar a MAGE, que están siendo investigados para la fabricación de vacunas antitumorales, como coadyuvantes de la cirugía.

Vectores virales y bacterianos de muerte selectiva

El progreso del tratamiento génico depende notablemente de la eficacia de los vectores empleados, unos son virales como los retrovirus, adenovirus, virus asociados a los adenovirus y los virus del herpes simple, que forman el grupo de vectores empleados en más del 80% de los protocolos.

Vectores virales que expresan genes apoptóticos pueden introducirse directamente en el tumor, para evitar su captación por las células normales. El gen apoptótico más usado ha sido p53 transportado por adenovirus, con el que se han realizado algunos estudios en estadios iniciales de cánceres de cabeza y cuello, y se han empleado para la purga de células metastásicas en médula ósea (65).

Estudios con el oncogén adenoviral E1A muestran que se puede inducir selectivamente la apoptosis en las células tumorales y además favorecer la quimiosensibilidad. Su mecanismo de acción es a través de la inactivación de pRB y unión al coactivador de transcripción p300/CBP. Las formas mutantes de E1A son incapaces de unirse a Rb pero retienen la capacidad de interacción con p300/CBP, y promueven la apoptosis en las células deficitarias de Rb pero no en las normales, por lo que pudieran ser sustancias antitumorales específicas, al aprovechar que la mayor parte de los cánceres humanos sufren alteración de la vía de Rb (66).

La inyección directa de vectores de retrovirus con p53 ha mostrado efecto positivo en algunos casos de cáncer de pulmón (67). El mecanismo de acción puede ser a través de una acción directa de las células transducidas activando la apoptosis o por efecto indirecto en las células cercanas, efecto "bystander".

Otra vía que ha producido resultados positivos en fases iniciales de tratamiento en tumores humanos es el empleo de adenovirus manipulados para que no expresen E1B, proteína que facilita la infección viral al unirse a p53, incapacitando a la célula para entrar en apoptosis. Cuando el virus carece de esta proteína sólo puede infectar a las células carentes de p53 funcional, que es el hecho característico de gran parte de las células cancerosas, por lo que consigue infectarlas y producir su lisis. El primer estudio clínico consistió en la transferencia de p53 a cánceres resistentes a tratamientos convencionales (68). Se ha visto actividad antitumoral tras inyección directa de vectores de adenovirus en casos de cáncer de cabeza y cuello con mutaciones de p53 (69). El factor limitante para su empleo parece ser la respuesta sistémica y la reacción inmune local que reduce la eficacia de las inoculaciones sucesivas. La reacción sistémica parece controlarse cuando se aplican varias inyecciones sucesivas dentro de la primera semana.

Otras proteínas virales pueden inducir la apoptosis por vías diferentes no mediadas por p53 como es el caso del adenovirus E4orf4 (70). Otra proteína viral, la apop-

tina, es responsable del efecto citopático del virus de la anemia del pollo (CAV) que también produce apoptosis no dependiente de p53 pero si aumentada por bcl-2 (71). El tratamiento génico con p53-adenoviral ha sido estudiado en humanos con cáncer de pulmón no microcítico, en el MD Anderson Cancer Center, en un estudio fase I/II (72). En este estudio se ha demostrado la buena tolerancia al tratamiento con inyección intratumoral mensual, combinada o no con cisplatino. La eficacia real de este enfoque terapéutico habrá que valorarla cuando se realicen estudios en fases más avanzadas y con mayor número de enfermos.

Uno de los vectores más recientes está basado en la *salmonella* modificada genéticamente para reducir su potencial patógeno. Se ha construido un vector denominado VNP 20009, que se inyecta por vía iv en los tumores (colon, pulmón, próstata, mama, etc.) y que en modelos murinos ha conseguido resultados esperanzadores, por lo que se va a iniciar su estudio en humanos.

Vehículos no víricos

Se pueden emplear complejos de liposomas catiónicos o los plásmidos de ADN o bien otro tipo de partículas (73).

Vectores lipídicos catiónicos (liposoma-p53). Son menos potentes que los virales pero con ellos se obtiene mayor difusión por todo el organismo. La vía iv es poco útil, por su rápida captación y destrucción por el hígado y por los componentes séricos, por lo que se prefiere la forma tóxica a través de las mucosas. No producen una respuesta inmune a diferencia de lo que ocurre con los vectores virales y su efecto tóxico consiste en la producción de síntomas similares a los gripales, cuando se emplea la vía aerosol. El estudio de Zou y col. (74) en animales de experimentación con tumores bronquiales en fase inicial, ha mostrado la validez de este enfoque por lo que se ha iniciado un estudio en fase I en humanos, que podrá clarificar su capacidad terapéutica.

Genes suicidas

Consiste en el empleo de retrovirus en los que se sustituyen los genes propios del virus por otros genes capaces de producir la muerte de la célula a través de la expresión de enzimas y en otros casos se busca que el tumor sea sensible a profármacos. Los retrovirus infectan las células que están en multiplicación, por lo que podrían dañar también a las células normales del organismo. El método de gen suicida más empleado ha sido el de la transducción por retrovirus del gen HSV-TK/GCV, que confiere sensibilidad frente al fármaco ganciclovir (GCV) a las células proliferativas, pero no a las quiescentes, como las células normales del cerebro. El ganciclovir, que no es tóxico celular en condiciones normales, se convierte en GCV-trifosfato que si lo es, por medio de HSV-TK, inhibiendo la síntesis del ADN y promoviendo la muerte celular (75). Se propugna su empleo en los tumores del SNC debido a la falta, o a la

lentitud de la división de sus células y quizá en otros tejidos con antígenos tumorales específicos, uniendo el gen suicida a un promotor específico como alfa-fetoproteína en los hepatomas, o el c-erbB2/neu en los cánceres de mama.

Terapia antisentido

Diseñada especialmente para impedir o disminuir la sobreexpresión de genes mutados, mediante la administración de fragmentos cortos de una de las hebras de ADN, que se unen a los ácidos nucleicos usando pares de bases complementarias. El objetivo de las moléculas antisentido es el ARN mensajero que transporta información desde los genes a otras partes de la célula donde se fabrican las proteínas, y con su bloqueo evita que se elabore la proteína que se desea bloquear. Se han hecho estudios contra ras, p53, myc, bcr-abl, bcl-2, *insulin-like growth factor*, etc. Uno de los primeros ensayos clínicos se ha realizado en enfermos con linfoma no-Hodgkin (76).

El número de nuevos productos basados en los conocimientos de biología molecular más recientes está creciendo de forma rápida en los últimos años. En la tabla V se exponen algunos que ya han llegado a la práctica asistencial y otros que se encuentran en fase avanzada de investigación.

TABLA V

ALGUNOS NUEVOS FÁRMACOS BASADOS EN CONOCIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Fármaco	Acción	Cáncer
Ac monoclonales	Anti CD20	Linfomas B
Ac monoclonales	Anti HER2 GF	Mama
Anti EGF		Riñón, mama próstata Cabeza y cuello
Inhibición tirosina quinasa	Inh recep PDGF Inh recepEGF	Glioma Varios Varios
Inhibición farnesil transferasa	Previene actividad de ras	Varios
Inhibe CDK	Bloqueo ciclo celular	Varios
Antisentido bcl-2	Restaura apoptosis	Linfoma, varios
Virus con p53	Restaura p53 perdida	Pulmón, cabeza ovario, hígado
Adenovirus modificados	Muerte selectiva de células sin p53	Cabeza y cuello, TGI, ovario.

BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL CAMPO DE LA RADIOTERAPIA

Cada vez se conocen mejor los mecanismos moleculares que condicionan los efectos de la radioterapia y las

vías de producción de sus efectos indeseables, tanto precoces como tardíos. La radioterapia induce múltiples alteraciones biológicas como mutaciones, aberraciones cromosómicas, transformación celular o muerte celular, a través de la expresión de numerosos genes como c-jun, c-fos, EGR-1, TNF, PDGF, TGF- β y otros. Alguna de las expresiones génicas puede conferir efectos protectores y sobre estos genes y sus productos se centran los estudios para potenciar su efecto y tratar de proteger los tejidos normales de los efectos de la irradiación. Otros productos génicos aumentan la sensibilidad de las células frente a la radiación y su potenciación puede ser útil si se consigue que interactúen específicamente con los tejidos tumorales. Los efectos tardíos de la radioterapia parecen explicarse por las respuestas retardadas y las mutaciones específicas que presentan las células descendientes de las células irradiadas, que produce inestabilidad del genoma (77). Parte de la inestabilidad pudiera atribuirse a la interacción entre las células radiadas y las no radiadas, por el conocido fenómeno "bystander".

La expresión del gen E1a sensibiliza las células frente a los efectos citotóxicos de algunos quimioterápicos como doxorubicina, cisplatino, etoposido o fluorouracilo y también frente a los efectos de la radioterapia y su acción es independiente del estado de p53 y del resto de alteraciones oncogénicas de las células (78).

El gen FGF puede proteger el pulmón de la neumonitis postradioterapia a través de una disminución de la apoptosis y de un aumento de la reparación del ADN del epitelio vascular (79).

INHIBIDORES SELECTIVOS DE DIANAS MOLECULARES

Se busca la inhibición selectiva de los mecanismos clave en la producción y diseminación del cáncer como son los de la angiogénesis (vasos y metaloproteinasas), los responsables de señales de proliferación y transformación celular (factores de crecimiento, transmisores de señales o reguladores de la transcripción) (80).

Los factores angiogénicos asociados con tumores son numerosos: FGF, VEGF, PDGF entre otros; se están desarrollando ensayos clínicos basados en estos factores, no sólo para tratamiento de enfermedades tumorales sino de otras patologías como la reumatológica, vascular, oftalmológica, etc. Más de 30 productos están siendo estudiados, desde el marimastat a la talidomida o el neovastat. Algunos resultados son esperanzadores, aunque se han observado efectos tóxicos no esperados como la toxicidad neurológica -neuropatía central y periférica-, además de anemia, trombocitopenia, leucopenia o alteración de las pruebas de función hepática (81).

La suramina puede bloquear la unión de diversos factores de crecimiento como PDGF, TGF- β y ECG con sus receptores y ha mostrado su eficacia en algunos estudios iniciales sobre cánceres de próstata y ovario (82).

La progresión tumoral está asociada con un aumento de la actividad de las metaloproteinasas. Los inhibido-

res de la matriz de las metaloproteinasas como el marimastat o el batismastat tienen un efecto anti angiogénico pero también intervienen en la regulación de la proliferación celular, aunque su principal papel terapéutico está relacionado con la inhibición de la aparición de metástasis y de la angiogénesis (83).

DIAGNÓSTICO PREDICTIVO

El diagnóstico predictivo es una nueva modalidad epidemiológica orientado especialmente a las enfermedades hereditarias entre ellas a algunos tipos de cánceres que presentan este carácter. El conocimiento de los genes causantes de cánceres hereditarios o de los síndromes de predisposición al cáncer es cada vez más necesario para todos los clínicos, que debemos enfrentarnos con cierta frecuencia con cuadros familiares donde se observan varios individuos con tumores, y que motivan consultas y petición de información para la debemos estar preparados.

La inactivación de genes supresores es el mecanismo más frecuente en los síndromes hereditarios de predisposición al cáncer. Se ha observado (84) que embriones de ratones homocigotos para la mutación de p53 llegan a nacer pero sufren la aparición de diferentes tumores antes de los 6 meses de edad; los tumores más comunes son linfomas y sarcomas. P53 es responsable del *síndrome de Li Fraumeni* síndrome hereditario que predispone a la aparición de varios tipos de cáncer dentro de la misma familia, predominando los sarcomas (osteosarcomas y sarcomas de tejidos blandos), tumores cerebrales, leucemias, cánceres de glándulas suprarrenales, cáncer de mama, cáncer de pulmón y otros. No todas las familias que presentan los criterios de diagnóstico de este síndrome presentan mutaciones de p53 (85), por lo que otros genes, todavía no reconocidos, podrían ser responsables de buen número de casos de este síndrome. Aunque las técnicas de detección actuales nos permiten detectar las mutaciones en p53, su valor para identificar el síndrome familiar de Li-Fraumeni es bajo, tanto por su rareza como por la existencia de mutaciones germinales del gen que no se acompañan de la expresión tumoral familiar característica.

El gen del retinoblastoma aislado en el ADN de muestras de retinoblastoma (86) ha sido el primer gen supresor aislado. El tumor aparece en niños pequeños, en general antes de los 5 años y en un 25-30% pueden ser bilaterales. El gen está localizado en el cromosoma 13q14 y contiene el código de una fosfoproteína nuclear (pRB) que se expresa en varios tipos de células, a lo largo de todo el ciclo celular.

El estudio de las mutaciones puede realizarse actualmente desde antes del nacimiento y es uno de los cánceres hereditarios en los que los estudios genéticos familiares debe ser práctica estándar cuando se sospecha su existencia (87).

La forma familiar del *tumor de Wilms* es infrecuente, aproximadamente el 1% de todos los casos, incluso en aquellos casos de presentación bilateral, en su forma más extrema se presenta como el síndrome de WAGR

(tumor de Wilms, aniridia, malformaciones genitourinarias y retraso mental), en estos casos se ha observado una deleción cromosómica en la banda 11p13 donde se localizó en 1990 el gen WT1 (88,89). No es el único gen causante del tumor de Wilms puesto que alteraciones en 11p15 también lo producen (síndrome de Beckwith-Wiedemann: tamaño grande al nacimiento, hipertrofia lingual, onfalocele, tumor de Wilms) e incluso existen casos familiares sin mutación en 11p13 ni 11p15, por lo que se piensa que puede haber otros genes responsables de estos casos hereditarios.

Aunque el gen puede ser estudiado, no se aconseja el estudio genético familiar como método estándar de diagnóstico predictivo.

El gen *apc*, cuando está mutado es el responsable del síndrome de la *poliposis familiar adenomatosa*, que puede presentarse con fenotipos variados como el síndrome de Gardner (asociación con osteomas) o el de Turcot (asociación con tumores cerebrales). El gen *apc* está localizado en 5q y fue clonado en 1991. Se encuentra mutado en el 70% de las familias con estos síndromes. Algunas familias con origen étnico definido, como las de origen judío Askenazi, presentan una mutación específica, la I1303K, en la que el alelo mutado contiene una sustitución de un aminoácido, manteniendo a pesar de ello una actividad funcional normal (90), aunque la variante parece imprimir una mayor susceptibilidad para sufrir mutaciones somáticas. Estas familias tienen un aumento de riesgo, estimado en 2, de padecer cáncer de colon sin poliposis.

El *síndrome familiar de predisposición al cáncer de mama y ovario* está asociado a mutaciones en los genes supresores BRCA1 y BRCA2. Se caracteriza por la aparición de cánceres de mama de comienzo precoz y alta frecuencia de bilateralidad, acompañándose o no de cánceres de ovario en la misma enferma o en algún familiar; puede haber exceso de otros cánceres en la familia, como el de próstata y el cáncer de colon. El gen BRCA1 está situado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q) y el BRCA2 se localiza en el cromosoma 13q12-13. La alteración en BRCA2 confiere menor riesgo de padecer cáncer de ovario que el gen BRCA1, pero tiene la peculiaridad de conferir mayor riesgo de padecer cáncer de mama en los varones. Una mutación específica en el gen BRCA1, la localizada en 185 del AG, se produce predominantemente en mujeres de origen judío Askenazi, y puede afectar al 1% de la población de este origen.

El gen de la *neurofibromatosis*, NF1, fue clonado en 1991; produce una proteína, la neurofibromina, que se expresa en las neuronas, las células de Schwann, la médula suprarrenal y los leucocitos. La función de la proteína está relacionada con los microtúbulos y también funciona como un regulador negativo del oncogén *ras* (p21-*ras*) que es fundamental para muchas señales intracelulares, transduciendo tanto señales estimulantes del crecimiento como señales de detención del mismo (91). El gen está localizado en 17q11.2. El gen NF2 se encuentra en 22q11. El panel de consenso para la neurofibromatosis estableció en 1987 los criterios diagnósticos de NF-1 (neurofibromatosis periférica; enfer-

medad de Von Recklinghausen) y de la neurofibromatosis 2, NF-2 (neurofibromatosis central) (92). La detección de NF1 y NF2 es posible en el momento actual usando pruebas de proteínas truncadas para estudio del NF1 y mediante SSCP y secuenciación directa para NF2. Con estas técnicas se detecta entre el 60-70% de los casos tanto de NF1 como NF2 (93).

El *síndrome de Bloom* es otro de los síndromes hereditarios en los que el estudio familiar del gen mutado está recomendado. El gen responsable está localizado en 15q26.1 y su función pudiera ser similar a la de las helicasas. Los cánceres que se asocian a este síndrome son principalmente leucemias y linfomas, en las dos primeras décadas de la vida y cánceres de laringe, pulmón, lengua, esófago, colon o mama después de los 20 años, apareciendo en general a edades mucho más jóvenes que sus homólogos esporádicos.

Los síndromes de *neoplasia endocrina múltiple* están relacionados con mutaciones del oncogén *ret*, localizado en 10q11.2. En los MEN2A más del 95% de las mutaciones se localizan en los exones 10 y 11, lo mismo que ocurre en la mayor parte de los casos de carcinoma medular del tiroides (CMT) familiar. Los MEN2B se caracterizan por una única mutación en el codón 918 del exón 16. Los CMT del MEN2B se pueden encontrar en niños muy pequeños por lo que los métodos de diagnóstico precoz deben iniciarse a los 2-3 años de edad. Los métodos de biología molecular están sustituyendo a los métodos bioquímicos de rastreo habituales (calcitonina). Mediante la búsqueda de la mutación en *ret* se pueden detectar los posibles portadores en edad más joven y con métodos menos molestos para los pacientes, que utilizando los métodos bioquímicos (94). La búsqueda de la mutación es obligada en todos los casos de CMT y en sus familiares.

El oncogén *met* está relacionado con el *carcinoma renal familiar del tipo papilar*. El gen está localizado en 7q31.1-34. Esta entidad familiar es poco frecuente y el gen no ha sido clonado.

Los *melanomas familiares* se asocian con frecuencia a alteraciones en los cromosomas 1,6,7 y 9. El gen supresor CDKN2 que codifica p16 o el oncogén CDK4 localizado en 12q14 son algunos de los genes relacionados con este síndrome.

Cáncer familiar de colon sin poliposis. Se han detectado alteraciones en los cromosomas 2, 3 y 7. Las mutaciones conocidas afectan a los genes MSH2, MSH3, MSH6, GTBP, MLH1, PMS1 y PMS2, todos ellos son genes responsables de la reparación del ADN.

Xeroderma pigmentoso. En su desarrollo están implicados siete genes, identificados como XP (A, B, C, D, E, F, G). la gravedad de la enfermedad depende de la capacidad residual de reparación del ADN.

POLIMORFISMOS GÉNICOS

Son variaciones en la expresión de proteínas encontradas con frecuencia en la población general. Algunos confieren al sistema de detoxificación una actividad enzimática diferente de la normal que, en individuos

susceptibles, permite la formación de complejos mutagénicos (95); en otros casos los polimorfismos se encuentran en receptores que se unen a carcinógenos u hormonas pudiendo conferir susceptibilidad a padecer tumores y pudieran ser empleados en el futuro como señales de predisposición en el contexto de cuadros pre-neoplásicos. Polimorfismos de p53 se han asociado con un mayor riesgo de padecer cáncer de mama, ovario y otros (96-98).

TÉCNICAS

La tecnología del "chip" de ADN es la más revolucionaria de las técnicas moleculares actuales. La secuenciación automática ha sido la base del desarrollo de estos métodos automáticos microscópicos, creando micropaneles que permiten, de forma automatizada, el estudio de la expresión génica, el análisis funcional, mapeo genético y el genotipo de las muestras examinadas. En un pedacito de cristal del tamaño de una uña se pueden ordenar 30,000 secuencias cortas de ADN, a una velocidad de 800 pocillos por minuto. Esta técnica permite el análisis simultáneo de cientos de genes. Tras la unión con sustancias fluorescentes se pueden leer los resultados con ordenador y compararlos con los obtenidos en otros sujetos (99). A partir de un diagnóstico molecular rápido y preciso, se podrán activar nuevos estudios de diagnóstico, seguimiento y tratamiento de las enfermedades tumorales, que pueden cambiar amplios aspectos de la Medicina.

Enzimas de restricción. Proteínas bacterianas que cortan la molécula de ADN en fragmentos, cada vez que encuentra una determinada secuencia de nucleótidos. Se aíslan a partir de bacterias y se denominan con una secuencia de tres o cuatro letras seguidas de un número romano.

Southern Blot. Detecta variaciones en las secuencias de ADN cortándolo mediante enzimas de restricción y determinando el tamaño de los segmentos producidos. El blot se hibrida con una sonda marcada con material radiactivo y se autoradiografía para proceder a su lectura. Es un método muy eficaz para detectar delecciones cromosómicas.

Northern y Western Blot. Estudian la expresión de los genes a través del ARN mensajero. Similares al southern Blot.

Hibridación in situ. (FISH por *Fluorescence In Situ Hybridization*) Una sonda de ácido nucleico marcado, aplicada directamente a las células o tejidos donde se incuban. La lectura se realiza directamente en los tejidos y se detectan las zonas de ADN a las que se ha unido la sonda, aportando así una información morfológica, sobre la localización en el genoma de la región buscada.

Hibridación genómica comparativa (CGH). Es un nuevo instrumento para estudio de la citogenética tumoral que estudia las pérdidas y ganancias de las copias de ADN, en todo el genoma con un solo experimento de hibridación y no necesita cultivos celulares previos. Puede ser muy útil para mapear alteraciones cromosó-

micas en diversos tumores (100), donde luego se pueden buscar las posibles mutaciones. Puede ser también útil para observar los diferentes cambios cromosómicos en los distintos momentos evolutivos del tumor o para valorar la malignidad de algunas variedades tumorales y para comparar los patrones de cambios genéticos entre el tumor primitivo y sus metástasis.

Reacción de la polimerasa (PCR) (101). Es la técnica más importante para el análisis del ADN recombinante, descubierta en 1983 por Kary Mullis y por la que recibió el premio Nobel en 1994. Mediante el empleo de cebadores, fragmentos de ADN que son copias complementarias de las terminaciones de cada secuencia de ADN que se quiere multiplicar. A la muestra se añaden cebadores más nucleótidos libres, más una enzima termoestable que estimula la síntesis de ADN (Taq polimerasa). El conjunto se somete a tres fases de temperaturas diferentes, a 95° se produce la separación de hebras de ADN, a 55° la hibridación del ADN con sus complementarios y a 75° la síntesis de nuevo ADN a partir de los lugares específicos donde se ha formado la nueva doble hebra. La operación se repite múltiples veces, en general 30 veces, al final de las cuales se pueden conseguir 1 millón de copias del ADN original.

SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), desplazamiento en un gel no desnaturalizado de fragmentos de ADN desdoblados y amplificados mediante PCR. Las secuencias mutadas presentan una

movilidad diferente que se detecta en la lectura del gel.

Secuenciación. Determinación del orden en que se encuentran dispuestos los nucleótidos en la cadena de ADN.

Secuenciación automática. Técnica automatizada que disminuye en número de pasos intermedios, aunque necesita, en algunos casos, la confirmación mediante técnicas manuales.

Clonado. Aislamiento y copia de un de un gen a través de plásmidos y bacterias transformadoras.

Estudio funcional de las proteínas. Análisis de la capacidad funcional de las proteínas que confirme o no la alteración o la pérdida de función de la proteína codificada por el gen estudiado.

Antisentido. Secuencia de nucleótido (ADN o ARN) complementario de la secuencia codificadora del gen. Estas secuencias tienen la capacidad de formar doble hebra y por tanto inhibir la traslación a proteína.

Biblioteca de ADN. Colección y archivado de fragmentos de ADN clonados.

Animales transgénicos. Animales desarrollados a partir de un embrión en el que se insertado un gen externo. Cuando el animal es fértil, puede transmitir este gen a su descendencia. Son básicos para el estudio de la biología de la expresión génica y para el estudio de su modificación a través de la terapia génica, para el tratamiento del cáncer o de otras enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM et al. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260:170-173.1976.
2. Rous P. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., *Experimental Medicine for Sept. 1, 1910*, vol. 12, pp.695-705. *J Exp Med* 150:738-753.1979.
3. Ambrosone C, Thompson P. Molecular epidemiology of epithelial tumors. *Current Opinion in Oncology*10:467-474.1998
4. Bennett WP, Hussain SP, Vahakangas KH, et al. Molecular epidemiology of human cancer risk: Gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J Pathol* 187:8-18.1999.
5. Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, et al. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350:427-428.1991.
6. Bressac B, Kew M, Wands J, et al. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350:429-431.1991.
7. Soini Y, Chia SC, Bennett WP, et al. An aflatoxin-associated mutational hotspot at codon 249 in the p53 tumor suppressor gene occurs in hepatocellular carcinomas from Mexico. *Carcinogenesis* 17:1007-1012.1996.
8. Qian GS, Ross RK, Yu MC, et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, Peoples' Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:3-10.1994
9. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776.1994.
10. Dumaz N, Drougard C, Sarasin A et al. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10529-10533.1993
11. Jonason AS, Kunala S, Price GJ et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14025-14029.1996
12. Spivack SD, Fasco MJ, Walker VE, et al. The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicol* 27:319-365.1997.
13. van Schooten FJ, Godschalk RW, Breedijk A, et al. 32P-postlabelling of aromatic DNA adducts in white cells and alveolar macrophages of smokers: saturation at high exposures. *Mutat Res* 378:65-75.1997.
14. Mooney LA, Bell DA, Santella RM, et al. Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis* 18:503-509.1997.
15. Ryberg D, Skaug V, Hewer A, et al. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 18:18:1285-1289.1997.
16. Jones D, Fletcher CD. How shall we apply the new biology to diagnostics in surgical pathology?. *J Pathol* 187:147-154.1999.
17. Busam KJ, Fletcher CD. The clinical role of molecular genetics in soft tissue tumor pathology. *Cancer Metastasis Rev* 16:207-227.1997
18. Zucman J, Delattre O, Desmaziere C et al. EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nature Genet* 4:341-345.1993.
19. Labelle Y, Zucman J, Stenman et al. Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hun Mol Genet* 4:2219-2226. 1995.
20. Ladanyi M, Gerald W. Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res* 54:2837-2840.1994.
21. Douglas EC, Rowe ST, Valentine M et al. A second nonrandom translocation, der (16)t(1;16) (q21;q13), in Ewing sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. *Cytogenet Cell Genet* 53: 87-90.1990.

