

Mecanismo de activación celular en células normales y transformadas por oncogenes

J. C. Lacal

Descubrimiento del primer oncogén humano

El primer agente biológico capaz de producir tumores en animales se aisló en los años 1910-1911 por Peyton Rous a partir de un sarcoma de pollo. El retrovirus aislado, identificado décadas después, se denominó Rous Sarcoma Virus en su honor. Durante los años 60 y 70 se aislaron una gran variedad de retrovirus a partir de diferentes tumores (sarcomas, linfomas, leucemias, etc.) en diversas especies. Hoy en día se conocen medio centenar de oncogenes virales diferentes, sobre los que se ha intensificado notablemente la investigación a nivel bioquímico con la esperanza de po-

El crecimiento de células normales se regula mediante señales codificadas en factores solubles. Estas señales activan receptores específicos localizados en las membranas de las células efectoras, que ponen en marcha una compleja red de interacciones entre quinasas citoplásmicas que regulan a los denominados factores de transcripción. En los últimos años, ha quedado de manifiesto que la transformación celular, base de la generación de tumores, se produce por una alteración de los mecanismos de señales intracelulares activados tras la estimulación mitogénica. Si bien el concepto de que el cáncer se desarrolla como consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas quedó establecido hace décadas, descubrimientos recientes han puesto de manifiesto que estas alteraciones genéticas se producen en genes celulares normales que adquieren el potencial de transformación mediante modificaciones en su estructura o en la regulación de su expresión que se traduce en alteraciones en la función de la proteína por la que codifican. Así, se han identificado genes que se activan de forma constitutiva tras una alteración genética, y genes que son necesarios para la regulación del crecimiento celular normal y cuya pérdida conlleva también a la transformación. Por último, mutaciones en los genes que son responsables de llevar a cabo la reparación de alteraciones genéticas, o genes «reparadores» y aquellos que regulan la decisión de inducir la muerte celular programada, también son esenciales en la aparición de líneas celulares tumorales. Las nuevas estrategias de desarrollo de antitumorales se basan en los recientes descubrimientos sobre mecanismos de transformación a nivel molecular.

der dilucidar con precisión su mecanismo de acción.

A pesar de una intensa búsqueda, durante años no se consiguió aislar ningún retrovirus responsable de la formación de tumores en humanos. De hecho, tan sólo se han conseguido identificar hasta la fecha tres retrovirus de origen humano, pero su relación con la formación de tumores es accidental. La falta de identificación de un retrovirus capaz de inducir tumores en humanos, conjuntamente con la evidencia de que en humanos se producen tumores con patologías similares a los producidos por retrovirus en animales experimentales, impulsó la investigación de rutas alter-

Fecha de recepción: Marzo 1995

Palabras clave: Oncogenes. Genes supresores. Señales celulares

nativas a la virología. Si el origen del cáncer en el hombre no se podía atribuir a los retrovirus, deberían existir genes con capacidad de transmitir el fenotipo de transformación celular. Este razonamiento, aunque sencillo en su enunciado, confluía espectacular y sorprendentemente con la identificación de los oncogenes retrovirales al aislarse el primer oncogén humano a partir de un carcinoma de vejiga y verificarse que correspondían al homólogo de un oncogén retroviral descrito anteriormente en rata.

Las bases sobre las que se estableció esta nueva ruta de investigación sobre el origen del cáncer, radicaban en el desarrollo de la tecnología del cultivo de tejidos animales. Las células de un organismo pueden separarse y crecer en sistemas *in vitro* bajo condiciones estrictas pero que son fácilmente manejables y reproducibles. Estas células tienen a veces las características de células normales y mueren en un tiempo corto, pudiéndose cultivar en el laboratorio sólo durante unas 30-50 generaciones. Pero otras líneas celulares, extraídas a partir de tumores naturales o transformadas *in vitro* por tratamientos químicos o por infección con determinados virus, presentan una morfología alterada, crecen indefinidamente y son capaces de inducir tumores cuando se inyectan en animales en condiciones adecuadas.

Con la posibilidad de cultivar células en laboratorio y la mejora de las técnicas de manejo del ADN, se consiguió aislar genes capaces de inducir tumores en humanos. La aproximación empleada para el aislamiento de estos genes humanos consistió en utilizar las características de las células que se cultivaban *in vitro*. La hipótesis de trabajo se basaba en los estudios pioneros de Avery, MacLeod y McCarty en los años 40, en los que consiguieron transferir las características fenotípicas entre dos cepas de *Staphylococcus*, mediante la transferencia de parte de su material genético. La idea era sencilla conceptualmente: si se aislaba DNA (es decir, el material genético) a partir de células transformadas que crecían indefinidamente *in vitro* y eran capaces de inducir tumores en animales experimentales, y se introducía en célu-

las normales (incapaces de producir tumores) se podría transferir la capacidad tumoral a las células receptoras. El postulado teórico fue correcto y se consiguió transferir el fenotipo de transformación a células no tumorales. Los genes responsables de la transformación celular *in vitro* se denominaron oncogenes, y aunque en un principio se pensó que podrían ser genes virales inmersos en el genoma celular, pronto se observó que correspondían a auténticos genes celulares. El siguiente paso fue la observación de que incluso DNAs aislados a partir de tumores humanos eran capaces de transmitir el fenotipo de transformación celular en cultivos. La presencia de oncogenes se observó en numerosos tipos de tumores incluyendo carcinomas, leucemias, linfomas, neuroblastomas y sarcomas.

El primer oncogén que se aisló mediante las técnicas descritas de transferencia del DNA de tumores a células en cultivo, se consiguió a partir de una línea celular, T-24, procedente de un carcinoma humano de vejiga. Utilizando como sonda el gen transformante, se consiguió, mediante técnicas de DNA recombinante, aislar el gen complementario en células normales, permitiéndose su estudio de forma comparativa con el gen transformante. Al secuenciar ambos genes, se observó que la única diferencia entre el gen normal y el activado era una simple sustitución en el codón número 12. De un triplete de codificación por Glicina (GGC) en el gen normal, se pasaba a un triplete de codificación por Valina (GTC) en el gen T-24 activado. Este sorprendente descubrimiento implicaba que la simple modificación de una base en la secuencia de la proteína codificada, era el responsable de la activación del oncogén humano T-24.

La siguiente gran sorpresa provino de la comparación de la secuencia de la proteína codificada por el oncogén T-24, con un banco de datos donde se almacenaban todas las secuencias de proteínas conocidas. Como se ha mencionado anteriormente, no se habían conseguido aislar retrovirus capaces de producir tumores en humanos. Sin embargo, la proteína codificada por el oncogén T-24 era práctica-

mente idéntica a la codificada por el gen aislado a partir de un retrovirus capaz de producir sarcomas en ratas.

El primer retrovirus