22. Granados R, Cibas ES, Fletcher JA. Cytogenetic analysis of effusions from malignant mesothelioma. A diagnostic adjunct to cytology. *Acta Cytol* 38:711-717.1994.
23. Dal Cin P, Rao U, Janl-Sait S et al. Chromosomes in the diagnosis of soft tissue tumors. 1. Synovial sarcoma. *Mod Pathol* 6:357-362.1992.
24. Cole P, Ladanyi M, Gerald WL et al. Synovial sarcoma mimicking desmoplastic small round-cell tumor: critical role for molecular diagnostic. *Med Pediatr Oncol* 32:97-101.1999.
25. Martínez-Climent JA. Aplicaciones de la citogenética molecular al estudio de los síndromes linfoproliferativos. *Hematol. Citocinas Inmunoter. Ter. Cel.* 1:3-24.1998.
26. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256:102-105.1992.
27. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH et al. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hiperplasia. *Cancer Res* 54:3568-3573.1994.
28. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science* 271:659-662.1996.
29. Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF et al. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med* 3:621-624.1997
30. Silva JM, González R, Domínguez G et al. TP53 gene mutations in plasma DNA of cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 24:160-161.1999.
31. Brennan JA, Mao L, Hruban RH et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 332:429-435.1995.
32. Slade MJ, Smith BM, Sinnett HD et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detectio of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 17:870-879.1999.
33. Shivers SC, Wang X, Li W et al. Molecular staging of malignant melanoma. *JAMA* 280:1410-1415.1998.
34. Cheung IY, Cheung NKU, Ghossein R et al. GAGE: A novel marker for microscopic human cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17:552.1998.
35. García-Patiño E, Gomendio B, Provencio M et al. Germ-line BRCA1 mutations in women with sporadic breast cancer: clinical correlations. *J Clin Oncol* 16:115-120.1998.
36. Silva JM, González G, Provencio M et al. Loss of heterozygosity in BRCA1 and BRCA2 markers and high-grade malignancy in breast cancer. *Breast Cancer Res Tr* 53:9-17.1999.
37. Isola JJ, Holli K, Oksa H et al. Elevated erb B-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples defined in aggressive course in patients breast cancer. *Cancer* 73:652-658.1994
38. Andersen TI, Paus E, Nesland JM et al. Detection of C-erb B2 related proteins in sera from breast cancer patients. Relationship to ERBB2 gene amplification and Cerb B2 protein overexpression in tumour. *Acta Oncol* 34:499-504.1995.
39. Burke HB, Hoang A, Iglehart JD et al. Predicting response to adjuvant and radiation therapy in patients with early stage breast carcinoma. *Cancer* 82:874-877.1998.
40. Revillion F, Hebbar M, Boneterre J et al. Plasma CerbB2 concentration in relation to chemotherapy in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 32:231-234.1996
41. Volas GH, Leitzel K, Teramoto Y et al. Serial serum C-erbB2 levels in patients with breast carcinoma. *Cancer* 78:267-272.1996
42. Willsher PC, Beaver J, Pinder S et al. Prognostic significance of serum CerbB2 protein in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 40:251-255.1996
43. Jen J, Kim H, Piantadosi S et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 331:213-221.1994
44. Shibata D, Reale MA, Lavin P et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 335:1727-1732.1996.
45. Caron H, van Slui P, de Kraker J, et al. Allelic losses of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334:22-230.1996.
46. Schmitt CA, Lowe SW. Apoptosis and therapy *J Pathol* 187:127-137.1999.
47. Lazo PA. Biología y proyección clínica de la apoptosis. *Hematol. Citocinas Inmunoter. Ter. Cel.* 1:59-78.1998.
48. Muller M, Strand S, Hug H, et al. Drug- induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of p53. *J Clin Invest* 99:403-413.1997.
49. Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* 18:477-485.1999.
50. Wang YC, Lee HS, Chen SK et al. Prognostic significance of P53 codon 72 polymorphism in lung carcinomas. *Eur J Cancer* 35:226-230.1999.
51. Elledge R. Assessing p53 status in breast cancer prognosis: Where should you put the thermometer if you think your p53 is sick? *J Natl Cancer Inst* 88:141-143.1996.
52. Kamesaki S, Kamesaki H, Jorgensen TJ et al. Bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res* 53:4251-4256.1993.
53. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspasas: Enemies within. *Science* 281:1312-1316.1998.
54. Herrmann F. Cancer gene therapy: principles, problems, and perspectives. *J Mol Med* 73:157-163.1995.
55. ost CA, Marin MC, Kaelin WG et al. P73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389:191-194. 1997.
56. Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going?. *J Natl Cancer Inst* 88:21-39.1997.
57. Ihnat MA, Lariviere JP, Warren AJ et al. Suppression of P-glycoprotein expression and multidrug resistance by DNA cross-linking agents. *Clin Cancer Res* 3:1339-1346.1997.
58. Ross HJ, Cho J, Osann K et al. Phase I/II trial of low dose cyclosporin A with EP for advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*18:189-198.1997.
59. Jurcic JG, Scheinberg DA, Houghton AN. Monoclonal therapy of cancer. En Pinedo HM, Longo DL and Chabner BA editores. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers. Annual 16. Elsevier Science BV.* 1996:168-188.
60. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14:737-744.1996
61. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D et al. Efficacy and safety of Herceptin™ (humanized anti-HER2 antibody) as a single agent in 222 women with HER2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer. *Pro Am Soc Clin Oncol* 17:97^a.1998.
62. Slamon D, Leyland-Jones B, Shack S et al. Addition of Herceptin (humanized anti-HER2 antibody) to first line chemotherapy for HER2 overexpressing metastatic breast cancer (HER2+/MBC) markedly increases anticancer activity: a randomized multinational controlled phase III trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17:98^a.1998.
63. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16:413-428.1998.
64. Marchand M, Weynants P, Rankin E et al. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80:219-230.1999.
65. Seth P, Brinkmann U, Scharz GN et al. Adenovirus-mediated gene transfer to human breast tumor cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging. *Cancer Res* 56:1346-1351.1996.
66. Samuelson AV, Lowe SW. Selective induction of p53 and chemosensitivity in RB-deficient cells by E1A mutants unable to bind the RB-related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.*94:12094-12099.1997.
67. Roth JA, Nguyen D, Lawrence DD et al. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med* 2:985-991.1996.
68. Hamada K, Alemany R, Zhang WW et al. Adenovirus-mediated transfer of a wild-type p53 gene and induction of apoptosis

- in cervical cancer. *Cancer Research* 56:3047-3054.1996.
69. Clayman GL, el-Naggar AK, Lippman SM et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 16:2221-2232.1998.
 70. Marcellus RC, Lavoie JN, Boivin D et al. The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis. *J Virol* 72:7144-7153.1998.
 71. Noteborn MH, Zhang YH, van der Eb AJ. Apoptin (R) specifically causes apoptosis in tumor cells and after UV-treatment in untransformed cells from cancer-prone individuals: a review. *Mutat Res* 400:447-455.1998.
 72. Swisher SG, Roth JA, Neumanitis J et al Adenoviral mediated p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Med Onc* 17: 431.1998.
 73. Ross G, Erickson R, Knorr D et al. Gene therapy in the United States: A five-year status report. *Hum Gene Ther* 7:1781-1790.1996.
 74. Zou Y, Zong G, Ling YH et al. Effective treatment of early endobronchial cancer with regional administration of liposome-p53 complexes. *J Natl Cancer Inst* 90:1130-1137.1998.
 75. Ram Z. Gene therapy in brain tumors. 23rd ESMO Congress. Educational Book. 1998. Pp163-165.
 76. Webb A, Cunningham D, Cotter F et al. Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 349:1137-1141.1997.
 77. Wright EG. Inherited and inducible chromosomal instability: A fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumorigenesis. *J Pathol* 187:19-27.1999.
 78. Sánchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A et al. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1a gene. *Oncogene* 11:467474.1996
 79. Haimovitz-Friedman A, Balaban NA, McLoughlin M et al. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 54:2591-2597.1994.
 80. Gillham H, Gullick WJ. New targets for cancer treatment: signals. Educational Book. 23rd ESMO Congress. 1998:69-84.
 81. Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 187:503-510.1999.
 82. Stein CA, La Rocca RV, Thomas R et al. Suramin: an anticancer drug with a unique mechanism of action. *Cancer Res* 53:2239-2248.1993.
 83. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89:1260-1270.1997.
 84. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356:215-221.1992.
 85. Evans SC, Mims B, McMasters KM et al. Exclusion of a p53 germline mutation in a classic Li-Fraumeni syndrome family. *Human Genet.* 102:681-686.1998
 86. Friend S, Bernards R, Rogelj S et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643- .1986.
 87. American Society of Clinical Oncology. Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 14:1730-1736.1996.
 88. Gessler M, Poustka A, Cavenee W et al. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-778 .1990
 89. Call K, Glaser T, Ito C et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60: 509. 1990.
 90. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB et al. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 17:79-83.1997.
 91. Gutmann DH. Recent insights into neurofibromatosis type-1. Clear genetic progress. *Arch Neurol* 55:778-780.1998.
 92. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: neurofibromatosis; Bethesda, Md., USA. July 13-15, 1987. *Neurofibromatosis* 1:172-178.1988.
 93. Karnes PS. Neurofibromatosis: A common neurocutaneous disorder. *Mayo Clin Proc* 73:1071-1076.1998
 94. Ledger GA, Khosla S, Lindor NM et al. Genetic testing in the diagnosis and management of multiple endocrine neoplasia type II. *Ann Intern Med* 122:118-124.1995
 95. Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible?. *Science* 278:1068-1073.1997.
 96. Wang-Gohrke S, Rebbeck TR, Besenfelder W et al. P53 germline polymorphisms are associated with an increased risk for breast cancer in German women. *Anticancer Res* 18:2095-2099.1998.
 97. Buller RE, Sood A, Fullenkamp C et al. The influence of the p53 codon 72 polymorphism on ovarian carcinogenesis and prognosis. *Cancer Gene Ther* 4:239-245.1997.
 98. Storey A, Thomas M, Kalita A et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393: 229-234.1998.
 99. Kurian KM, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. *J Pathol* 187:267-271.1999.
 100. James LA. Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J Pathol* 187:285-395.1999.
 101. Ross DW. Tools of recombinant DNA technology. En *Introduction to molecular Medicine*.1996. 2d Ed. Springer. 27-50.

Transducción de señales mitogénicas y de diferenciación celular

A. M. MARTÍNEZ VALVERDE, M. LORENZO

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

Durante los últimos años se han realizado grandes avances en el estudio de los mecanismos intracelulares implicados en el control de la proliferación y diferenciación de las células eucariotas. Existe una gran variedad de moléculas (factores de crecimiento, citoquinas, hormonas) que al interactuar con sus receptores específicos en la membrana plasmática desencadenan en el interior de la célula múltiples cascadas de transducción de señales que conducen a la activación o represión de los genes que controlan los procesos de proliferación y diferenciación celular. Estos procesos deben estar sometidos a un control riguroso dentro de la célula, ya que aberraciones genéticas en estos factores de crecimiento, en sus receptores y en las rutas de transducción de señales conducen a un crecimiento anormal, al *Cáncer*. Debido a la complejidad de estos procesos, en este tema estudiaremos en detalle las rutas de señalización intracelulares desencadenadas por péptidos de la familia de insulina/IGF-I, cuyo mecanismo biológico de acción se inicia tras la unión a sus receptores específicos de membrana que poseen actividad intrínseca tirosina quinasa. Al final del capítulo desarrollaremos los resultados más relevantes realizados en nuestro laboratorio durante los últimos años sobre el papel de la insulina y el IGF-I en la proliferación y diferenciación en el modelo celular de adipocitos marrones fetales en cultivo.

ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE INSULINA/IGF-I

Aunque el receptor de insulina/IGF-I se expresa en la mayoría de las células de los vertebrados, sus niveles de expresión son muy variables. El gen que codifica para el receptor de insulina se localiza en el brazo corto del cromosoma humano 19; su longitud es de 150 kilobases y contiene 22 exones que codifican para un cDNA de 4.2 kilobases (Seino y col., 1990). El gen que codifica para el

receptor de IGF-I humano se localiza en el cromosoma 15 y contiene 21 exones (Abbot y col., 1992). La organización de los intrones y exones es muy similar en ambos tipos de receptores. El receptor de insulina/IGF-I es una glucoproteína que contiene cuatro subunidades: dos subunidades extracelulares y dos subunidades intracelulares. Ambas subunidades derivan de un mismo proreceptor que tras una proteólisis libera las subunidades y que quedan unidas entre sí por puentes disulfuro primarios formando dos unidades. A continuación, se produce la unión por puentes disulfuro secundarios de las dos unidades resultando el dímero 2×2 que constituye el receptor maduro (Figura 1). Las subunidades extracelulares se caracterizan por presentar un dominio rico en cisteína, en el que se encuentra la secuencia de aminoácidos implicada en la unión al ligando. Recientemente se ha propuesto la existencia de dos sitios de unión a la insulina/IGF-I en cada subunidad (sitios 1 y 2)

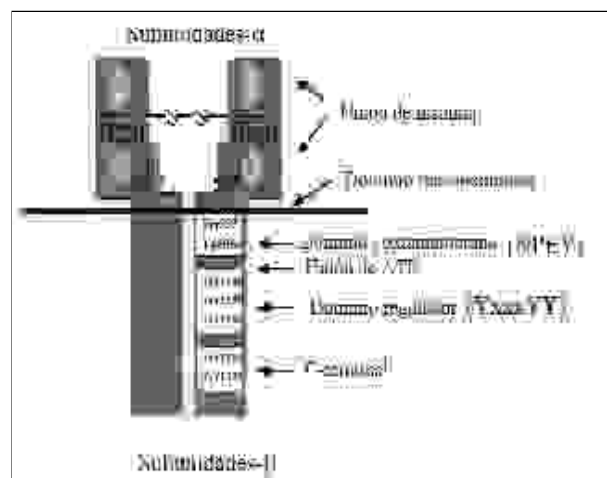


Fig. 1. Estructura del receptor de insulina/IGF-I.

(White 1997). Las subunidades presentan una región de yuxtamembrana codificada por el exón 16 que contiene diversos residuos de serina y al menos un lugar de autofosforilación, la tirosina 960 que se encuentra en un entorno de aminoácidos NPXY⁹⁶⁰. Esta región es esencial para la transmisión de la señal de manera que la sustitución de la Tyr⁹⁶⁰ por fenilalanina inhibe los eventos posteriores en la cascada de señalización a pesar de que la fosforilación en tirosina de otros residuos no se encuentra alterada (White y col., 1988a). Las subunidades presentan también en la región intracelular una zona de unión para ATP, así como numerosos residuos tirosina susceptibles de fosforilación que se sitúan principalmente en el dominio regulador y en la región C-terminal (White y col., 1988b, White y Kahn, 1994). Este dominio contiene los residuos de autofosforilación Tyr¹³¹⁶ y Tyr¹³²² además de residuos serina y treonina. Deleciones en la región C-terminal del receptor reducen la autofosforilación en tirosina sin modificar la asociación del receptor con otras proteínas (Yamamoto y col., 1993). Entre ambos dominios (extracelular e intracelular) se encuentra el denominado dominio de transmembrana cuya función es estabilizar los cambios conformacionales originados en la molécula del receptor tras la unión del ligando. La unión del ligando a dichos sitios induce interacciones alostéricas entre las dos subunidades y dentro del complejo estabilizado por puentes disulfuro. Esto origina la estimulación de la actividad tirosina quinasa intrínseca, produciendo la autofosforilación en varios residuos tirosina (por fosforilación cruzada de una subunidad sobre la otra). Este modelo de dimerización alostérica no es exclusivo de los receptores de insulina/IGF-I, sino aplicable a la mayoría de los receptores tirosina quinasa independientemente de sus diferencias estructurales.

Además de las fosforilaciones en tirosina, el receptor de insulina también se fosforila en residuos de serina y treonina en respuesta a insulina, produciéndose una disminución en los niveles de fosforilación en tirosina. Los lugares de fosforilación en serina podrían ser Ser¹²⁹³, Ser¹²⁹⁴ y Thr¹³³⁶ (White, 1997). Todavía no se conocen las enzimas implicadas en estas fosforilaciones en serina. Por tanto, la combinación de la unión del ligando, las fosforilaciones en tirosina y las fosforilaciones en serina/treonina constituyen los puntos de control susceptibles de regulación por los estímulos tanto extracelulares como intracelulares.

A pesar de la semejanza estructural (80% de homología en las subunidades) de los receptores de insulina e IGF-I, ambas moléculas se unen específicamente a sus propios receptores. El receptor del IGF-I presenta una constante de disociación del orden de 0.2-1 nM para el IGF-I siendo su afinidad para la insulina del orden de 500-100 veces menor. El receptor de la insulina presenta una alta afinidad para la hormona (kd 0.2-1 nM) que es 100 veces menor para el IGF-I (Jones y Clemmons, 1995). Sin embargo, receptores híbridos formados por una unidad del receptor de insulina y otra unidad del receptor del IGF-I presentan afinidades que se asemejan al receptor del IGF-I, sugiriendo la posibilidad de que esta molécula puede ejercer sus acciones biológicas a través de ambos receptores (Le Roith y col., 1995).

PROTEÍNAS FOSFORILADAS POR EL RECEPTOR DE INSULINA/IGF-I

1. *IRS-1/IRS-2*

Entre los sustratos con los que interacciona el receptor de insulina/IGF-I fosforilado, las proteínas IRS (sustrato del receptor de la insulina) y las proteínas SHC son las que mejor se han caracterizado. Dentro de las proteínas IRS se han identificado cuatro miembros (IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4). El primero que se caracterizó fue el IRS-1 (Sun y col., 1991) a partir de células de hepatoma estimuladas con insulina mediante inmunoprecipitación con anticuerpos antifosfotirosina. En un principio se denominó pp185 en base a su movilidad en geles de SDS-PAGE. Esta molécula se purificó a partir de hígado de rata y de una línea celular adipocítica y posteriormente se realizó su clonaje en rata, ratón y humano (White, 1997). El tamaño de su cDNA predecía una proteína de 131 kDa. Sin embargo, la migración que se observaba en geles de acrilamida era debida a que se encontraba altamente fosforilada. El gen que codifica para el IRS-1 carece de intrones y en humanos se localiza en el cromosoma 2q36-37 (Araki y col., 1993). El mRNA se encuentra generalmente en bajos niveles y presenta en humanos dos formas de tamaños 6.9 kb y 6 kb y en roedores 9.5 kb. En tejidos fetales el mRNA del IRS-1 se puede detectar mediante la técnica de PCR.

Poco tiempo después de la identificación y clonaje del IRS-1, en la misma línea de hepatoma se encontró otra proteína altamente fosforilada en tirosina que en un principio se designó como pp185^{HMW} (Miralpeix y col., 1992). Asimismo se detectó otra proteína similar a ésta en una línea de células mieloides que se designó como 4PS (sustrato del receptor de interleukina 4) ya que se identificó tras la estimulación de estas células con interleukina 4. Una vez realizada la purificación y clonaje de esta proteína se observó que existía una homología estructural importante con el IRS-1, sugiriéndose que podría tratarse de dos miembros de una misma familia. De esta manera esta nueva proteína se denominó IRS-2 (Sun y col., 1995). Entre el IRS-1 y el IRS-2 existía un 43% de homología distribuida en los distintos dominios de ambas proteínas (Figura 2). Dicha homología se centraba en las regiones IH1 y IH2 situadas en la región N-terminal de los IRSs.

Las proteínas IRSs contienen numerosos residuos de tirosina susceptibles de ser fosforilados en la región carboxilo terminal (Figura 2). Concretamente el IRS-1 pre-

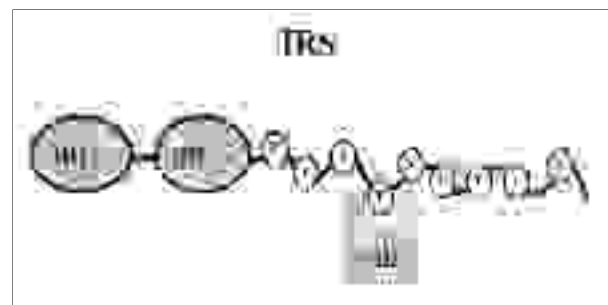


Fig. 2. Estructura de las proteínas IRS-1/IRS-2.

senta 21 residuos tirosina susceptibles de fosforilación por receptores de tipo tirosina quinasa (Sun y col., 1991). En esta región la homología entre el IRS-1 y el IRS-2 es del 35% (Sun y col., 1995) de manera que se conservan 14 residuos tirosina. Se han realizado estudios muy detallados sobre los residuos tirosina del IRS-1 que son fosforilados por la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina activado por la hormona. Entre estos se encuentran las tirosinas 618, 628, 639 y 987 que están dentro de la secuencia tipo YMXM, además de otros residuos que no se encuentran dentro de estas secuencias pero están próximos a residuos aspartato o glutamato.

Además de los residuos tirosina, las proteínas IRSs contienen al menos 30 residuos de serina y treonina susceptibles de ser fosforilados por diversas proteínas quinasas. Curiosamente, en células que no fueron estimuladas con insulina el IRS-1 presentaba altos niveles de fosforilación en serina (Sun y col., 1991) que eran capaces de inhibir la propia fosforilación en tirosina de esta molécula (Jullien y col., 1993).

INTERACCIÓN ENTRE Y LAS PROTEÍNAS IRS-1/ IRS-2 Y EL RECEPTOR DE INSULINA/IGF-I

La interacción entre el receptor de insulina/IGF-I con diversas proteínas celulares se ha estudiado extensivamente durante los últimos años y sugiere la existencia de un mecanismo común. Concretamente la región N-terminal del IRS-1 media la interacción con la Tyr⁹⁶⁰ del receptor de la insulina (Myers y col., 1995). Al comparar la región N-terminal del IRS-1 y del IRS-2 se encuentran las dos regiones conservadas (IH) que se han designado como IH1^{PH} e IH2^{PTB} en base a la similitud con los dominios de homología a plectrina (PH) y a los dominios PTB (phosphotyrosine binding domains) existentes en diversas proteínas (Figura 2). El dominio IH1^{PH} contiene 109 aminoácidos y presenta una homología del 69% entre el IRS-1 y el IRS-2. El dominio IH2^{PTB} se encuentra separado del IH1^{PH} por una región variable de 40 aminoácidos y presenta una homología del 75% entre ambas proteínas IRS. Se ha identificado un tercer dominio que comprende los residuos 313-462 del IRS-1 (dominio SAIN) que presenta una homología baja entre el IRS-1 y el IRS-2. Se sospecha que este dominio regula la interacción de los IRSs con otras proteínas de la cascada de señalización sin estar implicado en la interacción de los IRSs con el receptor.

El dominio IH2^{PTB} interacciona con los residuos que se encuentran en la secuencia consenso NPXY presente en los receptores de insulina/IGF-I e interleukina 4. Por tanto, este dominio parece mediar la interacción de los IRSs con el receptor mediante la asociación con el residuo Tyr⁹⁶⁰ de este último (Gustafson y col., 1995).

ASOCIACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IRS-1/ IRS/2 CON DOMINIOS SH2

El receptor de la insulina, a diferencia de otros receptores tirosina quinasa se asocia pobremente con proteí-

nas que presentan dominios SH2 (dominios de 100 aminoácidos con homología a regiones no catalíticas del protooncogén src) (Myers y col., 1995). Sin embargo, las proteínas IRS funcionan como intermediarios entre el receptor de insulina y varias proteínas SH2 encargadas de transmitir la cascada de señalización al núcleo. A continuación describiremos las proteínas SH2 más importantes que interaccionan con las proteínas IRSs.

Fosfatidilinositol 3-quinasa

La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) fue la primera proteína con dominios SH2 que se encontró asociada con el IRS-1 (Sun y col., 1991) tras la estimulación con insulina o IGF-I. Se trata de un heterodímero compuesto por dos subunidades: una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110). La subunidad reguladora contiene dos dominios SH2 (Shepherd y col., 1998). En células neuronales se ha encontrado una subunidad reguladora de 55 kDa (p55^{PK}) que se asocia específicamente con el IRS-1 (Pons y col., 1995). El IRS-1 contiene al menos 4 regiones que interaccionan con los dominios SH2 de la p85: Y⁶⁰⁸MPM > Y⁹³⁹MNM > Y⁹⁸⁷MTM y Y⁴⁶⁰ICM (Sun y col., 1993). Esta asociación IRS-1/p85 es suficiente para activar el enzima, que fosforila el anillo de inositol en la posición 3' generando fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP).

Uno de los efectos más estudiados que ocurren en la célula como consecuencia de la estimulación por insulina o IGF-I es un aumento en el transporte de glucosa en los tejidos sensibles a insulina. Este hecho se produce gracias a la traslocación del transportador de glucosa sensible a insulina (GLUT4) desde compartimentos intracelulares al exterior de la célula (Lienhard y col., 1992). Estos resultados han sido posibles gracias al empleo de moléculas inhibitoras de la PI 3-quinasa (wortmanina y LY294002) que inhiben completamente el transporte de glucosa estimulado por insulina/IGF-I (Okada y col., 1994), así como por la utilización de mutantes dominantes negativos de la p85 (p85) que producen el mismo efecto que los compuestos inhibidores del enzima (Hara y col., 1994). Sin embargo, es importante señalar que la activación de la PI 3-quinasa mediada por otros receptores no induce aumentos en el transporte de glucosa.

A pesar de que la principal vía de activación de la PI 3-quinasa por la insulina tiene lugar por medio de la asociación de la p85 con las proteínas IRSs, se han descrito otros mecanismos que regulan la activación de la PI 3-quinasa. Rodríguez-Viciano y col., (1994) han descrito que la interacción de la p110 con la forma activa de la proteína p21ras (rasGTP) induce la actividad de la PI 3-quinasa. Sin embargo Hu y col., (1995) han propuesto que sería la PI 3-quinasa la molécula que activaría p21ras. Por tanto, podríamos decir que, dependiendo del sistema celular en estudio, se produciría uno u otro mecanismo.

Existen un gran número de evidencias que indican que la activación de la PI 3-quinasa es necesaria y en

algunos casos suficiente para iniciar algunas de las rutas de señalización estimuladas por insulina/IGF-I, lo que parece sugerir que la PI 3-quinasa es la cabeza de una cascada de transducción de señales. Entre las proteínas activadas por la PI 3-quinasa se encuentra la Akt/PKB. Se trata de una serina/treonina quinasa compuesta por un dominio de homología a plekstrina en la región amino terminal, seguido de un dominio catalítico y una región reguladora carboxilo terminal (Andjelkovic y col., 1995). Se han identificado tres isoformas de pKB (PKB α , PKB β y PKB γ), que se activan de distinta forma según los diferentes tejidos (Konishi y col., 1994, 1995, Walker y col., 1988). Numerosos datos indican que la activación de la PI 3-quinasa es necesaria y suficiente para la activación de todas las isoformas de la PKB por los factores de crecimiento. Además se ha demostrado que la activación de PKB es bloqueada tanto por los inhibidores químicos de la PI 3-quinasa como por los mutantes dominantes negativos de la p85 y de la propia PKB (Franke y col., 1995, Burgering y Coffey, 1995, Bos 1995, Andjelkovic y col., 1997, Meili y col., 1998). La activación de la PKB por la PI 3-quinasa se produce mediante la fosforilación reversible en los residuos Ser⁴⁷³ y Thr³⁰⁸. Recientemente se ha caracterizado una quinasa responsable de la fosforilación en Thr³⁰⁸, denominada PDK-1 (Alessi y col., 1997, Stephens y col., 1998). Además se ha observado que la PDK-1 presenta un dominio PH por el que se une a PIP₃, siendo probable que se induzca un cambio conformacional de manera que la Thr³⁰⁸ sea más accesible a la PDK-1. La quinasa responsable de la fosforilación de la PKB en el residuo Ser⁴⁷³ todavía no se ha identificado. Sin embargo se ha detectado su actividad y por ello se le ha denominado PDK-2.

Con respecto a los posibles sustratos de la PKB/Akt, el mejor caracterizado es la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3), que resulta inactivada por la fosforilación en el extremo N-terminal en respuesta a la insulina (Van Weeren y col., 1998). Por último, se ha descrito que la PKB activada estimula el transporte de glucosa y la traslocación del GLUT4 a la membrana plasmática (Ueki y col., 1998).

Recientemente se ha descrito la regulación de los miembros de la subfamilia de las proteína quinasa C (PKC) (concretamente las PKCs convencionales) por fosforilación por la PDK-1 (Duntil y col., 1998). Además, estudios realizados en varios laboratorios han sugerido que otros miembros de la familia de la proteína quinasa C son activados por los inositoles fosfato PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃, concretamente las PKC α , PKC β y PKC γ (Toker y Cantley 1997, Toker 1998). Sin embargo, estos resultados son muy dependientes de las condiciones experimentales empleadas. Recientemente se ha implicado la PKC α en la estimulación del transporte de glucosa (Bandyopadhyay y col., 1997).

Otra proteína que resulta activada por la PI 3-quinasa es la proteína p70 S6 quinasa (P70^{sk}) cuya función es la fosforilación de la proteína ribosomal S6. Se trata de un componente de la subunidad pequeña de los ribosomas y resulta fosforilada cuando se estimula la síntesis proteica (Proud, 1996). Recientemente se han encontrado

evidencias que indican la activación de la P70^{sk} por la activación de la PI 3-quinasa y de la PKB/Akt. Por tanto, la activación de la P70^{sk} resulta inhibida en presencia de los inhibidores químicos y dominantes negativos de la PI 3-quinasa (Chung y col., 1994, Shepherd y col., 1998). Además, la expresión constitutiva de un mutante activo de la PKB es capaz de activar la P70^{sk} (Kohn y col., 1998). Sin embargo, no se ha demostrado todavía la fosforilación directa de la P70^{sk} por PKB aunque la PDK-1 fosforila directamente la P70^{sk} en los residuos Thr²⁵² y Thr²²⁹ (Pullen y col., 1998). Por tanto, algunos autores consideran que PKB puede actuar por arriba o en paralelo a la activación de la P70^{sk}. La observación de que la fosforilación y activación de la P70^{sk}, es inhibida en presencia de rapamicina, sugiere que la única diana para la rapamicina en mamíferos mTOR podría ser un componente de la cascada de señalización de la insulina (Shepherd y col., 1998).

Fosfotirosina fosfatasa (SHP-2)

Se trata de una proteína SH2 con actividad tirosina fosfatasa que se encuentra expresada en todas las células de mamíferos. Esta proteína se encuentra también asociada a los receptores de PDGF y EGF. Durante la asociación de SHP-2 con estos receptores, esta fosfatasa se fosforila en residuos tirosina produciéndose un aumento significativo en su actividad fosfatasa. Sin embargo, el papel específico de SHP-2 en la cascada de señalización de insulina/IGF-I no está del todo claro. Recientemente se ha descrito la asociación de SHP-2 con el residuo Tyr¹¹⁴⁶ de la cadena β del receptor de la insulina (Kharitonov y col., 1995), lo cual podría contribuir a estabilizar la interacción receptor/IRS-1. Asimismo, Myers y col. (1998) han obtenido un mutante del IRS-1 sustituyendo las dos tirosinas del dominio C-terminal implicadas en la unión a SHP-2 por fenilalaninas. Dicho mutante mostraba mayores niveles de fosforilación en tirosina, así como mayor activación de la PI 3-quinasa. Por tanto, estos autores proponen que la asociación de IRS-1 con SHP-2 atenúa la cascada de señalización por debajo de IRS-1, así como los efectos metabólicos inducidos por la insulina.

Proteína adaptadora GRB-2

La proteína GRB-2 es una proteína citosólica pequeña que contiene dos dominios SH3 y un dominio SH2 mediante el cual interacciona con IRS-1 y IRS-2. El laboratorio de M. White ha estudiado en detalle la interacción IRS-1 con GRB-2. Estos autores han descrito que la mutación de la Tyr⁸⁹⁵ del IRS-1 por fenilalanina inhibe la asociación IRS-1/GRB-2 (Myers et al., 1994). La proteína GRB-2 es una molécula adaptadora que interacciona con la proteína mSOS por los dominios SH3. Esta proteína es una molécula intercambiadora de nucleótidos de guanina de la proteína p21ras. En células no estimuladas p21ras se encuentra unido a GDP. Tras la estimulación de las células con insulina se activa

p21ras mediante el intercambio de GDP por GTP. La proteína p21ras está codificada por una familia de genes (H-, K- y N- ras) y se encuentra anclada por farnesilación a la cara interna de la membrana plasmática. La proteína ras tiene actividad GTPásica intrínseca dependiente de una proteína de 120 kDa denominada GAP. La pérdida de la actividad GTPásica intrínseca de ras por una mutación puntual en el codón 12, 13 ó 61 produce una proteína ras permanentemente activa y altamente oncogénica implicada en numerosos tumores humanos (Santos y Nebreda 1989).

La activación de p21ras induce la traslocación a la membrana y la activación de alguno de los miembros de la familia de las Raf-quinasas (c-Raf, A-Raf y B-Raf), una serina/treonina quinasa que interacciona con p21rasGTP por un mecanismo todavía no bien establecido (Warne y col., 1993). De esta manera la proteína Raf quinasa activada fosforila y activa la proteína MEK (también conocida como MAP quinasa quinasa, MAPKK o MKK1/2), que a su vez fosforila y activa la MAP quinasa (Avruch y col., 1994). Además, las MAP quinastas se pueden traslocar al núcleo donde fosforilan una gran variedad de factores de transcripción (Chen y col, 1992, Davis 1993, Hill y Treisman 1995).

Tradicionalmente se ha implicado la ruta de las MAP quinasa en los procesos de proliferación y diferenciación celular. El IGF-I y la insulina, así como otros factores de crecimiento, activan las MAP quinastas en diferentes tipos celulares (Ray y Sturgill 1987, Porras y col, 1998, De Vries-Smits y col., 1992). Sin embargo, tal como detallaremos posteriormente, el papel de las MAP quinastas en la regulación del balance proliferación/diferenciación continúa sin conocerse completamente.

2. SHC

Otra proteína que resulta fosforilada por la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina/IGF-I es SHC. Esta proteína no es exclusiva de la señalización intracelular inducida por insulina/IGF-I, sino que también participa en las rutas de transducción de señales que conducen a la proliferación de muchos tipos celulares inducida por EGF, PDGF y NGF.

La estructura de SHC se muestra en la Figura 3. Esta proteína consta de 3 dominios diferentes: un dominio amino terminal denominado PTB (de phosphotyrosine binding domain) por el cual SHC se asocia con la secuencia NPX-Y(P) del receptor de insulina, un dominio de homología a colágeno rico en residuos de prolina y un dominio C-terminal también llamado dominio SH2 (Pelicci y col., 1992, Isakoff y col., 1996). En realidad SHC se compone de tres isoformas: p46^{SHC} y p52^{SHC} generadas por diferentes lugares del inicio de la traducción y p66^{SHC} que se genera por un procesamiento alternativo. La estimulación de las células por los factores de crecimiento mencionados conduce a la fosforilación en tirosina de SHC que conduce a la asociación con GRB-2. Esta asociación se produce a través del dominio SH2 de GRB-2 y el residuo Tyr³¹⁷ localizado en la región de homología a colágeno de SHC (Ishihara y col., 1997).

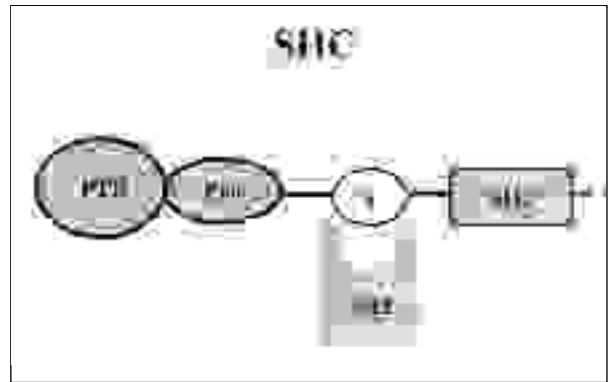


Fig. 3. Estructura de SHC.

Por tanto, esta asociación SHC/GRB-2 conduce a la activación de p21ras y por tanto, a la activación de las MAP quinastas (Skolnik y col., 1993). Recientemente se han descrito otras proteínas que se asocian con SHC como son: la tirosina fosfatasa PEST (Habib y col., 1994) que se asocia a los residuos Ser⁵ y Ser²⁹ de SHC, las adaptinas implicadas en la endocitosis del receptor que se asocian a los aminoácidos 346-355 en el dominio de homología a colágeno (Okabayashi y col., 1997) y por último una fosfoproteína de 145 kDa llamada SHIP que se une a los aminoácidos 46-232 del extremo amino terminal de SHC y es una inositol-fosfatasa (Damen y col., 1996). Sin embargo, solamente la asociación SHC/GRB-2 vía Tyr³¹⁷ es esencial para la activación de las MAP quinastas (Ishihara y col., 1997).

3. OTROS SUBSTRATOS DEL RECEPTOR DE INSULINA/IGF-I

Además de IRS-1/2 y SHC en los últimos años diversos grupos de investigación han encontrado nuevas moléculas sustrato del receptor de insulina. Dentro de la familia de los IRSs se incluyen dos nuevos miembros: IRS-3 e IRS-4. El IRS-3 se purificó a partir de adipocitos blancos de rata estimulados con insulina (Lavan y col., 1997a). Esta proteína de 60 kDa se fosforila en tirosina en respuesta a insulina y en consecuencia se asocia preferentemente a la subunidad p85 de la PI 3-quinasa y a la fosfatasa SHP-2 (Ross y col., 1998). Con respecto al IRS-4, esta proteína de 160 kDa se encontró en células de riñón de embrión humano (células HEK) (Lavan y col., 1997b) y se asocia principalmente a la p85 y a GRB-2 en respuesta a insulina (Fantin y col., 1998).

Mediante la utilización de la técnica del doble híbrido se han encontrado una nuevas proteínas sustrato del receptor de insulina/IGF-I: la proteína Grb10 que se asocia tanto al receptor de insulina como al del IGF-I (Laviola y col., 1997) y la proteína Gab1 que se asocia al receptor de insulina así como a la p85 y a SHP-2 (Rocchi y col., 1998). Por último, Ohan y col. (1998) han descrito un nuevo sustrato del receptor de insulina, la proteína xIRS-u, cuyo dominio PH parece inhibir la señalización intracelular de la insulina.

PAPEL DE LA INSULINA Y EL IGF-I EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LOS ADIPOCITOS MARRONES FETALES

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de células mesenquimáticas no fibroblásticas, los adipocitos marrones fetales de rata, que expresan un alto número de receptores de alta afinidad tanto para la insulina como para el IGF-I (Lorenzo y col., 1993, Teruel y col., 1996). Por tanto, este modelo celular resulta interesante para el estudio de los mecanismos moleculares de proliferación y diferenciación celular inducidos por estas moléculas en condiciones fisiológicas en células primarias, sin tener que recurrir a la que sobreexpresión de los receptores.

En este sistema celular el IGF-I "per se" actúa como un mitógeno, induciendo la síntesis de DNA, y duplicando el número de células cada 48 horas. Este factor induce la transcripción de un grupo de genes relacionados con la proliferación celular de forma gradual en el tiempo: C-fos a 30 minutos, c-myc a 2 h, H-ras a 4 h y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (un gen implicado en la formación de ribosa 5-fosfato para la replicación del DNA) a 24 h. Igualmente, el IGF-I aumenta la cantidad de proteína PCNA (cofactor de la DNA polimerasa) que es un marcador de la fase S del ciclo celular (Valverde y col., 1991, Lorenzo y col., 1993, Valverde y col., 1995, Benito y col., 1996). Por todo ello, podemos decir que el IGF-I se comporta en adipocitos marrones fetales primarios como un auténtico factor de crecimiento, de potencia similar al suero fetal bovino. Así, nuestro siguiente objetivo fue caracterizar la cascada de señalización intracelular por la cual el IGF-I ejercía sus acciones mitogénicas en estas células. Para ello, adipocitos marrones quiescentes (cultivados en ausencia de suero durante 20 h) se estimularon con dosis fisiológicas de IGF-I (1,4-14 nM) durante 5 minutos encontrándose un aumento muy rápido de la autofosforilación de la cadena del receptor del IGF-I (Valverde y col., 1996). En consecuencia, se producían aumentos paralelos en la fosforilación en tirosina de las proteínas IRS-1, IRS-2 y SHC (Valverde y col., 1996, 1998a) que conducían a un aumento en la cantidad de proteína activa rasGTP. A partir de este momento encontramos que la cascada mitogénica inducida por el IGF-I divergía hacia el núcleo implicando la activación de dos serina/treonina quinasa: Raf-1 quinasa y la proteína quinasa C (isoforma de la PKC que Díaz Meco y col., 1994 describieron como proteína efectora de ras), y en consecuencia activaban las MAP quinasa. La activación de estas proteínas (Raf-quinasa y PKC) era bloqueada en presencia de agentes elevadores de los niveles de AMP cíclico intracelulares, y representan un punto de regulación negativa descrito por primera vez en la ruta de activación mitogénica del IGF-I.

Además del papel mitogénico del IGF-I en los adipocitos marrones fetales de rata, el IGF-I es un factor que induce, simultáneamente a la mitogénesis, la diferenciación de estas células induciendo tanto la síntesis lipídica como la expresión de la proteína desacoplante (UCP1) que constituye el marcador específico de la fun-

ción termogénica del tejido adiposo marrón (Lorenzo y col., 1993). En un intento de dilucidar la cascada de señalización intracelular por la cual el IGF-I induce la diferenciación de este tejido, se procedió al tratamiento de los adipocitos marrones con inhibidores específicos de la PI 3-quinasa en ausencia o presencia del IGF-I. La inhibición de la actividad PI 3-quinasa en estas células conducía a la inhibición total de la expresión de los RNAs mensajeros de las enzimas lipogénicas, así como de la expresión de la UCP1 (Valverde y col., 1997a). Además, el transporte de glucosa inducido en presencia de dosis fisiológicas de IGF-I se inhibía tras el pretratamiento de las células con los inhibidores de la PI 3-quinasa. Asimismo, la presencia de los inhibidores de la PI 3-quinasa inhibía la transactivación del promotor de la UCP1 (Teruel y col., 1998). Como se ha descrito anteriormente dos moléculas situadas por debajo de la PI 3-quinasa en la cascada de señalización son la proteína quinasa C (PKC) y la p70⁶ quinasa. La inhibición de la PI 3-quinasa conducía a una inhibición paralela de la p70⁶ quinasa. Asimismo, la expresión de los genes adipogénicos y termogénicos inducida por el IGF-I resultaba parcialmente inhibida en presencia de rapamicina, un inhibidor específico de la p70⁶ quinasa. Por tanto, estos resultados indicaban que otras moléculas diana de la PI 3-quinasa podrían participar en la señalización intracelular que conduce hasta el núcleo donde se regula la expresión génica. En este sentido, se había descrito que la proteína quinasa C era activada por los inositoles fosfato (PIP₃) resultantes de la acción de la PI 3-quinasa sobre los lípidos de membrana. Así, la actividad de la PKC inducida por el IGF-I en los adipocitos marrones se bloqueaba totalmente en presencia de los inhibidores de la PI 3-quinasa. Estos resultados implicaban por primera vez a la PI 3-quinasa como molécula intermediaria en la propagación de la señal intracelular que conduce al núcleo para regular la expresión de los genes implicados en la diferenciación adipogénica y termogénica del tejido adiposo marrón. Sin embargo, la mitogénesis de los adipocitos marrones inducida por el IGF-I se mostraba independiente de la PI 3-quinasa. En las figuras 4 y 5 se muestra un esquema de las rutas de señalización por las cuales el IGF-I induce la proliferación y diferenciación de los adipocitos marrones fetales.

Además del IGF-I, la insulina es un potente inductor de la diferenciación del tejido adiposo marrón en la etapa fetal (Valverde y col., 1992). La expresión de genes adipogénicos y termogénicos se induce en presencia de esta hormona alcanzándose niveles mayores en comparación con el IGF-I (Teruel y col., 1996, 1998). Además, el adipocito marrón fetal presenta también un elevado número de receptores con alta afinidad para la insulina, lo que también nos ha permitido estudiar las rutas de transducción de señales inducidas por esta hormona en nuestro modelo de cultivo primario en condiciones fisiológicas (Valverde y col., 1997b, 1998a).

En relación con el adipocito marrón como modelo celular adecuado para investigar la acción de la insulina, hemos estudiado la cascada de señalización intracelular inducida por esta hormona paralelamente en 3 sistemas celulares: células primarias, adipocitos marrones inmor-

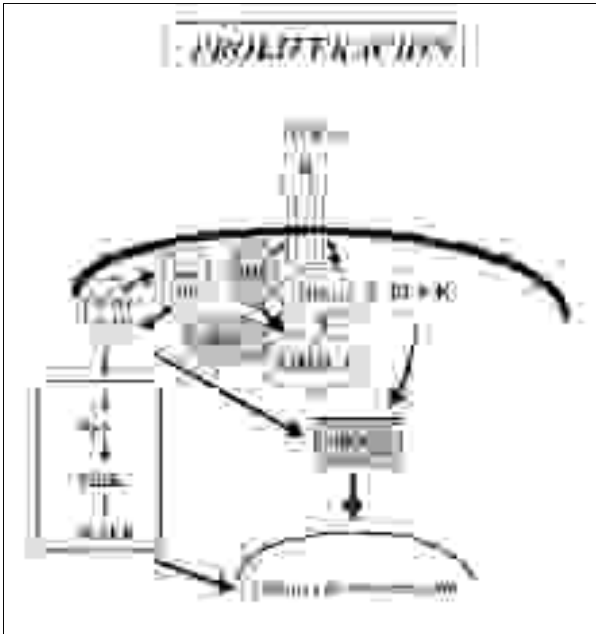


Fig. 4. Rutas de transducción de señales que conducen a la proliferación de los adipocitos marrones fetales.

mente necesarios para la activación de la PI 3-quinasa y por tanto, para la diferenciación adipogénica y termogénica del tejido adiposo marrón. Sin embargo, solamente IRS-1 y SHC se asocian con la proteína GRB-2 que conduce a la ruta ras/MAP quinasa responsable de la proliferación de estas células (Valverde y col., 1998a).

Las líneas celulares obtenidas por inmortalización y transformación por H-ras^{lys12} (MB 1.3.19) fueron caracterizadas en detalle por citometría de flujo: tamaño, ciclo celular, contenido en lípidos citosólicos... (Lorenzo y col., 1996). La sobreexpresión de la proteína p21ras permanentemente activa en los adipocitos marrones inducía la expresión de los genes adipogénicos y termogénicos en ausencia de insulina o IGF-I así como el transporte de glucosa (Valverde y col., 1998b), es decir, la proteína p21ras estaba directamente implicada en la diferenciación del tejido. Con respecto a la ruta de señalización implicada en este proceso de diferenciación inducido por sobreexpresión de ras, los adipocitos marrones transformados con el oncogén ras activo desarrollaban una importante resistencia a la acción de la insulina en los eventos moleculares por encima de ras, es decir, mostraban un descenso muy significativo en la autofosforilación del receptor, asociación con los IRSs, activación de PI 3-quinasa... etc. Sin embargo, tanto la cantidad de ras.GTP como los eventos por debajo de ras se encontraban permanentemente activos, no observándose respuesta a la insulina. Los resultados descritos en este trabajo (Valverde y col., 1997b) indican que la activación permanente de ras en los adipocitos marrones conlleva la activación de proteínas serina/treonina quinasa que fosforilan al receptor de la insulina en residuos serina/treonina a la vez que impiden la autofosforilación en tirosina del receptor y por tanto, la transmisión de la señal. La identificación de las proteínas implicadas en estas fosforilaciones será objeto de futuros trabajos.

talizados por el antígeno T del virus SV⁴⁰ (línea MB 4.9.2) y adipocitos marrones inmortalizados transformados con el oncogén ras permanentemente activo H-ras^{lys12} (línea MB1.3.19). Con respecto a la señalización de la insulina en la célula primaria, uno de nuestros objetivos ha sido el intentar definir la contribución de los sustratos del receptor de la insulina IRS-1, IRS-2 y SHC a las rutas de transducción de señales inducidas por la insulina. Los resultados obtenidos en este estudio indicaban que ambos IRSs (IRS-1 e IRS-2) son igual-

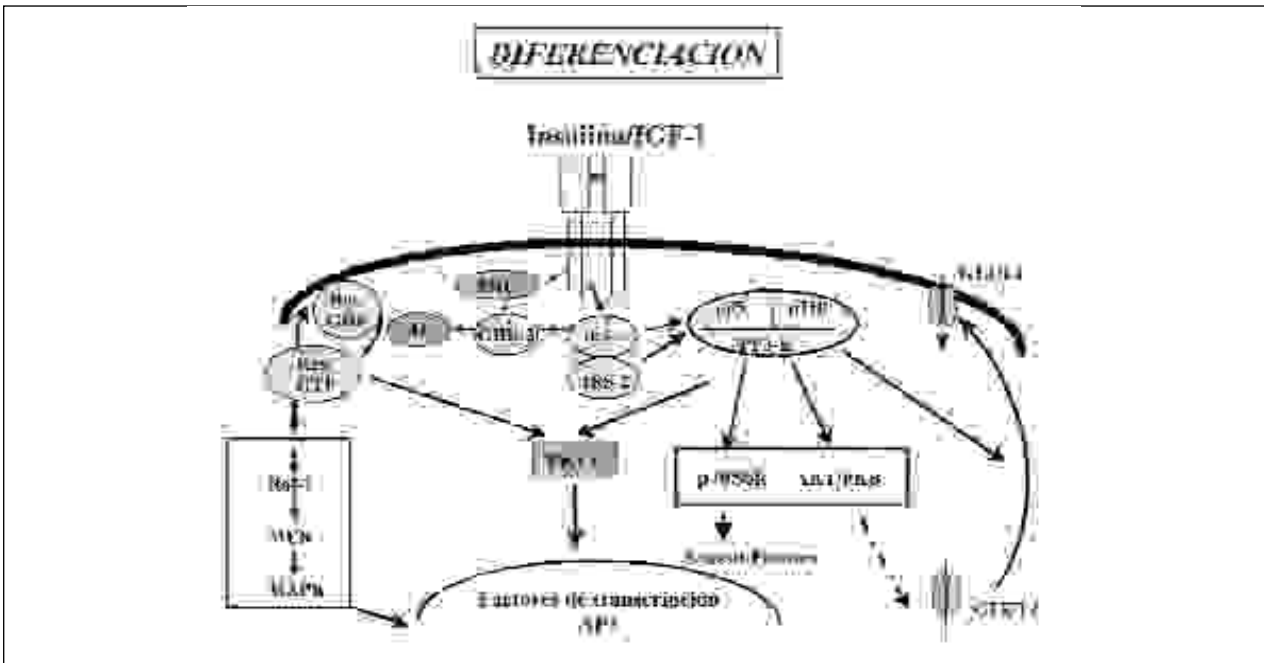


Fig. 5. Rutas de transducción de señales que conducen a la diferenciación de los adipocitos marrones fetales.

Actualmente los modelos animales con ratones delecionados de IGF-I, IGF-IR, IRS-1, IRS-2 y algunas líneas celulares que se han obtenido recientemente derivadas de estos animales constituyen nuevas herramientas de trabajo muy útiles para asociar la pérdida de alguna de estas moléculas con alteraciones en la ruta de señalización de insulina/IGF-I, así como con alteraciones en los procesos de proliferación/diferenciación celu-

lares. En nuestro laboratorio en los últimos meses hemos realizado estudios en líneas celulares de adipocitos marrones inmortalizados procedentes de ratones delecionados de IRS-1 (IRS-1^{-/-}) que demuestran que la ruta IRS-1/PI 3-quinasa/Akt es necesaria para mantener la síntesis lipídica inducida por la insulina en estas células.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbot AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM and Smith RJ (1992) Insulin-like growth factor receptor gene structure. *J Biol Chem* 267, 10759-10763
2. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB and Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Ba. *Curr Biol* 7, 261-269.
3. Andjelkovic M, Alessi DR, Meeier R, Fernandez A, Lambb NJC, Freech M, Cron P, Lucocq JM and Hemmings BA (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272, 31515-31524.
4. Araki E, Sun X, Haag BL, Chuang LM, Zhang Y, Yang-Feng TL, White MF and Kahn RC (1993) Human skeletal muscle insulin receptor substrate-1: characterization of the cDNA, gene and chromosomal localization. *Diabetes* 42, 1041-1054.
5. Avruch J, Zhang XF, and Kyriakis JM (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 19, 279-283.
6. Bandyopadhyay GML, Standaert L, Zhao Y, Bingzhi A, Avignon L, Galloway P, Karnam J, Moscat J and Fareese RV (1997) Activation of protein kinase C (, , and) by insulin in 3T3-L1 cells. Transfection studies suggest a role of PKC z in glucose transport. *J Biol Chem* 272, 2551-2558.
7. Benito M, Valverde AM, and Lorenzo M (1996) IGF-I: A mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 28(5), 499-510.
8. Bos JL (1995) A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB. *Trends Biochem Sci.* 20, 441-442.
9. Burgering BMT and Coffey PJ (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.
10. Chen R-H, Sarnecki Ch and Blenis J (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12, 915-927.
11. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A and Blenis J (1994) PDGF- and insulin-dependent pp70^{src} activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370, 71-75.
12. Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268, 14553-14556.
13. Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW and Krystal G (1996) The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1689-1693.
14. De Vries-Smits AMM, Burgering BMT, Leeyers SJ, Marshall CJ and Bos JL (1992) Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 357, 602-604.
15. Diaz-Meco MT, Lozano J, Muncio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L, Moscat J (1994) Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C . *J Biol Chem* 269, 31706-31710.
16. Duntill EM, Toker A and Newton AC (1998) Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1). *Curr Biol* 8, 1366-1375.
17. Fantin VR, Sparling JD, Slot JW, Keller SR, Lienhard GE and Lavan BE (1998) Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 273, 10726-10732.
18. Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR and Tsichlis PN (1995) The protein kinase encoded by the AKT protooncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.
19. Gustafson TA, He W, Craparo A, Schaub CD and O'Neill TJ (1995) Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and IRS-1 with the NPEY motif of the insulin receptor via novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 15, 2500-2508.
20. Habib T, Herrera R and Decker SJ (1994) Activators of protein kinase C stimulate association of Shc and the PEST tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 269, 25243-25246.
21. Hara K, Yonezawa K, Sakaue H, Ando A, Kotani K, Kitamura T, Kitamura Y, Ueda H, Sephens L and Jackson TR (1994) 1-Phosphatidylinositol 3-quinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for ras activation in CHO cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7415-7419.
22. Hill CS and Treisman R (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanism and specificity. *Cell* 80, 199-211.
23. Hu Q, Klippel A, Muslin AJ, Fantl WJ and Williams LT (1995) Ras-dependent induction of cellular response by constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* 268, 100-102.
24. Isakoff SJ, Yan-Ping Y, Yi-Chi S, Blaikie P, Yajnik V, Rose E, Weidner KM, Sachs M, Margolis B and Skolnik EY (1996) Interaction between the phosphotyrosine binding domain of Shc and the insulin receptor is required for Shc phosphorylation by insulin in vivo. *J Biol Chem* 271, 3959-3962.
25. Ishiara H, Sasaoka T, Ishiki M, Takata Y, Imamura T, Usui I, Langloiss WJ, Sawa T and Kobayashi M (1997) Functional importance of Shc tyrosine 317 on insulin signaling in Rat1 fibroblasts expressing insulin receptors. *J Biol Chem* 272, 9581-9586.
26. Jones JI and Clemmons DR (1995) Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Rev* 16, 1-34.
27. Jullien D, Tanti JF, Heydrick SJ, Gautier N, Gremaux T, Van Obbergen E, Le Marchand-Brustel Y (1993) Differential effects of okadaic acid on insulin-stimulated glucose and amino-acid uptake and phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Biol Chem* 268, 15246-15251.
28. Kharitonov A, Schekenburger J, Chen Z, Knyazev P, Ali S, Zwick E, White MF and Ullrich A (1995) Adapter function of protein tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction. *J Biol Chem* 270, 29189-29193.
29. Kohn AD, Barthel A, Kovacina KS, Boge A, Wallach B, Summers SA, Birnbaum MJ, Scott PH, Lawrence JC Jr and Roth RA (1998) Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt. *J Biol Chem* 273, 11937-11943.
30. Konishi H, Kuroda S, Tanaka M, Matsuzaki H, Ono Y, Kameyama K, Haga T and Kikkawa U (1995) Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family-association of the pleckstrin homology domain of 3 types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and -subunits of G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 526-534.
31. Konishi H, Shinomura T, Kuroda S, Ono Y and Kikkawa U (1994) Molecular cloning of rat RAC protein kinase and their association with protein kinase C . *Biochem Biophys Res Commun* 205, 817-825.
32. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR and

- Lienhard GE (1997b) A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 21403-21407.
33. Lavan BE, Lane WS and Lienhard GE (1997a) The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272, 11439-11443.
 34. Laviola L, Giorgino F, Chow JC, Baqueero JA, Hansen H, Ooi J, Zhu J, Riedel H and Smith RJ (1997) The adapter protein Grb10 associates preferentially with the insulin receptor as compared with the IGF-I receptor in mouse fibroblasts. *J Clin Invest* 99, 830-837.
 35. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D and Roberts Jr CT (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine Rev* 16, 143-163.
 36. Lienhard GE, Slot JW, James DE and Mueckler MM (1992) How cells absorb glucose. *Scientific American* 266, 86-91.
 37. Lorenzo M, Valverde AM, Teruel T, Alvarez A and Benito M (1996) p21-ras induced differentiation-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cells and cell lines. *Cell Growth Differ* 7, 1251-1259.
 38. Lorenzo M, Valverde AM, Teruel, T and Benito M (1993) IGF-I is a mitogen involved in differentiation-related gene expression in fetal rat brown adipocytes. *J Cell Biol* 123, 1567-1575.
 39. Meili R, Cron P, Hemmings BA and Ballmer-Hofer K (1998) Protein kinase B/Akt is activated by polyomavirus middle-T antigen via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Oncogene* 16, 903-907.
 40. Miralpeix M, Sun X, Backer JM, Myers MG Jr, Araki E and White MF (1992) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in FAO hepatoma cells. *Biochemistry* 31, 9031-9039.
 41. Myers MG Jr., Mendez R, Shi P, Pierce JH, Rhoads R and White MF (1998) The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J Biol Chem* 273, 26908-26914.
 42. Myers MG Jr, Grammer TC, Brooks J, Glasheen EM, Wang LM, Sun XJ, Blenis J, Pierce JH and White MF (1995) The plekstrin homology domain in IRS-1 sensitizes insulin signaling. *J Biol Chem* 270, 11715-11718.
 43. Myers MG Jr, Xiao Jr JS and White MF (1994) The IRS-1 signalling system. *Trends Biochem Sci* 19, 289-294.
 44. Ohan N, Baya M, Kumar P, Zhu L and Liu XJ (1998) A novel insulin receptor substrate protein, α IRS-u, potentiates insulin signaling: functional importance of its pleckstrin homology domain. *Mol Endocrinology* 12, 1086-1098.
 45. Okabayashi Y, Sugimoto Y, Totty NF, Hsuan J, Kido Y, Sakaguchi K, Gout I, Waterfield MD and Kasuga M (1997) Interaction of Shc with adaptor protein adaptins. *J Biol Chem* 271, 5265-5269.
 46. Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, and Ui M (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. *Biochem J* 269, 3568-3573.
 47. Pellici GL, Lanfrancone F, Grignani J, McGlade F, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T and Pellici PG (1992) A novel transforming protein (shc) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70, 93-104.
 48. Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fischer TL, Myers MG Jr, Sun XJ and White MF (1995) Structure and function of p55^{shc} reveals a new regulatory subunit for the phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 15, 4453-4465.
 49. Porras A, Alvarez AM, Valladares A and Benito M (1998) p42/p44 Mitogen-activated protein kinases activation is required for the Insulin-like growth factor-I/insulin induced proliferation, but inhibits differentiation, in rat fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 12, 825-834.
 50. Proud CG (1996) p70 S6 kinase: an enigma with variations. *Trends Biochem Sci* 21, 181-185.
 51. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovich M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA and Thomas G (1998). Phosphorylation and activation of p70^{s6k} by PDK1. *Science* 279, 707-710.
 52. Ray LB and Sturgill TW (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1502-1506.
 53. Rocchi S, Tartare-Deckert S, Murdara J, Holgado-Madruga M, Wongg AJ and Van Obbergen E (1998) Determination of Gab1 (Grb2-associated binder-1) interaction with insulin receptor-signaling molecules. *Mol Endocrinol* 12, 914-923.
 54. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD and Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-532.
 55. Ross SA, Lienhard GE and Lavan BE (1998) Association of insulin receptor substrate 3 with SH2 domain-containing proteins in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 287-292.
 56. Santos E and Nebreda AR (1989) Structural and functional properties of ras proteins. *FASEB J* 3, 2151-2163.
 57. Seino S, Sieno M and Bell GI (1990) Human insulin-receptor gene. *Diabetes* 39, 129-133.
 58. Shepherd PR, Withers DJ and Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333, 471-490.
 59. Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ Jr, Baker JM, Ullrich A, White MF and Schlessinger J (1993) The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and SHC: implications for insulin control of ras signaling. *EMBO J* 12, 1929-1936.
 60. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PRJ, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J and Hawkins PT (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710-714.
 61. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ and White MF (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 353, 73-77.
 62. Sun XJ, Crimmins DL, Myers MG Jr, Miralpeix M and White MF (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol Cell Biol* 13, 7418-7428.
 63. Sun XJ, Weng L, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH and White MF (1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 377, 173-177.
 64. Teruel T, Valverde AM, Benito M and Lorenzo M (1996) Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in foetal brown adipocyte primary cultures. *Biochem J* 319, 627-32.
 65. Teruel T, Valverde AM, Navarro P, Benito M and Lorenzo M (1998) Inhibition of PI 3-kinase and Ras blocks IGF-I and insulin-induced uncoupling protein 1 gene expression in brown adipocytes. *J Cell Physiol* 176(1), 99-109.
 66. Toker A (1998) Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* 8, 1069-77.
 67. Toker A and Cantley LC (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387, 673-676.
 68. Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BMTh, Coffey PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y and Kadowaki T (1998) Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem* 273, 5315-5322.
 69. Valverde AM, Benito M and Lorenzo M (1991) Proliferation of fetal brown adipocyte primary cultures: Relationship with the genetic expression of glucose 6 phosphate dehydrogenase. *Exp Cell Res* 194, 232-237.
 70. Valverde AM, Benito M and Lorenzo M (1992) Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate-dehydrogenase expression in fetal brown adipocyte primary cultures under non-proliferative conditions. *Eur J Biochem* 203, 313-319.
 71. Valverde AM, Lorenzo M, Navarro P and Benito M (1997a) Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 11:595-607.
 72. Valverde AM, Lorenzo M, Pons S, White M and Benito M (1998a) IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/IGF-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol* 12, 688-697.
 73. Valverde AM, Lorenzo M, Teruel T and Benito M (1995) cAMP

- inhibits IGF-I-induced mitogenesis in fetal rat brown adipocytes: role of p21 ras. *Exp Cell Res* 218, 305-309.
74. Valverde AM, Lorenzo M, Teruel T and Benito M (1997b) Alterations in the insulin signaling pathways induced by immortalization and H-ras transformation of brown adipocytes. *Endocrinology* 138, 3195-3206.
 75. Valverde AM, Navarro P, Benito M and Lorenzo M (1998b) H-ras induces glucose uptake in brown adipocytes in an insulin and phosphatidylinositol 3-kinase independent manner. *Exp Cell Res* 243, 274-281.
 76. Valverde AM, Teruel T, Lorenzo M and Benito M (1996) Involvement of Raf-1 kinase and protein kinase C in Insulin-like growth factor I-induced brown adipocyte mitogenic signaling cascades: inhibition by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 137, 3832-3841.
 77. Van Weeren PC, De Bruyn KMT, De Vries-Smits AMM, Van Lint J and Burgering BMTh (1998) Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem* 273, 13150-13156.
 78. Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P and Alessi DR (1998) Activation of protein kinase B and isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B. *Biochem J* 331, 299-308.
 79. Warne PH, Rodriguez-Viciana P and Downward J (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364, 352-355.
 80. White MF (1997) The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40, S2-S17.
 81. White MF and Kahn CR (1994) The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269, 1-4.
 82. White MF, Livingstone JN, Backer JM, Lauris V, Dull TJ, Ullrich A, Kahn CR (1988a) Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* 54, 641-649.
 83. White MF, Schoelson SE, Ketumann H and Kahn CR (1988b) A cascade of tyrosine autophosphorylation in the β -subunit activates the insulin receptor. *J Biol Chem* 263, 2969-2980.

Receptores y factores de crecimiento tirosina-quinasa

M. LORENZO, A. M. VALVERDE

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

La integración de las múltiples señales que coordinan la proliferación y el metabolismo celular, inician la diferenciación y prolongan la supervivencia de las células, es un problema biológico complicado. La interacción de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, con receptores específicos de membrana, desencadena una cascada de señales bioquímicas intracelulares que conducen a la activación o represión de un grupo de genes que controlan el equilibrio entre estos procesos (Figura 1). Este equilibrio exquisito se produce durante el *Desarrollo* del embrión humano, donde los factores de creci-

miento ponen en marcha simultánea y coordinadamente procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis que darán lugar a la formación del nuevo individuo. Las aberraciones genéticas que pueden producirse en estos factores de crecimiento, en sus receptores o en sus vías de transducción de señales también pueden romper el equilibrio celular, conduciendo a un crecimiento anormal, al *Cáncer*. Desarrollo y Cáncer representan los aspectos fisiológicos y patológicos del equilibrio celular.

En este tema vamos a estudiar las señales intracelulares desencadenadas por factores de crecimiento que tie-

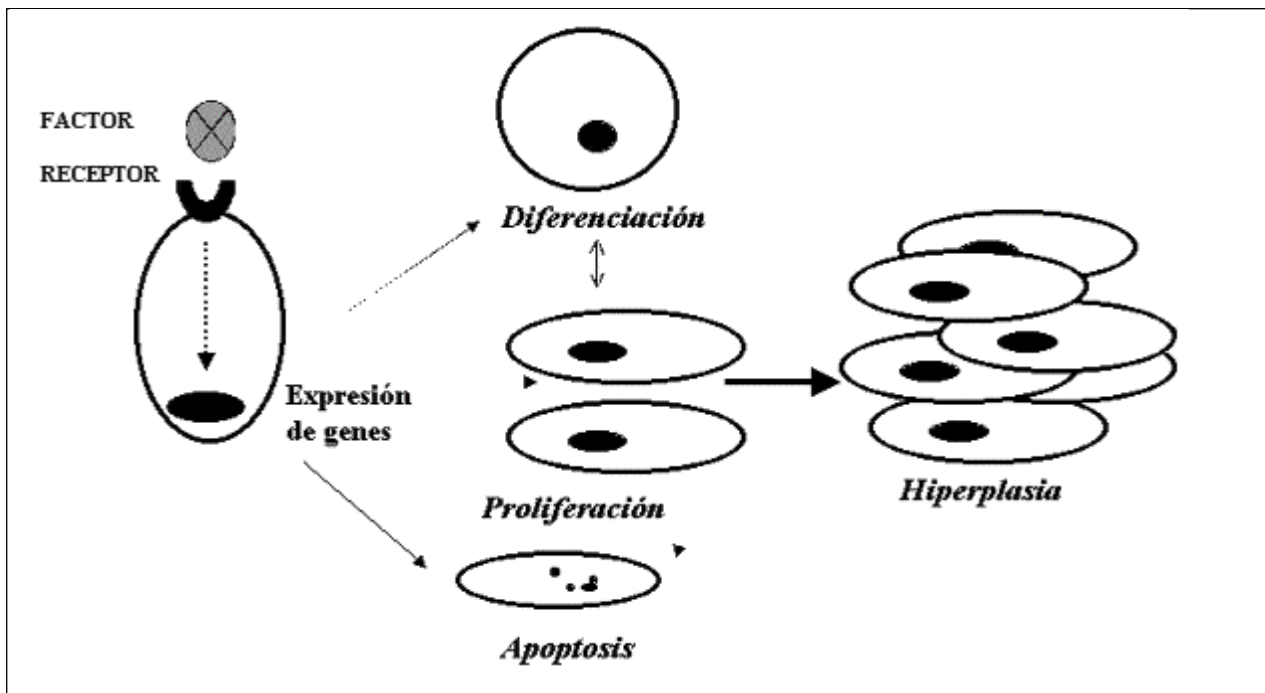


Fig. 1. Los factores extracelulares controlan el equilibrio entre procesos celulares.

nen en común una actividad tirosina-quinasa asociada a su receptor (*RTQ*) en su dominio citoplasmático, con una topología molecular bastante similar donde las principales diferencias se encuentran a nivel del dominio extracelular de unión al ligando (Ullrich y Schlessinger, 1990). Esta familia acoge a un gran número de factores, entre ellos al PDGF, que es un factor de proliferación y supervivencia para células mesenquimales; al EGF y el HGF, que son factores de proliferación, diferenciación y supervivencia para células epiteliales; el NGF, un factor de supervivencia neuronal; el CSF-1, que actúa sobre monocitos y macrófagos, y el IGF-I, que además de controlar procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia en muchos tipos celulares, también presenta efectos metabólicos en muchos tejidos.

DIMERIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LOS RTQ

La unión del ligando al RTQ produce dimerización y autofosforilación del receptor, así como estimulación de la actividad tirosina-quinasa del mismo que fosforila numerosas proteínas diana, lo que conduce a cambios a nivel citoplasmático y finalmente, a cambios a nivel nuclear. El prototipo a estudiar es el PDGF, un homo- o heterodímero de dos cadenas peptídicas relacionadas, A (17 kDa) y B (16 kDa), unidas por puentes disulfuro. La cadena B es estructural y funcionalmente muy similar a la proteína transformante ν -Sis, del virus del sarcoma de simio. Este factor se identificó por primera vez en plaquetas y permite el crecimiento de fibroblastos, células musculares y gliales. También parece tener un papel importante en el desarrollo de la placenta y el embrión, como indican los experimentos realizados en ratones homocigotos delecionados para los receptores PDGF, que morían antes del nacimiento mostrando grandes desordenes tisulares. Numerosas células tumorales, así como normales, sintetizan PDGF y un alto espectro de tipos celulares expresan receptores para dicho factor (Benito y Lorenzo, 1993; Claesson-Welsh, 1994). Se han identificado dos receptores relacionados estructuralmente para el PDGF, el PDGF-R (1063 aa) y el PDGF-R (1067 aa), presentando distintas afinidades por las isoformas AA, AB y BB de PDGF. Los receptores son glicoproteínas transmembranales que forman junto con el CSF-1 receptor y el producto c-Kit una subfamilia dentro de la superfamilia de receptores tirosina-quinasa. Se caracterizan por un dominio extracelular grande y glucosilado con 5 dominios tipo inmunoglobulina (Ig), una región transmembranal hidrofóbica y un dominio citoplasmático que contiene la actividad tirosina-quinasa que está interrumpida por una secuencia de inserción no catalítica e hidrofílica de longitud variable (Malarkey y col., 1995). La unión del PDGF con su receptor se produce sobre los tres dominios tipo Ig amino-terminales e implica un cambio conformacional en el dominio citoplasmático que conduce a una dimerización del receptor, lo cual es un fenómeno universal entre los RTQ que constitutivamente no son dímeros. Esto origina la estimulación de la actividad tirosina-quinasa intrínseca, produciendo la fosforilación cruzada de

una cadena sobre la otra en numerosos residuos tirosina (Tyr), así como la fosforilación de otros sustratos (Weiss y Schlessinger, 1998). Los residuos Tyr que resultan fosforilados tienen un doble propósito, controlar el grado de actividad de la quinasa (como es el caso del residuo Tyr-857) y crear sitios de unión para moléculas de transducción, las cuales en muchos casos también son fosforiladas por la actividad quinasa del receptor. Estos últimos residuos Tyr-P (*pY*) se localizan tanto en el dominio juxtamembranal, como en la inserción del dominio quinasa o en la región carboxi-terminal del receptor PDGF (Heldin y col., 1998).

MOLÉCULAS QUE INTERACCIONAN CON EL RTQ FOSFORILADO; DOMINIOS ESPECÍFICOS

Las moléculas de transducción que interaccionan con los residuos *pY* de los RTQ son proteínas *quinasas*, proteínas *fosfatasa*s o *proteínas adaptadoras* que son características para cada receptor y que, en general, dan lugar a la activación de diferentes rutas de transducción de señales (Figura 2). Los residuos de *pY* sirven como sitio de unión para estas proteínas blanco, lo que requiere la existencia en las moléculas de transducción de dominios específicos, del tipo SH2 y PTB. Los dominios de reconocimiento SH2 (regiones conservadas de unos 100 aa con homología por regiones no catalíticas de Src) reconocen residuos *pY* y los tres residuos aminoácidos adyacentes en C-terminal, por ejemplo *pY-AAS*. Muchas proteínas blanco contienen además otro dominio de homología con Src, SH3, regiones de unos 50 aa de interacción con otras moléculas que reconocen secuencias ricas en prolina. Entre las proteínas que se asocian físicamente con el receptor por dominios SH2 podemos considerar dos clases, las que presentan activi-

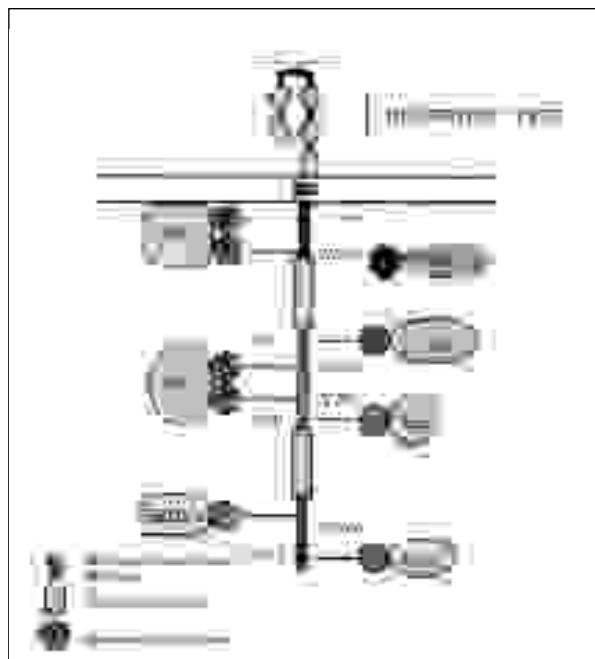


Fig. 2. Unión de moléculas transductoras a tirosinas fosforiladas del receptor PDGF.

dad enzimática (PI 3-quinasa, Ras-GAP, fosfolipasa C, Src, SHPTP2 y STATs) y las proteínas adaptadoras, que además de los dominios SH2 presentan dominios SH3 para interactuar con otras moléculas señalizadoras (entre estas se incluyen Grb2 y SHC) (Quon y col., 1994). Los dominios PTB se han encontrado fundamentalmente en las proteínas SHC e IRSs y reconocen la secuencia NPX-pY presente en receptores de EGF, IGF-I, NGF y en receptores de citoquinas (Myers y White, 1995) (Figura 3). Además existe un motivo estructural presente en muchas moléculas señalizadoras, el dominio PH o de homología con pleckstrina, que no reconoce pY pero que está implicado en interacciones con fosfolípidos y en el anclaje transitorio a la membrana plasmática. A continuación describiremos todas estas moléculas de interacción con los RTQ activados, agrupándolas en las principales rutas de señalización que utilizan y ciñéndonos en lo posible a nuestro prototipo, el receptor PDGF.

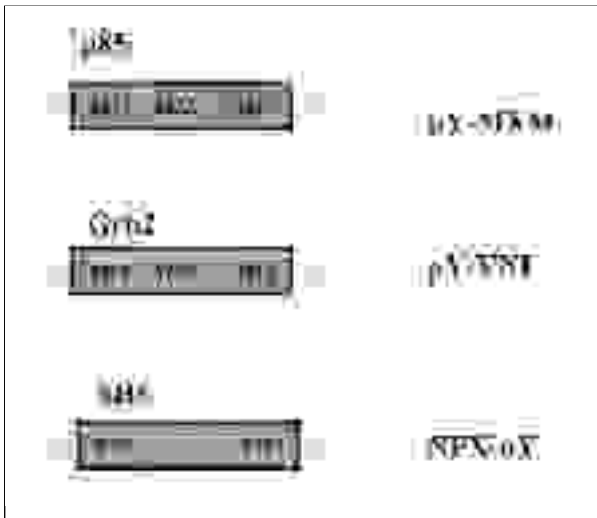


Fig. 3. Dominios de reconocimiento de fosfotirosinas.

RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE RAS/RAF/MAP QUINASAS

Grb2 es una pequeña molécula adaptadora que reconoce al RTQ fosforilado en el residuo Tyr-716 a través de su dominio SH2 e interactúa a través de dominios SH3 con Sos, una proteína intercambiadora de nucleótidos capaz de promover el intercambio de GTP por GDP de Ras, produciendo la activación de Ras a su estado GTP activo (Bar-Sagi, 1994; Aronheim y col., 1994). *SHC* reconoce a RTQ fosforilados por sus dominios SH2 (en el caso del receptor PDGF) o PTB (en el caso del receptor IGF-I) y actúa también como molécula adaptadora entre el receptor que la fosforila en Tyr y crea pY blanco para los dominios SH2 de *Grb2*, conduciendo igualmente a la activación de *Ras*. La proteína p21-ras está codificada por una familia de genes (H-, K- y N-ras) cuyo producto se localiza en la cara interna de la membrana plasmática y se ancla por farnesilación. La enzima farnesil-transferasa

responsable de ese proceso resulta fosforilada y activada por un mecanismo de feed-back positivo por la propia cascada de señalización desencadenada por Ras en respuesta a factores que actúan a través de RTQ (Goalstone y col., 1997). La proteína Ras tiene actividad GTPásica intrínseca para inactivarse, sin embargo esa actividad resulta dependiente de una proteína de 125 kDa llamada *ras-GAP*. Esta proteína se une al receptor activado de PDGF y resulta fosforilada, lo que posiblemente la inactive. La pérdida de la actividad GTPásica intrínseca de Ras por una mutación puntual en el codón 12, 13 ó 61 produce una proteína Ras permanentemente activa y altamente oncogénica que es prevalente en muchos tumores humanos, lo que indica que esta ruta es clave para la proliferación celular. Todos estos acontecimientos conducen a la activación de Ras, que interactúa con la serina/treonina quinasa *c-Raf-1* por un mecanismo todavía no bien conocido que implica traslocación a la membrana y posiblemente fosforilación de Raf (Avruch y col., 1994). Recientemente se han identificado nuevas proteínas en invertebrados (esta ruta está muy conservada desde la mosca de la fruta *D. Melanogaster* y el nematodo *C. Elegans* hasta mamíferos) que conspiran con Ras, Raf y los receptores en la transducción de la señal, concretamente Sur8 que podría ser un regulador positivo de Ras y CNK que ayudaría a Raf (Sternberg y Alberola-Ila, 1998). La Raf quinasa activada fosforila y activa a la quinasa MEK (también conocida como MAP quinasa quinasa), que a su vez activa y fosforila en Thr y Tyr a *MAP quinasas/ERKs*. La p42 y p44 MAPKs son serina/threonina quinasas que actúan sobre otras quinasas como la quinasa ribosomal *p90RSK*, con blancos tanto a nivel citosólico como nuclear (Vojtek y Der, 1998). Además MAPKs se pueden translocar al núcleo, pudiendo estas translocaciones ser uno de los mecanismos de conexión de toda esta cascada de transducción de señales hacia el núcleo, donde se tiene que dar la síntesis y/o activación por fosforilación de factores de transcripción (Elk-1 que es responsable de la inducción de *c-fos*; *c-myc*, *c-jun*,) que se requieren para la transcripción de genes (Karin, 1995). La *cascada de Ras/Raf/MAPKs* está implicada tanto en procesos de proliferación y supervivencia celulares (en células mesenquimales) como en procesos de expresión génica (Navarro y col., 1998). La diferenciación de células neuronales es dependiente también de dicha ruta. Existen al menos otras dos rutas dentro de la superfamilia de las MAPKs, las *rutas JNKs* y *p38MAPKs*, que normalmente son activadas por señales de stress y por algunas citoquinas y excepcionalmente por factores de crecimiento tirosina-quinasa. Además de Raf, se han identificado toda una plétora de efectores de Ras en diferentes sistemas celulares, que incluyen a la proteína GTPasa Ral (RalGDS), la PI 3-quinasa (Rodríguez-Viciano y col., 1994), PKC (Díaz-Meco y col., 1994) y otras, con lo que Ras podría potenciar otras rutas de señalización implicadas en remodelación del citoesqueleto de actina, supervivencia celular etc., en determinados sistemas celulares.

RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI 3-QUINASA, PKB Y P70S6-QUINASA

La fosfatidil inositol (*PI*) 3-quinasa es un complejo heterodimérico, con una subunidad reguladora y otra subunidad catalítica que fosforila el anillo de inositol del PI(4,5)P₂ en la posición 3' generando segundos mensajeros PI(3,4,5)P₃. Además de su actividad lípido-quinasa posee actividad Ser-Thr-quinasa. Se han clonado y caracterizado toda una familia de factores catalíticos y de factores reguladores, en algunos casos tejido-específicos (Vanhaesebroeck y col., 1997). En el caso del PDGF la subunidad reguladora *p85α* interactúa por sus dominios SH2 con el receptor fosforilado y une y activa la subunidad catalítica *p110α*, induciendo el reclutamiento de la misma a complejos de señalización adyacentes a la membrana donde su sustrato lipídico está presente. La ruta *PI 3-quinasa* está implicada en numerosas respuestas biológicas a los RTQ, entre ellas la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios, la diferenciación de células adipocíticas y mioblásticas o respuestas como tráfico de membranas implicadas, por ejemplo, en la translocación de transportadores de glucosa insulino-dependientes (Teruel y col., 1998). En algunos sistemas celulares también está implicada en procesos de proliferación (Shepherd y col., 1998).

Los productos lipídicos producidos por la PI 3-quinasa sirven como moléculas de anclaje y efectores alostéricos de otras proteínas, tales como *PKB/AKT* que se une a los mismos a través de dominios PH. Se han identificado tres isoformas PKB en mamíferos, que son homólogas celulares del oncogen retroviral *v-Akt*. Una vez anclada a la membrana, PKB resulta fosforilada y activada en dos residuos Ser y Thr por dos quinasas que también se colocan (a través de sus dominios PH) en la membrana por los 3-fosfoinosítidos generados por PI 3-quinasa, *PDK1* y 2. Una vez activada, PKB se disocia de la membrana y se mueve hacia el núcleo, o permanece en otros compartimentos celulares (Coffer y col., 1998). El sustrato mejor conocido de PKB es el glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), que resulta fosforilada e inactivada *in vivo* por la misma, lo que conduce a la defosforilación y activación de un espectro de proteínas del metabolismo celular. Entre ellas la glucógeno sintasa responsable de la síntesis del glucógeno en músculo e hígado, o el factor eIF2B que regula el intercambio y activación de GTP del factor eIF2 en la iniciación de la síntesis proteica (Proud y Denton, 1997). Otro blanco metabólico de la PKB es la fosfofructoquinasa-2, que resulta fosforilada y activado, lo que conduce a la formación de fructosa-2,6-bisfosfato, metabolito activador alostérico de la fosfofructoquinasa-1, enzima clave en la ruta glucolítica. Recientemente se ha implicado a la ruta *PKB* en el mantenimiento de la supervivencia celular, ya que en células neuronales y en líneas eritropoieticas se ha demostrado que PKB fosforila e inactiva Bad, una proteína pro-apoptótica (Datta y col., 1997).

Otro posible efector de la PI 3-quinasa es la proteína *p70S6-quinasa*, que también se activa por fosforilación a través de PDKs. Esta proteína fosforila la proteína S6,

que es un componente de la subunidad ribosomal 40S. Se ha observado que la rapamicina bloquea la fosforilación y activación de *p70S6-quinasa* por RTQ, actuando en un nivel anterior (FRAP/mTOR) y esta ruta es la responsable de la fosforilación de las proteínas de unión 4E-BPs y su disociación del factor de iniciación de la síntesis proteica eucariótico 4E, lo que permite la traducción del mRNA (Proud y Denton, 1997). Además de su papel crucial en la regulación de la síntesis proteica, *p70S6-quinasa* parece ser una ruta muy involucrada en mitogénesis en algunos sistemas celulares.

OTRAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A RTQ

Otra de las moléculas que interactúa con el receptor PDGF fosforilado, concretamente por la Tyr-1021 del extremo carboxi-terminal, es la *Fosfolipasa Cγ*, una proteína de 145 kDa con dominios SH2, SH3 y PH, que resulta fosforilada y activada por dicha interacción (Scharenberg y Kinet, 1998). Cataliza la degradación de PIP₂ a inositol tri-fosfato (IP₃), que moviliza Ca²⁺ de los depósitos intracelulares, y diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros, como es bien sabido, activan algunas isoformas de la familia de las protein quinasas C. Además, Fosfolipasa Cγ parece tener un papel en la migración inducida por PDGF en ciertos tipos celulares ya que se puede asociar con ciertos componentes del citoesqueleto o con la quinasa de adhesión focal (*FAK*), así como mediar respuestas biológicas como formación de lamelipodios (Kim y Feldman, 1998). Respuestas de este tipo son también producidas por la familia de las quinasas Src, que son tirosina quinasas citosólicas que se unen a residuos pY de la región juxtamembranal del receptor PDGF, resultando fosforiladas y activadas por el mismo. Los segundos mensajeros generados por la Fosfolipasa C activan las isoformas clásicas de las protein quinasas C. Otras isoformas PKCs, como la nueva y la atípica, también se pueden ver activadas por la PI 3-quinasa a través de PDKs (Mellor y Parker, 1998). Las proteínas quinasas C pueden contribuir a distintas respuestas celulares inducidas por RTQ, incluyendo tráfico intracelular a través de caveolina (PKCs clásicas), proliferación (PKCs nuevas) y supervivencia (PKCs atípicas).

Finalmente, todas estas vías de señalización puestas en marcha por la unión de factores a RTQ requieren un mecanismo de inactivación a distintos niveles, desde la membrana hasta el núcleo. Aquí van a desempeñar un papel muy importante las Tyr-fosfatasa y Ser/Thr-fosfatasa, tanto citosólicas como nucleares. Una de las fosfatasa que se activa por unión de sus dominios SH2 al receptor de PDGF es la Tyr-fosfatasa *SHPTP2*, fosforilándose a su vez en Tyr y aumentando su actividad. Con ello ejercería una regulación negativa, posiblemente a nivel del receptor. Sin embargo, la Tyr-P en *SHPTP2* crea un lugar de unión para Grb2, con lo que podría contribuir a la activación de Ras. Las rutas que se acaban de describir se resumen en el esquema de la Figura 4.

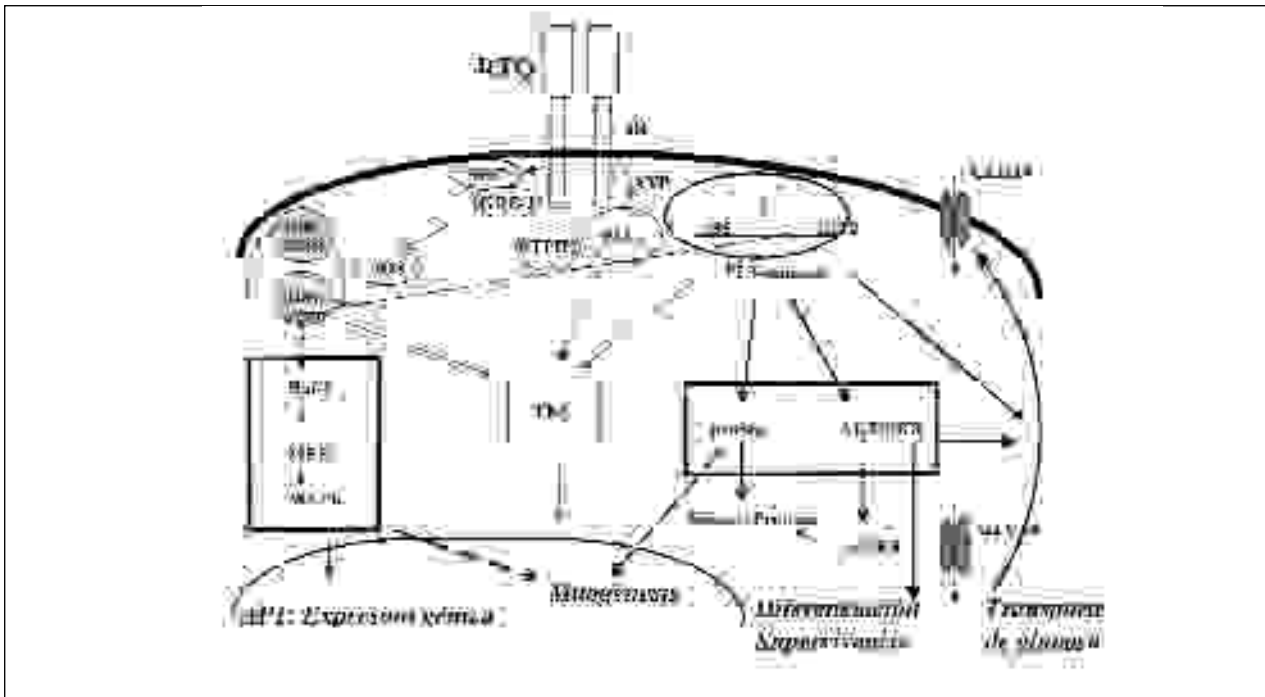


Fig. 4. Rutas de transducción por RTQ.

Las principales rutas de señalización que hemos descrito para los factores que actúan a través de RTQ no son mutuamente excluyentes, en el sentido de que dependiendo del factor y del tipo celular pueden estar activadas en distinta magnitud. También se puede dar entrecruzamiento entre rutas, por ejemplo Ras es capaz de activar directamente PI 3-quinasa en algunos sistemas celulares, o bien PLC γ puede modular también la actividad PI 3-quinasa. En otro aspecto, estas rutas no son exclusivas de RTQ, sino que pueden ser compartidas con citoquinas o con factores que actúan a través de proteínas G; es el caso de MAPKs y de ciertas isoformas de PI 3-quinasa. De forma análoga, algunos factores de crecimiento con RTQ pueden utilizar rutas de señalización de las empleadas por las citoquinas, incluyendo tirosinas quinasas citosólicas como Janus quinasas (JAKs) y sustratos como miembros de la familia STAT (transductores de señales y activadores de la transcripción) que sugieren una vía de señalización más directa hacia el núcleo (Patel y col., 1996).

LA TRANSFORMACIÓN POR H-RAS ALTERA DETERMINADAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INDUCIDAS POR RTQ

La transformación de células mesenquimales (adipocitos marrones) con una construcción constitutivamente activa de Ras, H-ras^{lys12}, junto con el antígeno T grande del SV40 produjo una línea con fenotipo transformante (MB1.3.19), capaz de crecer de forma independiente de anclaje en agar blando (Lorenzo y col., 1996). Esta línea presentaba una sobreexpresión constitutiva de los niveles de Ras.GTP, Raf-1 quinasa y MAP-quinasa, mientras que la ruta PI 3-

quinasa/Akt/p70S6-quinasa no estaba sobreexpresada (Valverde y col., 1997). En respuesta a factores que actúan sobre RTQ (concretamente insulina), la línea celular mostraba una resistencia a la acción de la misma a nivel de receptor, necesiéndose concentraciones 100-500 veces mayores de las necesarias en células parentales para observar fosforilación en tirosina del RTQ. En esta línea celular hemos estudiado dos respuestas biológicas con diferente comportamiento frente a su estimulación a través de RTQ; una relacionada con migración celular, la formación de lamelipodios, y otra metabólica, pero de gran importancia en células tumorales, la captación de glucosa. La estimulación con dosis muy altas de insulina produjo la disgregación del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios en las células MB1.3.19. El tratamiento con agentes inhibidores de las rutas de señalización mencionadas anteriormente demostraron que esta respuesta relacionada con la migración celular era dependiente de PI 3-quinasa y de fosfolipasa C γ , ya que inhibidores de la primera (wortmanina) y de la segunda (U73122) bloqueaban totalmente la formación de lamelipodios. Sin embargo los inhibidores químicos de MAPK (PD098059) y p70S6-quinasa (rapamicina) no tenían ningún efecto sobre la respuesta producida a la estimulación del RTQ. En cuanto al transporte de glucosa, las células MB1.3.19 tienen un transporte de glucosa basal diez veces más elevado que el de sus células progenitoras. Sin embargo este transporte es independiente de insulina y de PI 3-quinasa, a diferencia de las células parentales (Valverde y col., 1998). Los resultados observados en estas líneas celulares transformadas guardan relación con la resistencia a insulina detectada en muchos pacientes de cáncer (Noguchi y col., 1998), lo que nos lleva a hipotetizar que la resistencia a insulina en pacientes de cáncer puede ser una alteración inducida por el propio tumor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aronheim A, Engelberg D, Li N, Al-Alawi, N, Schlessinger J, Karin M (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.
2. Avruch J, Zhang X-F, Kyriakis JM (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 19, 279-283.
3. Bar-Sagi D (1994) The Sos (son of sevenless) protein. *Trends Endocrinol Metab* 5, 165-169.
4. Benito M, Lorenzo, M (1993) Platelet derived growth factor/tyrosine kinase receptor mediated proliferation. *Growth Reg* 3, 172-179.
5. Claesson-Welsh L (1994) Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 269, 32023-32026.
6. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335, 1-13.
7. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
8. Diaz-Meco MT, Lozano J, Muncio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L, Moscat J (1994) Evidence for the "in vitro" and "in vivo" interaction of Ras with protein kinase C α . *J Biol Chem* 269, 31706-31710.
9. Goalstone M, Carel K, Leitner JW, Draznin B (1997) Insulin stimulates the phosphorylation and activity of farnesyltransferase via the Ras-Mitogen-Activated Protein kinase pathway. *Endocrinology* 138, 5119-5124.
10. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L (1998) Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochem Biophys Acta* 1378, F79-13.
11. Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270, 16483-16486.
12. Kim B, Feldman EL (1998) Differential regulation of focal adhesion kinase and mitogen-activated protein kinases tyrosine phosphorylation during IGF-I-mediated cytoskeletal reorganization. *J Neurochem* 71, 1333-1336.
13. Lorenzo M, Valverde AM, Teruel T, Alvarez A, Benito M (1996) P21-ras induced differentiation-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cells and cell lines. *Cell Growth Differ* 7, 1251-1259.
14. Malarkey K, Belham CM, Paul A, Graham A, McLees A, Scott PH, Plevin R (1995) The regulation of tyrosine kinase pathways by growth factors and G-protein coupled receptors. *Biochem J* 309, 361-375.
15. Mellor H, Parker PJ (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332, 281-292.
16. Myers MGJr, White MF (1995) New frontiers in insulin receptor substrate signaling *Trends Endocrinol Metab* 6, 209-215.
17. Navarro P, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M (1998) Insulin/IGF-I rescues immortalized brown adipocytes from apoptosis down-regulating Bcl-xS expression, in a PI 3-kinase- and MAP kinase-dependent manner. *Exp Cell Res* 243, 213-221.
18. Noguchi Y, Yoshikawa T, Marat D, Doi C, Makino T, Fukuzawa K, Tsuburaya A, Satoh S, Ito T, Mitsuse S (1998) Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor- α expression in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 887-892.
19. Patel BKR, Wang LM, Lee CC, Taylor WG, Pierce JH (1996) Stat 6 and Jak 1 are common elements in PDGF and interleukin-4 signal transduction pathways in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 271, 22175-22182.
20. Proud CG, Denton RM (1997) Molecular mechanism for the control of translation by insulin (1997) *Biochem J* 328, 329-341.
21. Quon MJ, Butte AJ, Taylor SI (1994) Insulin signal transduction pathways. *Trends Endocrinol Metab* 5, 369-376.
22. Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-532.
23. Scharenberg AM, Kinet J-P (1998) PtdIns-3,4,5-P₃: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* 94, 5-8.
24. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K (1998) Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulins signalling. *Biochem J* 333, 471-490.
25. Sternberg PW, Alberola-Ila J (1998) Conspiracy theory. Ras and Raf do not act alone. *Cell* 95, 447-450.
26. Teruel T, Valverde AM, Navarro P, Benito M, Lorenzo M (1998) Inhibition of PI 3-kinase and Ras blocks IGF-I and insulin-induced uncoupling protein 1 gene expression in brown adipocytes. *J Cell Physiol* 176, 99-109.
27. Ullrich A, Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.
28. Valverde AM, Lorenzo M, Teruel T, Benito M (1997) Alteration in the insulin signaling pathway induced by immortalization and H-ras transformation of brown adipocytes. *Endocrinology* 138, 3195-3206.
29. Valverde AM, Navarro P, Benito M, Lorenzo M (1998) H-ras induces glucose uptake in brown adipocytes in an insulin- and phosphatidylinositol 3-kinase-independent manner. *Exp Cell Res* 243, 274-281.
30. Vanhaesebroeck B, Leever SL, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22, 267-272.
31. Vojtek AB, Ders CJ (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 273, 19925-19928.
32. Weiss A, Schlessinger J (1998) Switching signals On or Off by receptor dimerization. *Cell* 94, 277-280.

Carcinogénesis humana

S. RAMÓN Y CAJAL

Departamento de Patología. Clínica Puerta de Hierro. Madrid

INTRODUCCIÓN

El cáncer o el desarrollo de procesos tumorales malignos es una de las causas más frecuentes de morbilidad y de mortalidad, con unas perspectivas globales de curación del 50%, que dependen de múltiples factores. La incidencia de cáncer ha crecido en las últimas décadas, pasando de suponer el 4% del total de muertes en 1900 a más del 24% en 1994, y siendo en la actualidad, la segunda causa de muerte, después de las enfermedades coronarias. En varones, los dos tumores más frecuentes son el de pulmón, claramente relacionado con la exposición al tabaco y el de próstata. En mujeres, el tumor más frecuente es el de mama, y se estima que alrededor del 10% de las mismas pueden desarrollar un cáncer de mama. En España, la tasa de aparición de cáncer de mama estaría alrededor de 36 nuevos casos por cada 100.000 habitantes por año, lo que significaría que cada año se pueden diagnosticar alrededor de 16.000 nuevos casos. Es la causa más frecuente de muerte en mujeres entre 25 y 45 años y la segunda a partir de los 45 años.

Un punto muy interesante e importante en el estudio de los tumores humanos es la correlación con la edad de aparición-detección de los mismos. En la población infantil, la patología tumoral tiene escasa incidencia y, curiosamente, el grupo de tumores que se detectan con más frecuencia son muy diferentes a los observados en personas adultas. De hecho, el grupo de carcinomas que son los tumores más frecuentes, con enorme diferencia en el conjunto de la población, son excepcionales en la edad infantil. En dicho grupo de edad predominan los tumores del sistema hematopoyético, como las leucemias; en segundo lugar los tumores del SNC y tumores de células redondas infantiles. Esta diferente incidencia de tipos de tumores en función de la edad deja entrever claramente diferentes mecanismos carcinogénicos en

ambos grupos de edades, relacionados tanto con factores ambientales específicos como con células diana como con factores genéticos de predisposición familiar (2,16,32,34).

PREMISAS BÁSICAS EN CARCINOGENESIS

En relación con el cáncer, hay al menos dos premisas fundamentales que hay que valorar para entender y centrar los diferentes estudios que se están haciendo: 1) la gran heterogeneidad y variabilidad morfológica y pronóstica de los tumores, con más de 250 tipos tumorales malignos diferentes y distintivos, y 2) el gran número de alteraciones moleculares oncogénicas descritas hasta la fecha y cuyo número, tanto de oncogenes como de genes supresores, va a superar el centenar en pocos años (5,7,20,22,37,40,49).

Básicamente, se puede admitir que todos aquellos genes cuya activación/inactivación constitutiva lleve a un aumento de la proliferación celular, altere el control del ciclo celular, interfiera con la diferenciación celular o estén involucrados en la muerte celular programada o suicidio celular o apoptosis son potencialmente oncogénicos. Además hay que añadir todas aquellas alteraciones oncogénicas que se pueden heredar por línea germinal y predisponer a diversos tipos de cánceres y los novedosos mecanismos de carcinogénesis, como el control de la reparación de las alteraciones del DNA, que también pueden asociarse con el desarrollo de tumores.

Obviamente, es importante el recordar que en los tumores malignos se acumulan múltiples de estas alteraciones oncogénicas, y que pueden variar de unos tumores a otros, incluso de la misma localización. Hay muy escasos tumores con alteraciones moleculares constantes y/o patognomónicas; sólo algunos procesos linfoproliferativos y leucemias tienen translocaciones carac-

terísticas, que involucran determinados oncogenes; por ejemplo los linfomas foliculares con la translocación t (14;18) que afecta al oncogén *bcl-2*, a los linfomas del manto t (11;14), que afecta al *bcl-1*, a la leucemia mieloide crónica t (9;22) con el *bcr-abl* y otras. Todo ello lleva a deducir que no se puede en general prejuzgar las características clínicas, patológicas y moleculares de los tumores y que, presumiblemente, las diversas alteraciones moleculares existentes en relación con la estirpe celular transformada pueden ayudar a establecer a medio plazo unos factores pronósticos más reales.

Las diferentes alteraciones moleculares que pueden asociarse al desarrollo y formación de tumores malignos humanos pueden clasificarse en los siguientes grupos:

- a) activación de oncogenes
- b) inactivación de genes supresores
- c) alteración genes reparación ADN y estabilidad genética
 - inestabilidad microsátélites
 - inestabilidad cromosómica
- d) alteración genes relacionados con la apoptosis
- e) otros mecanismos: activación telomerasa, genes interruptores, sistema de ubiquitinas,...

Existen varias formas de alteraciones genéticas que predisponen a la adquisición tumoral: a) delección de regiones cromosómicas, que implica la pérdida de genes importantes en la regulación negativa de la proliferación celular (caso de los genes supresores), b) mutaciones génicas, tanto espontáneas como inducidas, y c) amplificaciones génicas, que conllevan a la sobreexpresión de genes específicos. Alternativamente, se produce una ganancia y pérdida de cromosomas enteros que produce la aneuploidía característica de la mayoría de células tumorales. Diferencias en la capacidad de reparación de algunas de las alteraciones reversibles producidas (errores en la lectura de la DNA polimerasa, depurización, oxidación por radicales libres generados en el metabolismo celular, y deaminación de la 5-metilcitosina) pueden explicar la diferente susceptibilidad de cada tipo celular. Es importante destacar que el orden de las lesiones no es relevante para el resultado final siendo la acumulación de alteraciones lo que conlleva a la aparición de la célula tumoral.

ONCOGENES

El estudio de los oncogenes puede ayudar a racionalizar el estudio de los diferentes tipos de cáncer permitiendo tener una información molecular de los mismos y sentar las bases de un análisis más específico de cada tumor y de cada paciente, perfilando las características biológicas del tumor en función de los oncogenes activados. Dicha información reflejaría las características individuales de cada tumor y permitirá realizar un abordaje terapéutico más individualizado a cada paciente (40).

Las alteraciones moleculares con capacidad oncogénica se pueden localizar prácticamente en todas las rutas bioquímicas que producen aumento de la prolife-

ración celular. Los oncogenes, que derivan de protooncogenes o genes normales de la célula que intervienen en las rutas de proliferación celular normal, tras activación constitutiva de los mismos, se pueden clasificar en función de su mecanismo de acción y su localización en las cascadas de proliferación. De este modo, se distinguen oncogenes que son homólogos a factores de crecimiento y hormonas. Un ejemplo de este grupo es el oncogén *sis*, homólogo del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo B (PDGF-B), que es un potente mitógeno. El segundo grupo correspondería a oncogenes homólogos a receptores de los factores de crecimiento, de los que ya se han descrito varios, como el *erb-B*, receptor del factor de crecimiento epidérmico de crecimiento, el *fms* (receptor para el factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos), el *trk* (receptor para el factor de crecimiento neural, NGF. En cáncer de mama es muy significativa la implicación de la activación de homólogos de *erb-B*, como el *erb-B2/neu*. En tercer lugar, estarían todos aquellos genes que codifican para proteínas citoplásmicas traductoras de señal y el sistema de segundos mensajeros. En este grupo se incluyen el grupo de proteínas de las familias *ras* y sus activadores (*sos*, *Dbl*, *Grb*, *Vav*...) y diversas quinasas citoplásmicas (MEKK, MEK, *raf-1*), fosfatasa... En cuarto lugar, y ya llegando al núcleo, estarían el grupo de factores de transcripción, que actuarían activando otros genes con capacidad de inducir proliferación celular. En este grupo destacarían hoy en día *c-fos*, *c-jun*, *C-myc*.

ONCOGENES *ras*

La familia de genes *ras* codifica para proteínas de 21 kDa (*p21-ras*) con capacidad de unir e hidrolizar guanosina trifosfato (GTP). Existen tres genes distintos, denominados Harvey-, Kirsten- y N-*ras*, con cerca del 90% de identidad en sus secuencias a nivel de proteínas. En condiciones normales, las *p21-ras* están asociadas a GDP, manteniéndose en su forma inactiva, gracias a la función de un activador de la capacidad intrínseca de GTPasa (hidrólisis de GTP a GDP+ Pi) denominado GAP. El ciclo de activación se produce al aumentarse el intercambio de GDP por GTP, mecanismo probablemente disparado por factores de crecimiento a través de sus receptores. Las mutaciones activantes en genes *ras* afectan el equilibrio hacia la unión permanente de *p21-ras* con GTP, manteniéndose bloqueada en su conformación activa. También se han descrito casos en los que el mecanismo de activación no es cualitativo (mutaciones activantes) sino cuantitativo (aumento de la expresión del producto normal) (21, 22).

Se ha visto activación constitutiva de genes *ras* en alrededor del 30% de los tumores humanos, con una incidencia muy variable según el tipo de tumores y localización. De este modo, en adenocarcinomas de páncreas se detectan mutaciones de K-*ras* en >90%, en tumores de colon en más del 50% de los casos, mientras que en carcinomas de mama y linfomas es menor al 5%.

GENES SUPRESORES

El segundo gran grupo de alteraciones oncogénicas está constituido por los genes supresores. Se conocen ya más de 12 genes supresores, cuya pérdida de función es crucial para la transformación maligna celular. Estos genes supresores funcionan controlando la proliferación celular y especialmente el ciclo celular, de tal modo que, su importancia oncogénica radica precisamente en su pérdida de función. De todos ellos (p53, del retinoblastoma pRb, genes de la neurofibromatosis tipo 1 y tipo 2, el gen de la poliposis adenomatosa familiar APC, el gen del tumor de Wilms WT-1,...), los mejor estudiados son el p53 y el gen del retinoblastoma. El estado de fosforilación del pRb, es de hecho, un punto crítico en el inicio del ciclo celular, de tal modo que cuando se fosforila, se libera un factor de transcripción, el E2F, que es uno de los componentes esenciales para el inicio del ciclo celular, activando c-myc,... Dicha fosforilación de la proteína del retinoblastoma está exquisitamente controlada por varias quinasas y ciclinas celulares, que a su vez, son inhibidas por diversas proteínas de genes supresores (p16, p21waf1, p27, p57,...). El eje regulador p16/ciclina D/cdk4/Rb probablemente sea la alteración oncogénica más frecuente en tumores humanos, detectándose alterado en más del 90% de los tumores humanos (16, 9, 20).

El control del ciclo celular es probablemente uno de los puntos más importantes en la transformación maligna celular. Dicho control es exquisito y complejo y tiene lugar en las diferentes fases del ciclo celular. Además, es importante el recordar que el control del ciclo celular es fundamental no sólo para regular la proliferación celular sino también para impedir que se puedan acumular o transmitir alteraciones genéticas en el ADN. Esa misión de vigilancia del ADN, de su correcta síntesis y duplicación, está mediada también, por una serie de genes que finalmente conectan con el ciclo celular parándolo en la fase G1, de modo que se puedan corregir los diversos errores detectados. Uno de los genes esenciales en dicho proceso es el p53, que como posteriormente se verá, está involucrado en la inducción de apoptosis, precisamente en aquellos casos donde se hayan producido errores muy graves en la replicación del ADN o se hayan detectado alteraciones moleculares irreparables. Del gran número de factores relacionados con el ciclo celular conviene recordar que el control del ciclo celular tiene lugar por procesos de fosforilaciones de proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estas quinasas se sintetizan a lo largo del ciclo celular e interrelacionan con una serie de ciclinas celulares: se distinguen ciclinas de la fase G1 como las ciclinas D y E y ciclinas de las fases G2 y G2/M como las ciclinas A y B. Además, dichas quinasas (CDK) están reguladas por una serie de genes supresores que las inactivan (inhibidores de ciclinas quinasas). Esta familia de inhibidores es de las más importantes hoy en día en patología tumoral humana. Tenemos genes, como el p15, p16 que inhiben al grupo de CDK4 y 6 (de la fase G1), y otros como el 921 waf1 y p27 que se unen e inactivan de forma más global a todas las ciclinas celulares (de las

fases G1 y G2/M). La ausencia de función de alguno de estos genes inhibidores conllevará por tanto una irregularidad del ciclo celular, con aumento de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma y otras dianas y por tanto con inducción de progresión de las diversas fases del ciclo celular.

P53: La proteína p53 (18) es un factor de transcripción que activa la reproducción de varios genes, como la p21 waf1, que es un inhibidor de complejos ciclina y quinasas dependientes del ciclo celular, y que por tanto frena el ciclo celular; del mdm2, que inactiva y regula a la propia p53; del GADD45, que se activa tras daño al DNA y se une al PCNA y frena el ciclo celular; del BAX, un miembro de la familia bcl2, que promueve la apoptosis; del IGF-BP3 y otros genes. La proteína p53 tiene 393 aminoácidos y es un tetrámero en solución. En relación con su inactivación, es muy importante el resaltar que hay múltiples mutaciones que la inactivan y que tienden a localizarse en los exones 4 al 8. La ausencia de claros puntos calientes de inactivación que se muten con mucha mayor frecuencia hace que el estudio de las mutaciones de p53 tenga que extenderse a bastantes exones y dificulta mucho su valoración. Recientemente también se están describiendo alteraciones a nivel del splicing del RNA los que puede condicionar proteínas p53 inactivas sin mutaciones puntuales a nivel exónico. Además la proteína p53 mutada, tiende a estabilizarse y a aumentar su vida media (de los escasos 20 minutos en su forma salvaje), y eso permite el que se pueda visualizar por métodos inmunohistoquímicos en secciones de parafina. No obstante, dicho acumulo de proteína p53 no siempre es indicativa de mutaciones a nivel genómico dado que también puede sobreexpresarse en situación de stress celular, de hipoxia y tras daño genómico (18).

INESTABILIDAD GENÉTICA

Otro mecanismo, descrito inicialmente por Perucho y el grupo de Vogelstein es la demostración de inestabilidad genética en un número significativo de tumores humanos. Estudios de Perucho utilizando primers inespecíficos para amplificación por PCR, demostraron una alta frecuencia de deleciones y mutaciones genéticas en cáncer de colon y adenomas apuntando la posibilidad de una posible alteración en los sistemas de reparación del DNA, que condicionaría las posteriores alteraciones genéticas. Posteriormente se identificó uno de los genes responsable en el cromosoma 2, el gen MSH-2, homólogo a un gen de levadura (MUT.S), que interviene en los mecanismos de reparación del DNA. Hoy en día se conocen ya más de seis genes que intervienen en la regulación de la reparación del DNA que pueden estar alterados en cáncer y condicionar un fenotipo mutador (19). Dicha inestabilidad genética se denomina también de microsátélites, y tiene lugar a nivel de nucleótidos y se traduce en sustituciones de bases o deleciones o inserciones de unos pocos nucleótidos. Dicha inestabilidad hay que diferenciarla por tanto de la inestabilidad cromosómica, que es una alteración muy frecuente en tumo-

res sólidos, y donde se produce ganancia o pérdida de cromosomas enteros. Esta inestabilidad cromosómica puede estar asociada a pérdida de función de los puntos de control mitóticos. De hecho, en algunos tumores, el grupo de Vogelstein ya han observado inactivación mutacional de un gen humano homólogo al de levadura BUB1, que controla los puntos de control mitóticos y las segregaciones cromosómicas en levadura. Alteraciones de dichos genes podrían estar relacionados con la presencia de aneuploidias y poliploidias de las células malignas.

APOPTOSIS

Por último, es importante resaltar la importancia oncogénica del control de la apoptosis. La apoptosis es el término elegido para indicar muerte celular, pero de forma individualizada y sobre todo acorde a un programa genético, finamente regulado por decenas de genes que la controlan tanto positiva como negativamente. La apoptosis se origina, bien porque las células están seriamente dañadas o porque el organismo no necesita más de ellas. Durante este proceso se originan diversos cambios morfológicos y bioquímicos, tales como condensación de la cromatina entorno a la membrana nuclear, aparición de los cuerpos apoptóticos y otros como el característico patrón de degradación del DNA en fragmentos de 180-200 pares de bases y múltiplos. La inhibición de la apoptosis fisiológica, es probablemente uno de los mecanismos fundamentales en la transformación maligna, dado que las células "*resistentes*" a la apoptosis se hacen de alguna manera "*inmortales*" y por tanto ideales para que sobre ellas se acumulen otras alteraciones oncogénicas. De hecho, Evans, ha llegado a proponer que en la transformación maligna final tiene que estar activadas alteraciones oncogénicas que modifiquen el programa de apoptosis y otras que aumenten la proliferación celular. Dicha complementación de funciones y alteraciones oncogénicas es básica para entender el proceso canceroso y la enorme redundancia de alteraciones moleculares que pueden superponerse y transformar a las células (17).

Uno de los genes que relacionan directamente apoptosis y cáncer es el gen *Bcl-2*, este gen que se aisló como producto de una translocación entre los cromosomas 14 y 18, se ha observado en la mayoría de los linfomas foliculares. *Bcl-2* no presenta ningún efecto sobre el crecimiento celular, pero su sobreexpresión bloquea la entrada en apoptosis. No obstante, es importante advertir que el efecto de *bcl2* está sujeto a la presencia activa de otros genes que lo regulan y/o contrarrestan o inhiben su acción. De hecho, varios miembros de la familia *bcl2* (genes como el *BAX*, *bclx* se modulan entre sí y es el nivel o balance final de la expresión de los mismos lo que condiciona que la célula tienda a ir hacia apoptosis o bien sea resistente). El control de la apoptosis se realiza también por múltiples genes como *p53*, *myc*, *ras*...

Finalmente, destacar la importancia de la actividad telomerasa. El acortamiento de los telómeros es un hecho normal y fisiológico en las células y de hecho

cuando la reducción llega a un punto determinado es una señal inequívoca de que las células ya no se van a replicar más y entran en la denominada senescencia. Precisamente, la actividad telomerasa se encarga de reemplazar la pérdida de ADN telomérico que ocurre en cada división celular y por tanto puede ser uno de los mecanismos celulares más importantes para permitir una supervivencia indefinida. De hecho, dicha actividad es alta en células embrionarias y en más del 80% de los tumores humanos. No está suficientemente claro, si la persistencia de la actividad telomerasa en las células tumorales es secundaria a la transformación maligna celular o puede ser incluso un mecanismo primario que lleve a dichas células a la inmortalización y facilitar por tanto la adquisición y acumulación de alteraciones moleculares oncogénicas.

SÍNDROMES DE CÁNCER HEREDITARIO

Se conocen más de 20 síndromes familiares, donde se heredan mutaciones de una serie de genes que predisponen a numerosos tipos de tumores (16).

Los síndromes más importantes son:

1. Retinoblastoma familiar. Crom. 13q14.3 (RB1)
retinoblastomas
osteosarcomas
2. S. De Li Fraumeni. Crom. 17p13.1 (p53)
carcinomas de mama, sarcomas
leucemias, tumores cerebrales
3. Poliposis adenomatosa familiar. Crom. 5q21 (APC)
cáncer de colon
tumores de duodeno, estómago, osteomas, glioblastomas.
4. Cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis. Crom. 2p16, 3p21, 2q32, 7p22 (MSH2, MLH1, PMS1, PMS2)
5. Neurofibromatosis tipo 1. Crom 17q11.2 (NF1)
neurofibromas
neurofibrosarcomas, tumores cerebrales
6. Neurofibromatosis tipo 2. Crom 22q12.2 (NF2)
neuronomas del VIII par, meningiomas
gliomas, ependimomas
7. Tumor de Wilms. Crom. 11p13 (WT1)
8. S. De Wiedmann-Beckwith. Crom 11p15 (?p57)
tumor de Wilms
hepatoblastomas, carcinoma suprarrenal
9. S. carcinomas basales nevoide. Crom. 9q22.3 (PTCH)
10. Cáncer de mama familiar 1. Crom 17q21 (BRCA1)
cáncer de mama
cáncer de ovario, próstata.
11. Cáncer mama familiar 2. Crom 13q12 (BRCA2)
cáncer de mama
cáncer mama varones, carc. páncreas (?)
12. S. De von Hippel-Lindau. Crom 3p25 (VHL)
carcinomas renales de células claras
feocromocitomas, hemangioblastomas

13. Cáncer renal hereditario tipo papilar. Crom 7q31 (MET)
cáncer renal papilar
14. Melanoma familiar. Crom. 9p21 (p16)
melanomas
cáncer de páncreas
15. Neoplasias endocrina múltiple tipo 1 (MEN1). Crom 11q13 (MEN1)
tumores de los islotes del páncreas
hiperplasia paratiroides, adenomas hipofisis
16. Neoplasias endocrina múltiple tipo 2 (MEN2). Crom 10q11.2 (RET)
cáncer medular de tiroides
feocromocitomas, hiperplasia paratiroides
17. Exostosis múltiple. Crom. 8q24.1, 11p11-13, 19p (EXT1,EXT2, EXT3)
exostosis osteocartilaginosa
condrosarcomas
18. Enfermedad de Cowden. Crom 19q23 (PTEN)
cáncer de mama, de tiroides folicular
pólipos hamartomatosos intestinales
19. Cáncer de próstata hereditario. Crom 1q25 (?)
20. Keatoderma palmo-plantar. Crom 17q25 (?)
cáncer de esófago
leucoplasia
21. Ataxia-telangiectasia Crom 11q22 (ATM)
linfomas
cáncer de mama en heterocigotos, inmunodeficiencias
22. S de Bloom Crom 15q26.1 (BLM)
tumores sólidos
inmunodeficiencias
23. Xeroderma pigmentosum. Diversas lesiones cromosómicas
tumores cutáneos
24. Anemia de Fanconi. Crom. 9q22-3, 16q24.3 (FACC, FACA)
leucemia aguda mieloide
pancitopenia

De los más de 20 síndromes clínicos asociados a cáncer hereditario, ya se han identificado las alteraciones moleculares correspondientes a la mayoría de ellos. En su mayor parte, corresponden a genes supresores que se heredan mutados en uno de sus alelos; el otro alelo se suele inactivar postnatalmente, bien por deleciones o mutaciones. Como se puede apreciar en el resumen previo, algunos de los genes afectados son muy conocidos y de supuesta gran transcendencia fisiológica. Por ejemplo, alteraciones del gen del retinoblastoma, del p53, p15, p57. También inactivación de genes reparadores del ADN, de factores de transcripción, de receptores de membrana, etc. Lo curioso e interesante de estos síndromes, es la especificidad de localización de los tumores asociados. En todos ellos, la alteración genética se hereda por vía germinal y por tanto está presente en todas las células del organismo. Sin embargo, sólo se desarrollan tumores en sitios muy concretos. Esta asociación sugiere que la importancia oncogénica de determinados genes supresores y de reparación del ADN tienen una enorme especificidad tisular.

Algunos de estos genes corresponden a los denominados por Kinzler y Vogelstein genes *gatekeepers* y genes *caretakers*. Los genes *caretakers* son los encargados de mantener la integridad del genoma mientras que los *gatekeepers* controlan la proliferación celular. Alteraciones de ambos grupos de genes son transcendentales en muchos de los tumores humanos y pueden además heredarse mutaciones por vía germinal. A nivel de los *gatekeepers*, controlan directamente el crecimiento y la muerte celular y cada tipo celular tiene uno o algunos de genes de este tipo activados, con una distribución tisular específica. Son ejemplos típicos de estos genes y síndromes asociados, el gene del retinoblastoma, el von Hippel-Lindau, neurofibromatosis tipo 1, poliposis adenomatosa colónica,.. Por el contrario, las alteraciones de los genes *caretakers* no promueven el crecimiento tumoral directamente sino que al tener lugar un aumento de la inestabilidad genética en dichos genes hay un aumento de mutaciones en todos los genes incluyendo también los *gatekeepers*. Por tanto, en los casos donde se detectan o heredan mutaciones de genes "*cuidadores*", para que se puedan desarrollar un proceso maligno es necesario primero la inactivación del gen cuidador del otro alelo y además que tenga lugar la inactivación por mutación o deleción de ambos alelos de una gen *gatekeeper* o regulador de la proliferación. Esta secuencia de mutaciones hace que en las familias donde se hereda una mutación de genes reparadores no haya un aumento muy significativo de la incidencia de nuevos cánceres dado que necesitan que se produzcan al menos tres mutaciones a nivel postnatal. Ejemplos de genes *caretakers* son los asociados al cáncer de colon familiar no asociado a poliposis, el de la ataxia-telangiectasia, xeroderma pigmentosum, BRCA1, BRCA2.

SECUENCIA CARCINOGENESIS

Hay dos conceptos clásicos en la secuencia de carcinogénesis que siguen teniendo una plena vigencia en la actualidad. Son los conceptos de iniciación y de promoción tumoral. Por iniciación y por agentes iniciadores se entiende la presencia de alteraciones a nivel del DNA, que en principio son irreversibles. Asimismo, dichas alteraciones estructurales son la base de los mecanismos moleculares que activan los protooncogenes e inactivan a los genes supresores. Ejemplos de agentes iniciadores son el tabaco, las radiaciones, los hidrocarburos. Por el contrario, por promoción y por agentes promotores se entiende el efecto de sustancias que inducen un aumento de la actividad celular. Agentes promotores son aquellos que inducen alteraciones bioquímicas celulares y solamente en células "*inicia - das*", es decir, con alteraciones genéticas establecidas, pueden inducir tumores. Los efectos que inducen son *reversibles* y no dañan el DNA. Ejemplos clásicos son los esteres de forbol, fenoles, fenobarbital. Los esteres de forbol, como el TPA, actúan activando la PKC o proteinquinasa C que induce una cascada de fosforilaciones proteicas celulares.

AGENTES CAUSALES

No hay un único agente. Como se decía anteriormente, en la formación de tumores malignos tiene que haber al menos 6 alteraciones genéticas celulares, y en muchas ocasiones es necesaria también la conjunción de diversos agentes carcinógenos. Se distinguen dos grandes grupos de factores que están relacionados o pueden asociarse con la inducción de alteraciones oncogénicas.

a) *Factores extrínsecos*

- Factores medioambientales.
- Agentes químicos.
- Radiaciones
- Virus.

b) *Factores Intrínsecos*

- Genéticos.
- Relacionados con la edad.
- Fisiológicos (estado inmune, endocrinos)

CARCINOGENOS QUÍMICOS

Son muy numerosas las sustancias relacionadas con el desarrollo de tumores malignos. El potencial carcinogénico va a depender del tipo de sustancia, de su mecanismo de acción y de la dosis de exposición. De hecho, algunos compuestos pueden inducir transformación maligna con dosis muy bajas, como las aflatoxinas, mientras que de otros se requieren dosis y tiempos de exposición muy prolongados.

Los grupos más importantes de carcinógenos químicos serían los siguientes:

1.- *Agentes alquilantes de acción directa*

Muchos son fármacos antineoplásicos: ciclofosfámidas, clorambucil, busulfán. Son carcinógenos débiles (requieren muy alta dosis y prolongadas). Pueden estar relacionados con la inducción de segundas neoplasias.

2.- *Hidrocarburos policíclicos aromáticos*

Son potentes carcinógenos. Generalmente necesitan activación metabólica. Por ejemplo, el tabaco, grasa animal tras asarla a la parrilla.

3.- *Aminas aromáticas y colorantes nitrogenados*4.- *Carcinógenos naturales*

Por ejemplo la aflatoxina B1 del *aspergillus flavus* que induce Hepatomas.

5.- *Nitrosamidas*

Relacionadas con cáncer de estómago y colon.

6.- *Otros agentes*

Asbesto y tumores de pulmón y mesoteliomas
Cloruro de vinilo y angiosarcomas hepáticos
Arsénico y tumores cutáneos.

Cromo y níquel y tumores de pulmón.
Insecticidas, sacarina y ciclamatos...

CARCINOGENESIS POR RADIACION

Tanto las radiaciones ultravioleta como electromagnéticas pueden inducir alteraciones del DNA.

1.- *Radiaciones UV*

Dichas radiaciones están relacionadas con la formación de dímeros de purina en el DNA. Tienen por tanto una acción "iniciadora", con establecimiento de daño genético.

Por ejemplo, enfermedades con defectos en la reparación del DNA son muy susceptibles a la formación de tumores cutáneos. Casos de enfermos con Xeroderma pigmentosum y otras enfermedades como la Ataxia-telangiectasia, Anemia de Fancioni y Síndrome de Bloom.

2.- *Radiaciones ionizantes*

Tanto las radiaciones electromagnéticas como de partículas son carcinógenas. Inducen roturas cromosómicas, translocaciones, mutaciones, lesiones de proteínas, de membranas.

El efecto de las Rx depende de: a) tipo de radiación; b) dosis; c) índice de dosificación; d) reparación del DNA y e) factores del huésped. En casos de exposición a dosis muy altas de radiaciones ionizantes está demostrado que pueden desarrollarse diversos tipos de tumores y que el daño genético puede ser muy amplio con afectación de múltiples genes supresores, oncogenes...

AGENTES QUÍMICOS Y ALTERACIONES MOLECULARES

1.- *Mutaciones oncogén RAS*

- Nitrosaminas. Mutaciones selectivas.
- Frecuente en roedores.

2.- *Mutaciones de p53*

- a.- Aflatoxina y virus hepatitis B; Hepatocarcinoma. Mutaciones selectivas G--T (codon 249)
- b.- Radiaciones ultravioleta y carcinoma epidermoide de piel
Mutaciones sitios dipirimidina; CC o TT
- c.- Tabaco y alcohol. mp53. Cáncer esófago y pulmón.

CARCINOGENESIS VÍRICA

A) *Virus RNA*

Son los retrovirus. Pueden ser:

- a) *Transformantes agudos*. Llevan incorporados secuencias de oncogenes (protooncogenes transducidos en retrovirus y mutados o sujetos luego a los promotores víricos). Se conocen más de 15, destacando los siguientes:
 - v. sarcoma Rous. (src). tirosin quinasa
 - v. sarcoma felino. (fes)
 - v. eritroblastosis avian (erbA). receptos H.Tir.
 - v. Moloney. (mos). Serin-treonin quinasa
 - v. sarcoma simio. (sis). -PDGF
 - v. leucemia murina Abelson. (abl)

- v. AMV-E26. (ets)
- v. MC29 (myc), v.mieloblastosis avian (myb)
- v. Harvey MSV. (h-ras)

b) *Retrovirus de transformación lenta*. No llevan oncogenes. La propia infección del retrovirus conlleva su integración en el ADN del huésped y dicha inserción puede originar mutaciones y alteraciones estructurales del ADN. Por tanto, tendría un efecto oncogénico indirecto en función de las alteraciones producidas por su propia integración, en lo denominado mutagénesis de inserción.

B) *Virus DNA*

1.- Adenovirus

2.- Virus papiloma humanos

—Más de 70 subtipos distintos de HPV, que puede inducir lesiones benignas como verrugas cutáneas y papilomas (1,2,4,7); cáncer verrucoso genital (6 y 11); cánceres de cuello uterino y boca (16, 18 y 33); cáncer de laringe (30 y 40).

3.- Epstein-Barr

Relacionado con el linfoma de Burkitt, carcinomas nasofaríngeos y otros tumores.

No siempre forma tumores y depende, por ejemplo, de la localización geográfica y factores del huésped, pudiendo originar también enfermedades benignas como la mononucleosis infecciosa.

4.- Virus de la Hepatitis B

La asociación de virus con el desarrollo de tumores es un hecho claramente demostrado desde hace más de 80 de años. En 1908, Ellerman y Bary observaron la asociación de agentes transmisibles con la aparición de leucemias en las gallinas y en 1910, Peyton Rous, demostró fehacientemente la transmisión de sarcoma en las gallinas. También hace muchas décadas se pudo objetivar, como diversos agentes carcinogénicos podían acelerar el crecimiento tumoral si se aplicaban conjuntamente, y de hecho, en 1915 ya se demostró la colaboración entre virus (virus de Shope) con carcinógenos químicos (alquitrán).

Hoy en día, los virus están relacionados con más del 15% de los tumores humanos y constituyen el 2º factor de carcinogénesis más relevante (1, 2, 48). De hecho, su asociación con algunos grupos de tumores humanos es incuestionable (ver tabla I).

TABLA I

VIRUS Y CÁNCER

- Virus papiloma humanos: c.cérvix, laringe, piel
- Virus Hepatitis B, C: hepatocarcinomas
- Virus de Epstein-Barr: Linfoma Burkitt, L. postrasplante, L. de Hodgkin, C. nasofaringe, indiferenciados estómago,
- V. Herpes tipo 1: tumores estromales (exp.)
- V. Herpes tipo 2: C. cérvix
- Virus linfotrópicos humanos tipo 1: (HTLV-1)
- Virus de la leucemia-linfoma T del adulto :ATL
- SV40 y algunos tumores de plexos coroides
- V. Herpes tipo 8: S. de Kaposi, L. de serosas

Con los datos que conocemos en la actualidad se puede decir que genes y proteínas virales pueden interrelacionar y/o afectar a los diversos mecanismos moleculares involu-

crados en la transformación maligna celular. Hay genes virales que pueden involucrarse en los mecanismos de proliferación celular, en el ciclo celular, en las rutas de apoptosis e incluso inducir fenotipos de inestabilidad genética.

La relación entre genes virales y el ciclo celular se conoce muy bien en el grupo del virus del papiloma humano, de los adenovirus, del SV40, de los AAV o adenoasociados y el de la hepatitis B. De hecho, la proteína del gen del retinoblastoma es inactivada por el gen E7 del VPH, por el gen E1A de los denovirus, y por el SV40. La proteína p53 también puede ser inactivada por productos virales del papiloma humano (E6) y de adenovirus (55kE1B).

En relación con el control de la apoptosis celular hay muchos genes virales que pueden interferir en la misma, bien activándola o inhibiéndola. Entre los activadores destacan el gen E1A de adenovirus, el HIV y como inhibidores, el gen 19KE1B, el virus de Epstein Barr.

• *Activadores apoptosis:*

- Ad E1A. p53 dependiente e independiente
- HIV

• *Inhibidores apoptosis:*

- Ad E1B 19K. Se une a BAX
- EBV. Codifica homólogo bcl2. EBV-LMP1 a través de los TRAFs aumenta bcl2 endógeno
- V. de la fiebre africana Codifica homólogo bcl2.
- cowpox virus crm A. Inhiben ICE-like proteasas
- baculovirus p35

El virus mejor conocido es el virus de Epstein Barr (EBV) que está relacionado con el desarrollo de procesos linfoproliferativos y algunos tumores sólidos. Son de la familia herpes y pueden inmortalizar rápidamente linfocitos B.

Y, por último, los virus también se están asociando a la inducción de inestabilidad genética, que es uno de los mecanismos básicos de carcinogénesis molecular. Virus, como los HPV 16 y 18, adenovirus, el SV40 se han asociado a inestabilidad cromosómica, asociaciones teloméricas, con el aumento de integración de otras secuencias génicas en el ADN. El herpes tipo 8 se ha relacionado con la inducción de inestabilidad de microsatélites, el virus de la hepatitis B con la presencia de deleciones cromosómicas. El mecanismo de acción no es conocido en profundidad para la mayoría de dichos virus. Probablemente, gran parte de la inestabilidad venga mediada por la inhibición de proteínas celulares claves en el ciclo celular y en el control de la integridad genómica, como sucede con la inactivación de p53 y de p21 waf1.

TABLA II

VIRUS E INESTABILIDAD GENÉTICA

- por inhibición p53 y p21 waf1
- aneuploidia, errores DNA.
- HPV 16, 18
- aneuploidias, asociaciones teloméricas.
- aumento integración otras secuencias génicas en el DNA.
- Adenovirus, SV40:
- aneuploidias, poliploidias.
- HHV-8:
- inestabilidad microsatélites
- HBV:
- deleciones.

MODELO GENÉTICO DE CARCINOGENESIS COLO-RECTAL

Fue básicamente el grupo liderado por Vert Vogelstein del John Hopkin's en Estados Unidos, el que hace varios años empezó a poner orden al complejo puzzle de alteraciones oncogénicas en el cáncer (15). Como patólogos se centraron en el estudio del cáncer de colon, que tiene una serie de lesiones histológicas previas bien definidas. El objetivo fue correlacionar las alteraciones histológicas durante las diferentes fases de la carcinogénesis rectal, con el panel de oncogenes y genes supresores conocidos (Figura 1).

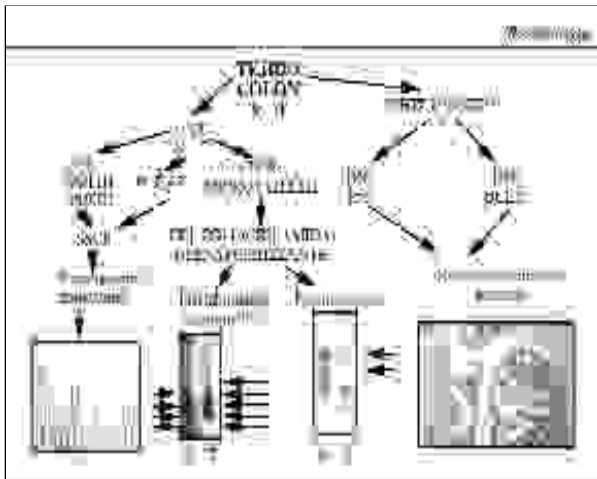


Fig. 1. Esquema de las diversas alteraciones moleculares que se pueden detectar en tumores de colon. El estudio de mutaciones de p53, de genes reparadores se hace por PCR, confirmando las mutaciones por secuenciación. Las mutaciones de K-ras se suelen detectar también por PCR específicas y la inestabilidad de microsatélites detectando variabilidad de bandas, en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, en productos obtenidos previamente por PCR. De este modo, también se pueden estudiar las pérdidas alélicas. A nivel tisular se puede detectar la expresión de p53, bcl2, ras.

De este modo, empezaron a estudiar de forma sistemática la mucosa colónica peritumoral, los adenomas de pequeño tamaño, mediano y gran tamaño, los adenocarcinomas *in situ*, infiltrantes y las metástasis. En los estudios preliminares se vio que, para el desarrollo de un tumor colónico invasivo era necesario la acumulación de múltiples alteraciones genéticas. De hecho vieron que pequeños adenomas podían tener un origen clonal pero no cumplían criterios de malignidad.

En las fases iniciales, en mucosas con signos hiperplásicos, se detectaron alteraciones de la mutilación del ADN. En la transición, con pequeños adenomas ya había una afectación muy frecuente de un gen, el de la poliposis colónica familiar o APC. Mutaciones o pérdidas alélicas del APC se detectan hasta en el 60% de los cánceres rectales y es la alteración genética más frecuente en adenomas pequeños. Otro gen del cromosoma 5q 211, el MCC (mutado en cáncer de colon) también se detecta activado en más del 15% de los cánceres de colon.

En adenomas de mayor tamaño, ya es frecuente descubrir mutaciones del gen ras (K-ras). Estas mutaciones se detectan entre el 50-70% de los adenomas grandes y

adenocarcinomas. Se localizan en su mayor parte en los codones 12, 13 y 61. Se ha correlacionado el potencial metastático con mutaciones en el codon 12 y especialmente la presencia de transversiones G por T o G por C. Por último, los genes que también se detectan con frecuencia alterados en tumores de colon, son el DCC, en el cromosoma 18q y el p53 en el cromosoma 17p. El gen DCC tiene una alta homología con la molécula de adhesión celular (NCAM) y se piensa que la inactivación del DCC puede contribuir al potencial infiltrativo de la célula maligna. La región 18q está delecionada en alrededor del 75% de los cánceres de colon. Se correlaciona con peor pronóstico en los tumores en estadio II.

En el modelo de carcinogénesis expuesto, muy didáctico y práctico en tumores de colon izquierdo, se representa no sólo los avances en patología molecular del cáncer de colon sino también un esquema de los que se presupone puede ser el gran pilar de la futura patología: la correlación de las lesiones genéticas oncogénicas con los diversos patrones y alteraciones histopatológicas (Figura 2).

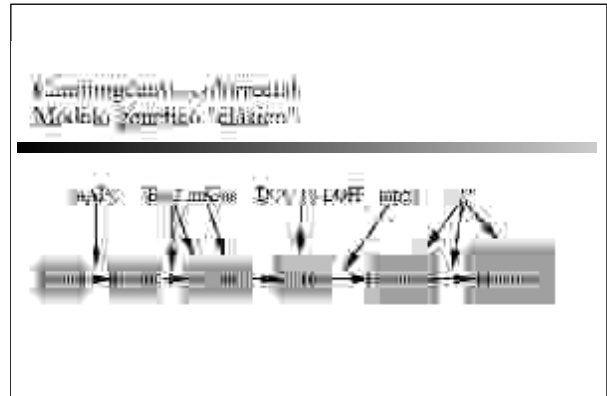


Fig. 2. Modelo de carcinogénesis colorectal clásico de Vogelstein.

Otra de las alteraciones oncogénicas que también se están estudiando es la expresión de Bcl-2 (43). Este gen se expresa en células basales del epitelio en condiciones normales y parece que la pérdida de expresión de Bcl-2 se asocia con la diferenciación colónica mucoide superficial. Activación del Bcl-2 se ha visto en estadios iniciales del desarrollo tumoral colónico y condicionaría una inhibición de la apoptosis fisiológica, y por tanto, un aumento de la supervivencia celular y de la posibilidad de acumulación de alteraciones genéticas. De forma semejante a lo que se describe en tumores de mama hay una correlación inversa entre la expresión de bcl-2 y la presencia de p53 mutada. La coexpresión de bcl-2 y p53 mutada se detecta en alrededor del 35% de los cánceres de colon y se asocia a peor pronóstico.

SÍNDROME DEL CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO ASOCIADO A POLIPOSIS

La frecuencia de este síndrome se estima entre el 5-15% de los cánceres de colon. Hay una variante, llama-

da tipo II, que se distingue por la asociación con cánceres extracolónicos, especialmente de endometrio, ovario, ureter, pelvis renal... De hecho, la presencia de antecedentes de cáncer de colon en un pariente de primer grado eleva el riesgo de desarrollar cáncer de colon entre 1,8 y 8 veces. La Sociedad Americana del Cáncer recomienda que todas las personas con uno o más parientes de primer grado con cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 55 años se someta a exámenes periódicos, cada 3-5 años, empezando sobre los 35-40 años (39).

Es un síndrome con herencia autosómica dominante. Puede haber pólipos adenomatosos, pero siempre en número inferior a 100, y a nivel del colon proximal. Clínicamente, suele aparecer sobre los 40 años y los cánceres se localizan en colon proximal o derecho. Es frecuente que haya más de un foco e histológicamente el porcentaje de los tipos mucinosos y poco diferenciados es mayor del habitual.

CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

El mecanismo molecular descrito en el desarrollo de los cánceres de colon "familiares" y en, alrededor del 15% de los casos esporádicos, fue hipotetizado y demostrado inicialmente por M. Perucho (23). Este autor describió como un grupo de tumores de colon muestran una alta inestabilidad genética, manifestada por numerosas mutaciones dispersas por todo el genoma. De forma complementaria, Vogelstein y Albert de la Chapelle, localizaron por medio de marcadores genéticos, tipo microsatélites, que el locus afecto en pacientes con Síndrome de Lynch se localizaba en el cromosoma 2 (6). Posteriormente, se identificó que un gen homólogo a otro de levadura (MSH2) y de bacterias (Muts), que intervienen en la reparación del DNA, se localizaba en el cromosoma 2. Se demostró que dicho gen estaba mutado en un % significativo de enfermos con el síndrome de Lynch y se confirmó un nuevo mecanismo de carcinogénesis, basado en la existencia de alteraciones en la reparación del DNA. Sería la alteración de un enzima reparadora del DNA, la que indirectamente permitiría que se acumularan múltiples alteraciones genéticas. Los tumores con alteraciones de estos "enzimas reparadores" tienen múltiples alteraciones genéticas y tienen un fenotipo mutador o RER+. Hoy en día, ya se conocen 6 genes relacionados, que se han denominado hMSH2 (2p15-16) y hMLH1 (cromosoma 3), hPMS1 (cromosoma 2q 31-33), hPMS2 (cromosoma 7p22), hMSH3 y hMSH6. El DNA de pacientes afectados con este síndrome tiene múltiples errores de replicación, muy característicos a nivel de los microsatélites. De hecho, la forma habitual de estudiar la presencia de inestabilidad en los tumores es analizando alrededor de 5 microsatélites; la presencia de variabilidad genética en al menos dos de los cinco microsatélites se considera concordante con la existencia de inestabilidad genética (25,28,35).

Los tumores con gran inestabilidad genética son menos agresivos clínicamente, con mejor pronóstico. De forma un tanto paradójica, tienen un porcentaje

menor de mutaciones de ras y de p53. Se piensa que quizás el mejor pronóstico vaya dado porque la inestabilidad genética de dichas células condicione una selección de las "células menos mutadas" o que pueda haber mayor expresión de antígenos tumorales que induzca una mayor respuesta inmune. No obstante, estudios recientes tienden a delimitar al menos tres grupos de cánceres de colon según su localización y las alteraciones genéticas. La presencia de inestabilidad se asocia a mejor pronóstico pero la alteración concomitante del gen supresor p53 conlleva mal pronóstico y un alto porcentaje de afectación metastática.

ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL CÁNCER DE MAMA

En tumores de mama se han identificado múltiples alteraciones cromosómicas que involucran deleciones en los cromosomas 3p, 11p, 13q y 17p y también pérdida de heterozigocidad en los cromosomas 1p, 1q, 17q y 18q entre otras. Algunas de estas alteraciones ocasionan la pérdida de los denominados genes supresores, como el gen del retinoblastoma o el gen p53. Otros cromosomas con frecuentes alteraciones genéticas son el 7,11 y 16. El modelo de carcinogénesis secuencial, con acumulación progresiva de alteraciones oncogénicas está más o menos claro en cáncer de colon y, en mama se admite que también la formación de un cáncer invasivo tiene que pasar por las fases de lesiones hiperplásicas, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo y metástasis. El orden activación/inactivación de las diversas alteraciones en cáncer de mama no está claro en la actualidad y no se han encontrado alteraciones oncogénicas específicas que se correlacionen claramente con las diferentes entidades anatomopatológicas. No obstante, en el desarrollo y progresión de los carcinomas intraductales, de los tumores de bajo grado histológico a los de alto grado hay también una progresiva acumulación y expresión de alteraciones oncogénicas. De hecho, mutaciones de p53 se han detectado en una pequeña proporción de tumores de bajo grado y con una alta prevalencia en los carcinomas intraductales tipo comedocarcinoma. Semejantes porcentajes se detectan con la sobreexpresión de Erb-B2. Asimismo, también se detecta una progresiva acumulación de alteraciones cromosómicas desde los tumores de bajo grado a los de alto grado; de hecho, son frecuentes las pérdidas de heterozigocidad de las regiones 8p, 13q, 16q, 17p, 17q en las lesiones intraductales de alto grado (6, 5, 11-14, 18, 19, 27, 30, 44, 45) (Figura 3).

Mp53. El porcentaje de mutaciones de p53 y/o acumulación de proteína "inactiva" oscila entre el 46% y el 22% según las series. Se detecta mutaciones del p53 hasta en el 16% de los adenocarcinomas *in situ* de mama, indicando por tanto que puede ser una alteración oncogénica precoz en el desarrollo del cáncer de mama. En tumores "familiares", su incidencia llega hasta el 50%. Su positividad se correlaciona con tumores de alto grado y atipia celular. Asimismo, se ha descrito una asociación significativa entre alteraciones de p53 y presencia de inestabilidad genética, con amplificación de

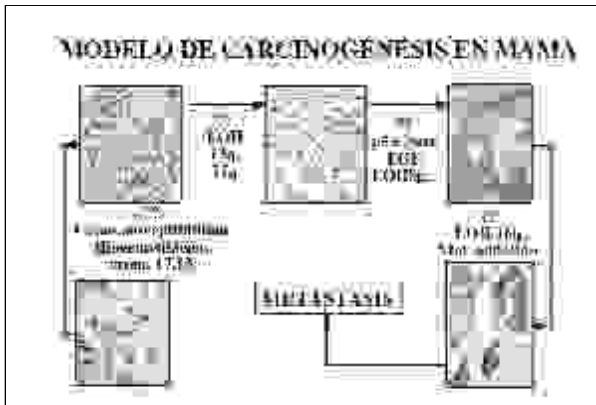


Fig. 3. Modelo de carcinogénesis en tumores de mama. Se puede observar la progresión de las lesiones histológicas desde biopsias con focos de displasia leve, grave, carcinoma *in situ* e infiltrante y la acumulación de diversas alteraciones moleculares.

erbB2, pérdida alélica del cromosoma 17 y anomalías en varios cromosomas. Es importante el resaltar que no se ha establecido correlación entre la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 y mutaciones de dicho gen. De hecho, recientes revisiones apuntan que la correlación pronóstica sólo se observa con la presencia de mutaciones de p53 y no con los estudios inmunohistoquímicos (14, 24, 29, 31, 33, 44, 46).

NEU-erbB2-HER2: De los genes codificantes para factores de crecimiento se han estudiado fundamentalmente los oncogenes *erb-B* (análogo del receptor para EGF o epidermal growth factor) y el *neu/erb-B2/HER-2* (de la familia del receptor para EGF). El *c-erbB-2* (*HER-2/neu*) codifica para una proteína de 185 Kd, que es una glicoproteína de membrana con dominios intra y extracelulares. Tiene actividad tirosinquinasa, y es homólogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFr. La sobre-expresión de la proteína neu, en la inmensa mayoría de los casos por amplificación génica, puede transformar diversas líneas celulares y en animales transgénicos se ha visto que sobre-expresión de esta tirosinquinasa de membrana se desarrollan con frecuencia adenocarcinomas de mama. Se ha intentado relacionar el cáncer de mama, con la sobre-expresión de gen *neu/erbB2/HER-2*. Hay numerosos estudios que enfatizan la frecuencia de sobreexpresión de neu en dichos tumores, correlacionándose con el pronóstico, especialmente en tumores con ganglios positivos. Se ha visto amplificación en un 20-40% de los cánceres de mama invasivos y en más del 50% de los adenocarcinomas *in situ*. Se detecta principalmente en tumores de grado nuclear 3. Asimismo, se ha correlacionado el nivel sérico con la presencia de metástasis y recientemente se ha correlacionado con la resistencia al tratamiento quimioterápico (3).

OTRAS ALTERACIONES ONCOGÉNICAS

En cáncer de mama, además de la cooperación de ambos grupos de genes, se han publicado casos de

coexistencia de pérdida de función de genes supresores como RB y p53 en las mismas muestras tumorales, así como, la coparticipación de más de un oncogén activado, como es el caso de la familia *myc* entre sí o conjuntamente con *ras* o *c-raf*. Cooperación entre dichos oncogenes también se ha descrito en líneas celulares de tumores de mama. Asimismo, se ha detectado aumento de proteína sérica de *erbB-2* y de *myc* hasta en el 57% de los adenocarcinomas *in situ* de mama, siendo un marcador tumoral que puede valorar la evolución de la enfermedad (36).

Otras alteraciones oncogénicas que se están estudiando en cánceres de mama son la ciclina D/*PRAD1* y la expresión de *Bcl-2*. El *Bcl-2* codifica para una proteína mitocondrial relacionada con la apoptosis. Su positividad se asocia en cánceres de mama con mejor pronóstico y positividad para los receptores estrogénicos.

Es interesante destacar las frecuentes alteraciones moleculares a nivel de determinadas regiones cromosómicas, en el entorno de los genes de predisposición familiar al cáncer de mama *BRAC1* y *BRCA2*. Por ejemplo, se describe pérdida de heterocigosidad (LOH) 13q12-13 en más del 50% de los carcinomas esporádicos; en dicha región se encuentran el *BRCA2* y el gen del retinoblastoma. Interesantemente, los cánceres de mama con mutaciones de *BRCA1* tienen un alto índice proliferativo y un grado histológico alto. Asimismo, se encuentran alteraciones muy frecuentemente a nivel de la región 17q11-21 donde se localizan el *BRCA1*, *erbB2*, *MLN50*, *MLN51*, *MLN62*, *MLN64* y otros.

Otras alteraciones oncogénicas a destacar son la actividad del receptor de factor de crecimiento en alrededor del 40-50% de los tumores, de *c-myc* en alrededor del 20% que se correlaciona con mayor actividad proliferativa tumoral. Por último, indicar que algunas alteraciones oncogénicas muy frecuentes en otro tipo de tumores, como los oncogenes de la familia *ras*, se detectan en un muy pequeño porcentaje de cánceres de mama, indicando que su activación debe venir mediada por factores carcinogénicos específicos y que entren por vía digestiva; su incidencia es menor al 5% en tumores de mama, correlacionándose la activación *ras* con peor pronóstico.

Es importante englobar el papel de los genes relacionado con la reparación del ADN y el fenotipo de inestabilidad genética. Se han descrito tumores asociados al síndrome de Lynch, a portadores heterocigotos del gen de la ataxia telangiectasia (en algunas series pueden representar hasta el 10-15% de los tumores). En este contexto, también hay que considerar las mutaciones de p53 que se asocian a inestabilidad y a la acumulación de múltiples alteraciones moleculares (42).

Los factores relacionados con la vascularización del tumor, las diversas moléculas de adhesión descritas, colagenasas y factores relacionados con la infiltración del estroma y las metástasis, son cada vez más conocidos y relevantes en la comprensión de los mecanismos carcinogénicos mamarios. Destaca la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial

vascular VEGF, los diversos tipos de colagenasas y alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión como el DCC, CD44, cadherina-E. Asimismo, diversos estudios correlacionan la expresión de vimentina, un filamento intermedio en células mesenquimales, con carcinomas poco diferenciados y de peor pronóstico. En células epiteliales se expresan queratinas como filamentos intermedios y el hecho de que haya coexpresión de vimentina y queratinas puede indicar la presencia de un fenotipo desdiferenciado y, de hecho, dichos tumores suelen ser negativos para receptores estrogénicos y más resistentes a protocolos quimioterápicos. En este sentido, también destacan los estudios de expresión de diversos componentes de la familia de las integrinas (en especial A₂ B₁), que son receptores de membrana y median la adhesión celular y la adhesión con la matriz extracelular. De hecho, en carcinomas poco diferenciado se ha visto disminución de A₂ B₁ y también se ha asociado a peor pronóstico y a mayor invasividad de las células tumorales. El control genético de la expresión de estas enzimas y componentes de la membrana celular es muy complejo y poco conocido; en parte viene mediado por factores epigenéticos, locales, que controlan y regulan la expresión de los mismos. Es decir, en estadios avanzados así como, en lesiones infiltrantes las alteraciones moleculares que impulsan la agresividad celular no sólo dependen de las propias células tumorales sino que también las células mesenquimales pueden condicionar en gran medida la expresión de genes imprescindibles para la adquisición de un fenotipo invasivo y metastatizante.

PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS POST-TRASPLANTE

Son procesos relativamente frecuentes, con una incidencia variable según el órgano trasplantado. Se pueden detectar hasta en el 2% de los pacientes trasplantados de corazón y en más de 5% del trasplantados de pulmón. Son un grupo muy heterogéneo de procesos linfoides que pueden regresar tras el cese de la inmunosupresión. De forma muy característica, en todos ellos hay infección por el virus de Epstein-Barr y se pueden distinguir desde lesiones hiperplásicas, tumores poco agresivos, hasta linfomas de alto grado de malignidad, de fenotipo B. En este modelo de tumores humanos, se ha demostrado también una secuencia muy clara de acumulación de alteraciones moleculares con el desarrollo de linfomas de menor o mayor agresividad.

Se distinguen tres categorías de procesos linfoides, según Knowles (26):

A) *Hiperplasias plasmocíticas*. Generalmente se detectan en la región orofaríngea y ganglios, son policlonales y muestran múltiples copias del virus EBV. No se detectan todavía alteraciones concogénicas de bcl-1, bcl-2, c-myc, ras,

B) *Hiperplasias de células B polimórficas- Linfomas B polimórficos*. Son casi siempre monoclonales y expresan una única forma del virus EBV. Están constituidos por clones inmortalizados por el virus de EBV que

muestran una clara ventaja de crecimiento sobre el resto del tejido linfoide.

C) *Linfomas inmunoblásticos o mielomas múltiples*. Derivan del grupo anterior de procesos linfoproliferativos y se caracterizan porque ya se detectan alteraciones oncogénicas, como mutaciones de p53, del N-ras, del c-myc.

Esquemáticamente, la secuencia carcinogénica sería la siguiente:

1. Infección /reactivación EBV (pral. EBV tipo A).
2. EBV confiere actividad proliferativa (sí inmunosupresión).
3. EBV inmortaliza células B. Policlonalidad: Hiperplasias plasmocíticas.
4. Predominio proliferación algunos clones (*oligo*) o de uno (*monoclonal*).
5. Hiperplasia células B polimórficas- linfomas B polimórficos.
6. Acumulación alteraciones oncogénicas en clones seleccionados: Linfomas inmunoblásticos o mielomas múltiples.

RESUMEN

La formación de tumores humanos es muy compleja y requiere la acumulación de múltiples alteraciones oncogénicas. Dichas alteraciones moleculares van asociadas al desarrollo de los tumores, que en su inmensa mayoría muestran una progresión histopatológica desde lesiones incipientes, con grados de displasia y atipia variables, con tumores "benignos", carcinomas intraepiteliales, tumores infiltrantes y finalmente con diseminación metastática. La distinción entre benigno y maligno es simple, y conceptualmente errónea en muchos tumores y procesos neoplásicos. Es un error considerar a los tumores como procesos estáticos, que son definidos por una serie de características descritas en un momento dado y en un contexto anatomopatológico determinado. Desde el punto de vista molecular, el proceso carcinogénico se considera más dinámico y presumiblemente puede explicar la evolución frecuentemente impredecible de muchos procesos neoplásicos considerados benignos clínicamente.

La transformación maligna celular está relacionada a la activación de diversos oncogenes y a la inactivación de genes supresores. En dicho proceso de transformación celular va implícito el fallo de las células a diferenciarse (22) y la activación de vías celulares que inducen proliferación. Dentro del complejo puzzle de alteraciones moleculares que pueden estar involucradas en el desarrollo de los tumores, es importante destacar la distinción de los genes gatekeepers (controladores del ciclo celular) y los carekeepers (controladores de la replicación fidedigna del ADN), propuesto por Vogelstein (25). De hecho, las células pueden tener sólo uno o algunos de estos genes inactivados y que variarían según el tipo celular. Esta concepción de los genes reguladores, específicos de determinados tipos celulares, explicaría por-

qué mutaciones que se heredan por línea germinal sólo tengan efectos oncogénicos en determinadas localizaciones del organismo. Por ejemplo, el gen del retinoblastoma, el de von Hippel Lindau, el de la neurofibromatosis tipo 1 y el de la poliposis adenomatosa. En el caso de los genes reparadores, su importancia oncogénica sería indirecta, dado que no intervienen en la promoción tumoral inicial de las células, sino que al fallar la reparación de genes se induciría inestabilidad genética, con acumulación de mutaciones a lo largo del genoma, incluyendo en los gatekeepers genes. Genes "reparadores" conocidos hasta la fecha incluirían los del xeroderma pigmentosum, el cáncer de colon familiar no asociado a poliposis, la ataxia telangiectasia, y probablemente también los genes del BRCA1 y BRCA2 de predisposición al cáncer de mama.

No obstante, es importante resumir algunas consideraciones generales relacionadas con los mecanismos de carcinogénesis y de transformación celular, para poder entender mejor su aplicabilidad clínica en las vertientes de diagnóstico, pronóstico y de tratamiento.

a) La descripción de oncogenes y genes supresores se basa en la capacidad transformante que confieren los oncogenes, y la pérdida de función de la actividad supresora de los genes supresores. Es importante el resaltar que hay más de 100 oncogenes con capacidad transformante *in vitro*, y que la mayoría de los genes relacionados con el ciclo celular, la proliferación celular, los factores de crecimiento, así como, con las múltiples rutas de transmisión de señales, involucran a genes cuya pérdida de control o con actividad constitutiva pueden asociarse a dicha ventaja de crecimiento que finalmente confiere la actividad transformante. No obstante, es importante el saber que los criterios para calificar a una determinada alteración molecular como oncogénica son experimentales y que se basan en que las células con un oncogén activado pueden crecer indefinidamente en cultivo, incluso en condiciones de bajo suero, que pueden formar colonias en "soft agar" y que en determinadas situaciones pueden formar tumores tras su inyección en ratones atímicos. Dichos criterios y su relación con el concepto de malignidad clínica no son equiparables. Cada vez se describe con más frecuencia mutaciones y amplificaciones de oncogenes y delección de genes supresores en lesiones humanas no malignas, focos hiperplásicos, metaplasias, etc., es decir, *no se puede hablar tampoco de malignidad de una lesión histológica basándose exclusivamente en las alteraciones moleculares*. Ejemplos con mutaciones de ras y de p53 en lesiones reactivas y benignas de pulmón, laringe, colon, se están empezando a describir con asiduidad. Además, recientemente se ha descrito cómo el efecto transformante de oncogenes como el ras está relacionado con los niveles de expresión proteica e incluso en casos con mutaciones, no se han detectado niveles equiparables a los necesarios para conseguir un efecto transformante *in vitro* (21).

b) Salvo algunos procesos hematopoyéticos, linfoproliferativos y tumores infantiles de células pequeñas

no hay alteraciones moleculares específicas de un determinado tumor. En este sentido habría que asumir que dentro del enorme número de alteraciones moleculares que pueden conllevar ventaja de crecimiento celular, los múltiples agentes carcinógenos (químicos, víricos y radiaciones) pueden elegir o activar indistintamente a varios de ellos y lo que finalmente lleve al desarrollo tumoral sea la acumulación complementaria de varias alteraciones oncogénicas que contrarresten los controles fisiológicos de proliferación celular y los diversos factores mesenquimales e inmunológicos.

c) Hay una enorme heterogeneidad y variabilidad en los tumores humanos, con más de 250 tipos diferentes o entidades anatomoclínicas, y casi ilimitados subtipos o variantes morfológicas. Dicha heterogeneidad tiene que ser el resultado de combinar dos variables. Una variable son los diversos tipos celulares de origen (en principio cualquier célula del organismo) y la otra, el elevadísimo número de alteraciones moleculares que se pueden superponer en el proceso transformante. A nivel molecular, se puede demostrar la *variabilidad morfológica en función de diversos oncogenes y alteraciones oncogénicas presentes en las células*.

Asimismo, la evolución biológica, la respuesta inmune y la resistencia a los agentes quimio y radioterápicos también se correlaciona con los numerosos genes involucrados en la carcinogénesis. Hay ejemplos claros de como las mismas células pueden formar lesiones mínimas en ratones singénicos y por el contrario tumores muy agresivos en ratones inmunodeprimidos. Asimismo, la capacidad transformante de los diversos oncogenes, en el sentido de agresividad tumoral y biológica no es la misma para los diversos oncogenes, habiendo ejemplos de transformación a partir de las mismas células en que algunos oncogenes inducen tumores de crecimiento lento y bien diferenciados, mientras otros se asocian a tumores agresivos y muy infiltrativos. Además, no todas las alteraciones oncogénicas descritas se asocian a peor pronóstico de los tumores. De hecho, la sobreexpresión de bcl2 se asocia a mejor pronóstico en cáncer de mama y de pulmón, e incluso determinadas alteraciones moleculares, como las mutaciones del BRCA2 de cáncer de mama, se pueden asociar a mayor radiosensibilidad del tumor. Por tanto, la detección de algunas alteraciones moleculares puede ser un factor pronóstico favorable y orientar algún tipo de tratamiento más específico.

d) En el propio concepto de tumorigenicidad, va implícita la impredecibilidad de su evolución biológica. Los procesos tumorales van acumulando durante su desarrollo numerosas alteraciones moleculares. Esto es un hecho incontrovertible, que hoy en día se tiende a explicar tanto por la propia dinámica del proceso carcinogénico como por la presencia de diversas alteraciones moleculares, que favorecen la acumulación de múltiples errores genéticos en la células. Por ejemplo, por el fallo de los genes involucrados con la reparación del DNA y con las mutaciones de p53.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alani RM and Münger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol*, 16:330-337, 1998.
2. Ames BN, Swirsky Gold L and Willet WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5258-5265.
3. Arteaga C, Winnier A, Poirier M, Lopez-Arraza D, Shawver L, Hurd S and Stewart S. p185c-erbB-2 signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells: association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and drug-induced DNA repair. *Cancer Res* 1994, 54:3758-3765.
4. Barinaga M. Designing therapies that target tumor blood vessels. *Science* 1997, 275:482-484.
5. Beckmann M, Niederacher D, Schnurch H, Gusterson B and Bender H. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 1997, 75: 429-439.
6. Bieche I, Tomasetto C, Regnier CH, Moog-Lutz C, Rio MC and Lidereau R. Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer. *Cancer Res* 1996, 56: 3886-3890.
7. Bishop JM: Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991, 64:235-248.
8. Blau HM, Springer MI. Gene therapy. A novel form of drug delivery. *N Engl J Med* 1995, 333:1204-1207.
9. Bonetta L. Tumor-suppressor genes. Open questions on p16. *Nature* 370:180, 1994
10. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins G, Willson J, Markowitz S, Kinzler K and Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoints genes in human cancers. *Nature* 1997, 392, 300-303.
11. Callahan R, Cropp CS, Merlo GR, Liscia DS, Cappa APM and Lidereau R. Somatic mutations and human breast cancer. A status report. *Cancer* 1992, 69:1582-1588.
12. Eisinger F, Stoppa D, Longy M, Kerangueven F, Noguchi T, Bailly C, Vincent A, Jacquemier J, Birnbaum D and Sobol H. Germ line mutation at BRCA1 affects the histoprognostic grade in hereditary breast cancer. *Cancer Res* 1997, 56:471-474.
13. Ellisen LW and Haber DA. Hereditary breast cancer. *Annu Rev Med* 1998, 49:425-436.
14. Eyfjord JE, Thorlacius S, Steinarsdottir M, Valgardsdottir R, Ogmundsdottir HM and Anamthawat-Johnson K. P53 abnormalities and genomic instability in primary human breast carcinomas. *Cancer Res* 1995, 55: 646-651.
15. Fearon E and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767, 1990.
16. Fearon ER. Human Cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 278:1043-1048, 1997.
17. Fisher DA. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994, 78:539-542.
18. Hamann U, Herbold C, Costa S, Solomayer EF, Kaufmann M, Bastert G, Ulmer HU, Frenzel H and Komitowski D. Allelic imbalance on chromosome 13q: evidence for the involvement of BRCA2 and RB1 in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1996, 56: 1988-1990.
19. Hendrix M, Muschel R and Padarathsingh M. Recent advances in breast cancer research: from genes to management. *Am J Pathol* 1997,151: 883-888.
20. Hinds PW and Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics and Development* 1994, 4:135-141.
21. Hua VY, Wang WK and Duesberg PH. Dominant transformation by mutated human ras gene in vitro requires more than 100 times higher expression than is observed in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (18) : 9614-9619.
22. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell*, 1997; 88:333-346.
23. Ionov J, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D and Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-561.
24. Jansson T, Inganas M, Slogrem S, Norberg T, Lindgren A, Holmberg L and Bergh J. P53 status predicts survival in breast cancer patients treated with or without postoperative radiotherapy: a novel hypothesis based on clinical findings. *J Clin. Oncol* 1995, 13: 2745-2751.
25. Kinzler KW and Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386: 761-763.
26. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, Frizzera G, Chen J, Rose EA and Michler RE. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995; 85 : 552-565.
27. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC and Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994, 69:135-139.
28. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-649.
29. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331.
30. Lizard S, Lidereau R, Collin F, Arnal M, Hahnel L, Roignot P, Cuisenier J and Guerrin J. Benign breast disease: absence of genetic alterations at several loci implicated in breast cancer malignancy. *Cancer Res* 1995, 55: 4416-4419.
31. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE. p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993, 74:957-967.
32. McGinnis JM and Foege WH. Actual causes of death in the United States. *JAMA* 1993 270:2207-2212.
33. Merlo GR and Hynes NE. Cooperation between mutant p53 and the ras, raf, erb-2 and fgf-3 oncogenes for transformation of mammary cells. *Int.J. of Oncology* 1994, 5:1141-1150.
34. Parker SI, Tong T, Bolden S and Wingo PA. *Cancer Statistics, 1997. CA Cancer J Clin*1997; 47: 5-27.
35. Paulovich AG, Toczyski DP and Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell* 1997; 88: 315-321.
36. Poller DN, Snead DR, Roberts EC, Galea M, Bell JA, Gilmour A, Elston CW, BLamey RW and Illis IO. Oestrogen receptor expression in ductal carcinoma in situ of the breast: relationship to flow cytometric analysis of DNA and expression of the c-erbB-2 oncoprotein. *Br.J.Cancer* 1993, 68:156-161.
37. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372:143:149.
38. Rosai J. Breast. In Ackerman's Surgical Pathology, edited by Mosby, pp 1623-1626, 1996.
39. Rustgi AK. Hereditary gastrointestinal polyposis and non-polyposis syndromes. *The New England J of Medicine* 1994; 331: 1964,-1702.
40. Sanchez-Prieto R, Vargas JA, Carnero A, Marchetti E, Romero J, Durantez A, Lacal JC and Ramón y Cajal S. Modulation of cellular chemoresistance in keratinocytes by activation of different oncogenes. *International Journal of Cancer* 1995; 60:235-243.
41. Sánchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, LLeonart M, Martín P, Anaya A, Ramón y Cajal S. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1a gene. *Oncogene* 1996; 13:1083-1092.
42. Shaw JA, Walsh T, Chappell SA, Carey N, Johnson H and Walker RA. Microsatellite instability in early sporadic breast cancer. *British J of Cancer* 1996, 73: 1393-1397.
43. Sinicrpe FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens C, Lee JJ and Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer* 1995; Res 55:237-241.
44. Sjogren S, Inganas M, Norberg T, Lindgren A, Nordgren H, Holmberg L and Bergh J. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Nat Cancer Inst* 1996, 88: 173-182.
45. Steeg PS, Clare SE, Lawrence JA and Zhou Q. Molecular analysis of premalignant and carcinoma in situ lesions of the human breast. *Am J Pathol* 1996, 149:733-738.
46. Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch HT, Marcus JN, Schwartz L, Chen LC, Mayall BH and Smith HS. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J. of the Natl Cancer Inst* 1992, 84: 845-855.
47. Urquidi V, Tarin D and Goodison S. Telomerase in cancer: clinical applications. *Ann Med* 1998; 30: 419-430.
48. Young LS, Dawson CW and Eliopoulos AG. Viruses and apoptosis. *British Medical Bulletin* 1997; 53 : 509-521.
49. Woodruff MF. Cellular heterogeneity in tumors. *Br J Cancer* 1983,47:589-594.

Moléculas de adhesión y cáncer

E. ARANDA AGUILAR, J. R. DE LA HABA RODRÍGUEZ, I. C. BARNETO ARANDA

Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión son proteínas complejas que se localizan en la membrana de la célula tumoral, realizando funciones de relación con otras células y con la matriz extracelular. De forma global se le atribuye un papel crucial en procesos fisiológicos tan importantes como la embriogénesis, la respuesta inmune y angiogénesis. Además en los últimos años se ha visto que tienen un papel crucial en enfermedades infecciosas y autoinmunes así como en procesos de invasión y diseminación tumoral.

CLASIFICACIÓN

Selectinas

Estructuralmente son glucoproteínas de membrana tipo II que comparten un dominio aminoterminal tipo lectina por donde se va a unir a hidratos de carbono específicos. Se conocen 3 tipos. *La selectina L (Mel-14)*, que se expresa en la mayoría de los leucocitos circulantes, desprendiéndose de la membrana tras la activación celular. *La selectina P (CD62)*, se sintetiza en plaquetas donde se almacena en los gránulos α y en el endotelio en los gránulos de Weibel-Palade. Su expresión en la membrana se regula bajo estímulos citotóxicos. *La selectina E (ELAM-1)*, también expresada en el endotelio, bajo la regulación de citocinas, tales como interleucina -1 (ILE-1), factor de necrosis tumoral (FNT) y lipopolisacáridos (LPS).

Funcionalmente se caracterizan por la capacidad de interactuar con oligosacáridos sializados o sulfatados, relacionados con los antígenos Lewis a o Lewis x que pueden formar parte de la fracción glucídica de muchas glucoproteínas, y que con frecuencia expresan tumores.

Se conocen dos ligandos para la selectina L, GlyCAM-1 y GlyCAM-2, son glucoproteínas relacionadas con la familia de las mucinas. Las interacciones en las que median las selectinas son de una gran complejidad y redundancia. Por ejemplo la selectina L puede estar decorada en su fracción glucídica con ligandos para las selectinas E y P. De igual manera MadCAM una molécula de adhesión de la superfamilia de la inmunoglobulinas posee sitios potenciales de glicosilación que constituyen ligandos potenciales de unión a la selectina L. Estas modificaciones postranslacionales no tienen lugar en todos los tejidos donde se expresan MadCAM, lo que puede dotar de una cierta selectividad de tejido a dichas interacciones (1).

Integrinas

Son glucoproteínas heterodiméricas compuestas por una cadena α y otra β . Se expresan en una amplia variedad de tejidos. Son las principales proteínas a través de las cuales interactúan, las células con la matriz extracelular. Se clasifican en familias definidas por la cadena β de la que se conocen al menos 9 tipos diferentes. Cada una de ellas puede unirse a una cadena α resultando en una amplia variedad de integrinas (2). Los linfocitos utilizan las integrinas de las familias $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_2$ para unirse al endotelio y la matriz extracelular. Las integrinas $\alpha_4\beta_1$ de los linfocitos y algunas células tumorales se denominan VLA (*very late activation antigens*) y algunas de éstas se unen al endotelio activado a través de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) de la superfamilia de las inmunoglobulinas y otras con proteínas de la matriz como extracelular como el colágeno fibronectina, laminina, vimentina, etc... (3). La cadena β_2 se combina con diferentes cadenas α constituyendo la integrinas LFA-1 y Mac que interactúan con moléculas ICAM.

Las integrinas se expresan constitutivamente en leucocitos si bien su regulación es principalmente funcional diferenciando, por ejemplo, poblaciones linfocitarias. Intervienen en la consolidación de la interacción iniciada por otras moléculas de adhesión, principalmente las selectinas. Además se le atribuye la capacidad de fosforilarse en su dominio intracitoplasmático, y fosforilar otras proteínas citoplasmáticas iniciando la cascada de señales al núcleo y a otros sistemas celulares como el citoesqueleto (4).

Superfamilia de las inmunoglobulinas

La familia de las inmunoglobulinas incluye además del receptor clonotípico TCR y las inmunoglobulinas, receptores de adhesión como CD2, LFA-2, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD4, VCAM-1 y otras moléculas de adhesión el sistema nervioso.

Estructuralmente, comparten un número variable de dominios C-2, formados por dos planos de sentido contrario, unidos por un puente disulfuro.

Todas éstas, excepto ICAM-3 se expresan basalmente o tras la estimulación con citocinas, en el endotelio y participan en las interacciones entre el leucocito y el endotelio. La expresión de ICAM-3 es más restringida y únicamente se han demostrado *in vivo* en situaciones muy concretas como en algunos tumores epiteliales. Además se encuentran presentes en células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B) desarrollando un papel fundamental como accesorias en el reconocimiento antigénico y activación linfocitaria. A esta familia pertenece PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) molécula que se expresa de manera constitutiva en el endotelio, plaquetas y células del sistema inmunológico interviniendo en funciones de migración transendotelial y angiogénesis (5).

Cadherinas

Son moléculas de adhesión homofílicas, participan en las uniones entre células de la misma extirpe y mantienen la arquitectura tisular. Se agrupan en familias entre las que destacan las cadherinas E y P, las cuales se expresan en epitelios y las cadherinas N en tejido neural y músculo (6). Se relacionan inversamente con el grado de diferenciación celular y su pérdida de expresión en tumores se asocia con una mayor capacidad metastatizante.

CD44

Es una glucoproteína de membrana que se expresa en multitud de extirpes celulares. Existen múltiples variantes de CD44 debido al procesamiento alternativo de su ARN. CD44 es una molécula coactivadora, se le ha implicado en los procesos de circulación linfocitaria. Las variantes que contienen la secuencia codificada por el exón 6 le confieren un elevado potencial metastati-

zante, también parece tener un papel importante en la colonización de los ganglios por la células tumorales.

Multitud de estudios han ido demostrando la participación de estas moléculas en los diferentes pasos de diseminación metastásica (Tabla I).

TABLA I

LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN INTERVIENEN EN CADA UNO DE LOS PASOS IMPORTANTE EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA

Pasos diseminación	Familia	Moléculas
Reconocimiento antigénico tumoral	Superfamilia de las inmunoglobulinas	ICAM-1, ICAM-2
Cohesividad tumoral	Cadherinas	Cadherinas E,P.
Relación con la matriz extracelular	Integrinas	VLA-1,2,3,4,5 y 6 Mac-1, CD 104.
Adhesión y trans migración	Integrinas, Selectinas, SFIg	PECAM-1, Selectina E y P, ICAM-1 VCAM-1
Movilidad	Integrinas	
Angiogénesis	Integrinas Cadherinas y y SFIg	VCAM-1, Catherina E y PECAM-1

Una vez abandonado el tumor primario, favorecido por la pérdida de expresión de cadherinas, las células tumorales utilizan mecanismos de interacción, con la matriz, otras células y con el endotelio, muy similares a los que emplean los leucocitos en su proceso migratorio al foco inflamatorio.

Así, se producen interacciones con la matriz extracelular, la expresión de integrinas, algunas de ellas receptoras de componentes de la matriz confieren a la célula tumoral un mayor poder metastatizante. Estudios *in vitro* muestran como la transfección de cadenas de integrina α_2 en células de rhabdomyosarcoma o/y la expresión en líneas celulares de melanoma o α_3 V (receptor de la vitronectina) les confieren un fenotipo metastatizante (7). También la interacción con moléculas endoteliales, tipo integrinas y selectinas, mediada por glicoproteínas, oligosacáridos o mucinas tumorales o bien por otras moléculas de adhesión que expresa la célula neoplásica, permite el anclaje de la célula tumoral neoplásica al endotelio así como la activación de la expresión de otras moléculas que van a consolidar dicha adhesión. Otras moléculas como PECAM-1 indican a la célula tumoral la uniones interendoteliales para la trans migración. Todo ello bajo una permisividad inmunológica, en la que probablemente la fracción soluble de algunas moléculas de adhesión actúen como factores bloqueantes séricos de dicha respuesta inmune (8).

CARCINOMAS DIGESTIVOS

Cambios en la expresión y función de estas moléculas de adhesión son importantes en el desarrollo de neo-

plasias gastrointestinales. Así en el cáncer esofágico se ha encontrado como una pérdida en la expresión de E-cadherina y la proteína citosólica catenina-alfa se asocia con una desdiferenciación, un crecimiento infiltrativo, y una mayor afectación de metástasis ganglionares (9,10). En cáncer gástrico la menor expresión de E-cadherina debido a la síntesis de proteínas estructuralmente anómalas secundario a mutaciones presentes con mayor frecuencia en tumores gástricos infiltrativos de tipo difuso (11). La expresión de CD44 estándar y la isoforma CD44-9v en la superficie de tumores gástricos está directamente relacionada con un peor pronóstico. La isoforma CD44-6v la encontramos principalmente expresada en tumores gástricos de extirpe intestinal adquiriendo sus células la capacidad de metastatizar en los ganglios linfáticos (12,13). En cáncer pancreático la expresión de integrinas está significativamente alterada (14). Durante la transformación maligna, de igual modo a como ocurre en otras neoplasias, la pérdida de expresión de E-cadherinas y el aumento de expresión de CD44 se asocia a desdiferenciación e invasividad (15). Existen evidencias de que el incremento de expresión de integrinas y CD44 acontecen los procesos de transformación maligna de la mucosa colónica a pólipos adenomatosos y a carcinomas invasivos así como en la diseminación. La expresión de la isoforma de CD446v del receptor para la laminina se correlaciona con un peor pronóstico y un fenotipo metastásico (16-18). El estudio de la E-cadherina ha mostrado ser un marcador pronóstico independiente del estadio tumoral en cáncer colorrectal identificando aquellos de peor pronóstico (12). También se han encontrado alteraciones en los niveles séricos de dichas moléculas de adhesión, destacar la elevación de ICAM-1 en suero de pacientes portadores de una neoplasia colorrectal y su relación con el estadio, Sánchez-Rovira estudia *in vitro* este ICAM-I sérico encontrando que tiene capacidad de inhibir la agregación celular planteando la hipótesis de que la producción de ICAM-1 por parte de la célula tumoral sea un mecanismo de escape al reconocimiento inmune (8). Se ha detectado niveles séricos elevados de otras moléculas, así como correlación con el estadio, grado de diferenciación e intervalo libre de enfermedad (19,20).

CARCINOMA DE MAMA

Para el carcinoma de mama no se ha demostrado tanta importancia biológica de las moléculas de adhesión como en otras neoplasias, y probablemente esto sea debido a la influencia que otras proteínas tumorales ejercen en el crecimiento y diseminación. Así en contra de lo que para otros tumores parece, la expresión de CD44 o algunas de sus isoformas no se correlaciona con el pronóstico ni el potencial metastásico (21-23). Sí se ha visto que algunas líneas celulares y tumores de carcinoma de mama expresan moléculas glicosidadas tipo mucina o tipo sialyl-Lewis^x que son ligandos para moléculas de adhesión del grupo de las selectinas y de la superfamilia de las inmunoglobulinas interviniendo en mecanismos de adhesión al endotelio o reconocimiento

antigénico (24,25). También se ha observado que un 50% de los tumores de mama expresan ICAM-1, y que dicha expresión se correlaciona con un pronóstico más favorable (26).

Se ha utilizado marcaje de moléculas de adhesión fundamentales en angiogénesis, como PECAM-1, para estudio de angiogénesis intratumoral y correlacionarlo con el pronóstico (27).

CARCINOMA DE PULMÓN

El carcinoma de pulmón representa un grupo heterogéneo de tumores con grandes variaciones en cuanto a características bioquímicas, morfológicas y clínicas. Considerado a parte el origen neuroendocrino del carcinoma microcítico de pulmón, hoy día se considera origen para el resto de los tumores pulmonares, el epitelio endodérmico bronquial. NCAM (*neural cell adhesion molecule*) se considera un marcador sensible para el carcinoma de pulmón de células pequeñas y algunos no microcíticos. La presencia de la unidad alfa, característica del NCAM embrionario en el carcinoma microcítico y una porción de los no microcíticos se correlaciona con el comportamiento maligno y el pronóstico (28). No se ha encontrado una buena correlación entre la pérdida de expresión de E-cadherina y un peor pronóstico (10), sí se ha descrito recientemente una disminución en la expresión de membrana de proteínas de las *Gap Junction* y de las cadherinas en tumores mal diferenciados (29). Se ha estudiado la expresión tumoral de ICAM-1 y antígenos de histocompatibilidad clase I y II encontrándose al igual que ocurre en el cáncer de mama, que la ausencia de expresión de éstos se correlaciona con un peor pronóstico (30). Esto sugiere que dichas moléculas intervienen en el reconocimiento inmune. La presencia de niveles de ICAM-I elevados en suero pacientes en estadios avanzados (31) pueden ser reflejo de un sistema inmune hiperactivado y al mismo tiempo un mecanismo de escape tumoral, mediante el bloqueo de sus ligandos LFA-1 sobre las células de la respuesta inmune celular (8).

CARCINOMA GENITOURINARIO

Teniendo en cuenta que la mayoría de los carcinomas de vejiga se diagnostican en estadios de crecimiento papilar no invasivos, el principal interés en el estudio de las moléculas de adhesión ha ido encaminado a la detección de los subtipos que con mayor frecuencia van a recaer y hacer invasivos. A este respecto el estudio de la E-cadherinas ha aportado conclusiones interesantes. Así se ha visto una disminución en la expresión de E-cadherina en tumores que infiltran la muscular y en aquellos no infiltrantes con alta frecuencia de recidiva (32). Además se ha encontrado una relación inversa entre esta molécula y la expresión del receptor del factor de motilidad (gp78) (33). Estudios en líneas celulares de carcinoma de vejiga han mostrado que se puede inducir la expresión de E-cadherina con hormonas esteroideas

como andrógenos y estrógenos (34). También se ha determinado la fracción soluble de E-cadherina en suero y en orina. Parece que los pacientes con carcinoma de vejiga tienen elevados dichos niveles. Aún falta conocer su valor clínico (35,36). Se ha correlacionado un aumento en la expresión de CD44 con un mayor potencial metastatizante (37). También se ha encontrado expresión de ICAM-1 en algunos carcinomas de células transicionales y además se ha visto como se puede inducir la expresión de esta molécula, con interferón y BCG, utilizados habitualmente como tratamiento inmunoterápico intravesical. Esto, de nuevo indica el papel que ICAM-1 puede tener en el reconocimiento antigénico tumoral. En el carcinoma prostático, hay un descenso en la expresión de E-cadherinas (38) y/o un aumento en la expresión de CD44 (39) y esto se correlaciona con un peor pronóstico. No se ha visto relación entre los niveles séricos de moléculas de adhesión y parámetros clínicos como estadio, respuesta al tratamiento o recurrencia (40). La proporción de carcinomas renales que expresan E-cadherinas es más baja que en otros tumores, por lo que el valor de la pérdida de expresión es menor, a pesar de ello también se ha encontrado una relación con la capacidad infiltrante (41). Se observa sobreexpresión en una alta proporción de tumores, de ICAM-1 así como aumento en de sus niveles séricos en pacientes con carcinoma renal metastásico, se desconoce que significado clínico tiene (42). Se ha visto que el carcinoma renal expresa integrinas $\alpha_1\beta_4$ (VLA-4) cuyo ligando fisiológico es VCAM-1 (expresado en el endotelio) esta expresión se correlaciona con el desarrollo de metástasis por vía hematogénea (43).

MELANOMA

De los estudios realizados en melanomas sobre la expresión de moléculas de adhesión hemos aprendido, además de sus posibles implicaciones clínicas el que multitud de citocinas importantes en la respuesta inmune, van a modular la expresión tumoral de dichas moléculas. Así se ha puesto de manifiesto en ensayos *in vitro* y en tratamiento de pacientes que ILE-1, ILE-2, TNF o interferón modifican los niveles séricos y de expresión de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (44). Y, además, como esta respuesta inmune antitumoral está directamente relacionada con la expresión por parte de melanocito, de moléculas de adhesión, ICAM-1, VCAM-1, HMC clase I (45,46). Al igual que en los casos anteriores la expresión de algunas moléculas de adhesión como integrinas $\alpha_v\beta_3$ e ICAM-1, confieren un mayor potencial metastático al melanoma (7).

En los tumores restantes los escasos estudios realiza-

dos muestran como también en éstos pueden tener alguna función las moléculas de adhesión. Así se ha visto como aumentan de manera significativa los niveles séricos de ICAM-1 en el carcinoma de cabeza y cuello y como éstos se correlacionan con el estadio (47). Algunos sarcomas también expresan en su membrana estas proteínas, como el sarcoma de Kaposi rhabdomyosarcoma o neuroblastoma (48,49).

ANGIOGÉNESIS

Otro proceso fundamental en el desarrollo de metástasis es el que intervienen las moléculas de adhesión en la formación de nuevos vasos. La célula endotelial en condiciones fisiológicas normales expresa en sus uniones interendoteliales moléculas entre las que destacan las cadherinas encargadas de dar al endotelio cohesividad y PECAM-1 (CD31) fundamental en los procesos de formación de nuevos vasos (50). De manera particular se ha observado en el endotelio tumoral expresión de integrinas $\alpha_v\beta_3$ y como esta expresión es inducida por TNF alfa y bFGF (*fibroblastic growth factor beta*) y como además cuando bloqueamos estas integrinas con anticuerpos se induce apoptosis (51).

En la revisión de lo que se conoce acerca de las moléculas de adhesión en los diferentes tumores, encontramos que algunas moléculas de adhesión desempeñan funciones similares en las diferentes neoplasias revisadas. Esto ha puesto en marcha líneas de investigación con el objetivo de desarrollar nuevos tratamientos dirigidos hacia estas moléculas, regulando su expresión o bloqueando su función.

Así con el objetivo de aumentar la cohesividad tumoral y evitar el escape tumoral se han buscado estimuladores de la síntesis y expresión de cadherinas entre los encontrados, aún en fase experimental, destacan los trabajos realizados con ácido gamma linoleico (52), el ácido retinoico (53) o los estrógenos y andrógenos (34). Se han encontrado multitud de estímulos para ICAM-1 con el objetivo de hacer a la célula tumoral más antigénica, así aumenta la expresión de ICAM-1 con citocinas como ILE1 (54), ILE-2 (55.), INF (56), con sustancias antigénicas como la BCG, inmunoterapia eficaz en el carcinoma de vejiga (57) o bien con inductores de la diferenciación celular como el ácido retinoico (58). También se están utilizando como diana en el desarrollo de anticuerpos monoclonales y vacunas antitumorales (25).

Todo este desarrollo, no cabe duda que en los próximos años aportará una vía eficaz, completamente diferente a las actuales, en el tratamiento y prevención de la enfermedad tumoral y sus metástasis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Picker LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol* 1994;6:394-406.
2. Hynes RO. Integrins: versatility modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69: 25.
3. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrins VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60:577-584.
4. Nakagawa K, Sogo S, Hioki K, Tokunaga R, Taketani S. Acquisition of cell adhesion and induction of focal adhesion kinase of human colon cancer Colo 201 cells by retinoic acid-induced dif-

- ferentiation. *Differentiation* 1998;62
5. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White G. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 1990;247:1219-1223.
 6. Takeichi M. Catherins in cancer. *Curr. Opin. Cell. Biol* 1993;5:806-811.
 7. Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, et al. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 1997;57
 8. Sánchez-Rovira P, Jimenez E, Carracedo J, Barneto IC, Ramirez R, Aranda E. Serum levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in patients with colorectal cancer: inhibitory effect on cytotoxicity. *Eur J Cancer* 1998;34
 9. Tamura S, Shiozaki H, Kadowaki T, et al. [Histopathological and immunohistochemical evaluation of lymph node metastasis in superficial esophageal cancer—with reference to the expression of E-cadherin and alpha-catenin]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1995;96
 10. Bongiorno PF, al-Kasspoles M, Lee SW, et al. E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and in Barrett's oesophagus. *Br J Cancer* 1995;71
 11. Yonemura Y, Ninomiya I, Kaji M, et al. Decreased E-cadherin expression correlates with poor survival in patients with gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 1995;8
 12. Streit M, Schmidt R, Hilgenfeld RU, Thiel E, Kreuser ED. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *Recent Results Cancer Res* 1996; 142
 13. Harn HJ, Ho LI, Chang JY, et al. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44V in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 1995;75
 14. Schwaew W, Kerlin M, Meyer zum Buschenfelde KH, Dipold W. De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in pancreas cancer. *Int J Cancer* 1993;53
 15. Takada M, Yamamoto M, Saitoh Y. The significance of CD44 in human pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 1994;9
 16. Wimmenauer S, Keller H, Ruckauer KD, et al. Expression of CD44, ICAM-1 and N-CAM in colorectal cancer. Correlation with the tumor stage and the phenotypical characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Res* 1997;17
 17. Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD7 Reeder JA7 Simmons DL7 Antalis TM. Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1996;74
 18. Coppola D7 Hyacinthe M7 Fu L7 et al. CD44V6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 1998;29
 19. Velikova G7 Banks RE7 Gearing A7 et al. Circulating soluble adhesion molecules E-cadherin7 E-selectin7 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 1997;76
 20. Velikova G7 Banks RE7 Gearing A7 et al. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77
 21. Lyzak JS7 Yaremko ML7 Recant W7 Baunoch DA, Joseph L. Role of CD44 in nonpalpable T1a and T1b breast cancer. *Hum Pathol* 1997;28
 22. Hefler L7 Tempfer C7 Haeusler G7 et al. Cytosol concentrations of CD44 isoforms in breast cancer tissue. *Int J Cancer* 1998;79
 23. Jansen RH7 Joosten-Achjanie SR7 Arends JW7 et al. CD44v6 is not a prognostic factor in primary breast cancer. *Ann Oncol* 1998;9
 24. Brooks SA7 Leatham AJ. Expression of the CD15 antigen (Lewis x) in breast cancer. *Histochem J* 1995;27
 25. Regimbald LH7 Pilarski LM7 Longenecker BM7 Reddish MA7 Zimmermann G7 Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res* 1996;56
 26. Ogawa Y7 Hirakawa K7 Nakata B7 et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential7 negative lymph node involvement7 and good prognosis. *Clin Cancer Res* 1998;4
 27. Fox SB7 Turner GD7 Leek RD7 Whitehouse RM7 Gatter KC7 Harris AL. The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36
 28. Michalides R7 Kwa B7 Springall D7 et al. NCAM and lung cancer. *Int J Cancer Suppl* 1994;8
 29. Jinn Y7 Ichioka M7 Marumo F. Expression of connexin32 and connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung cancer. *Cancer Lett* 1998;127
 30. Passlick B7 Pantel K7 Kubuschok B7 et al. Expression of MHC molecules and ICAM-1 on nonsmall cell lung carcinomas: association with early lymphatic spread of tumour cells. *Eur J Cancer* 1996;32A
 31. Osaki T7 Mitsudomi T7 Yoshida Y, et al. Increased levels of serum intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in patients with non-small cell lung cancer. *Surg Oncol* 1996;5
 32. Lipponen PK7 Eskelinen MJ. Reduced expression of E-cadherin is related to invasive disease and frequent recurrence in bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995;121
 33. Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, et al. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 1994;54
 34. Carruba G, Miceli D, D'Amico D, et al. Sex steroids up-regulate E-cadherin expression in hormone-responsive LNCaP human prostate cancer cells [published erratum appears in *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Sep 25;214(3):1269]. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212
 35. Griffiths TR, Brothrick I, Bishop RI, et al. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer* 1996;74
 36. Banks RE, Porter WH, Whelan P, Smith PH, Selby PJ. Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine. *J Clin Pathol* 1995;48
 37. Naot D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71
 38. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, et al. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1994;54
 39. Nagabhushan M, Pretlow TG, Guo YJ, Amini SB, Pretlow TP, Sy MS. Altered expression of CD44 in human prostate cancer during progression. *Am J Clin Pathol* 1996;106
 40. Lynch DF Jr, Hassen W, Clements MA, Schellhammer PF, Wright GL Jr. Serum levels of endothelial and neural cell adhesion molecules in prostate cancer. *Prostate* 1997;32
 41. Katagiri A, Watanabe R, Tomita Y. E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br J Cancer* 1995;71
 42. Santarosa M, Favaro D, Quaiá M, et al. Expression and release of intercellular adhesion molecule-1 in renal-cancer patients. *Int J Cancer* 1995;62
 43. Tomita Y, Saito T, Saito K, Oite T, Shimizu F, Sato S. Possible significance of VLA-4 (alpha 4 beta 1) for hematogenous metastasis of renal-cell cancer. *Int J Cancer* 1995;60
 44. Fortis C, Galli L, Consogno G, et al. Serum levels of soluble cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) and of cytokine TNF-alpha increase during interleukin-2 therapy. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76
 45. Fogler WE, Volker K, McCormick KL, Watanabe M, Ortaldo IR, Wiltrout RH. NK cell infiltration into lung, liver, and subcutaneous B16 melanoma is mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction. *J Immunol* 1996;156
 46. Cao X, Chen G, He L, Zhang W, Yu Y, Wang J. Involvement of MHC class I molecule and ICAM-1 in the enhancement of adhesion and cytotoxic susceptibility to immune effector cells of tumor cells transfected with the interleukin (IL)-2, IL-4 or IL-6 gene. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;123
 47. Wollenberg B, Jan N, Sautier W, Hofmann K, Schmitt UM, Stieber P. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Tumour Biol* 1997; 18
 48. Yang J, Xu Y, Zhu C, Hagan MK, Lawley T, Offermann MK. Regulation of adhesion molecule expression in Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol* 1994;152
 49. Phimister EG, Culverwell A, Patel K, Kemshead JT. Tissue-spe-

- cific expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) may allow differential diagnosis of neuroblastoma from embryonal rhabdomyosarcoma. *Eur J Cancer* 1994;30A
50. Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin Padura I, Navarro P. Functional properties of human vascular endothelial cadherin(7B4/cadherin-5) and endothelium specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1229-1239.
 51. Brooks P. Requirements for vascular integrin α v β 3 for angiogenesis. *Science* 1994;264:569-575.
 52. Jiang WG, Hiscox S, Hallett MB, Horrobin DF, Mansel RE, Puntis MC. Regulation of the expression of E-cadherin on human cancer cells by gamma-linolenic acid (GLA). *Cancer Res* 1995;55
 53. Anzano MA, Byers SW, Smith JM, et al. Prevention of breast cancer in the rat with 9-cisretinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. *Cancer Res* 1994;54
 54. Chirivi RG, Chiodoni C, Musiani P, et al. IL-1 α gene-transfected human melanoma cells increase tumor-cell adhesion to endothelial cells and their retention in the lung of nude mice. *Int J Cancer* 1996;67
 55. Hermann GG, Geertsens PF, von der Maase H, et al. Recombinant interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell treatment of advanced bladder cancer: clinical results and immunological effects. *Cancer Res* 1992;52
 56. Ogawa M, Yu WG, Umehara K, et al. Multiple roles of interferon-gamma in the mediation of interleukin 12-induced tumor regression. *Cancer Res* 1998;58
 57. Jackson AM, Alexandrov AB, Gribben SC, Esuvarnathan K, James K. Expression and shedding of ICAM-1 in bladder cancer and its immunotherapy. *Int J Cancer* 1993;55
 58. Bouillon M, Audette M. Retinoic acid-stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression on SK-N-SH cells: calcium/calmodulin-dependent pathway. *Cancer Res* 1994;54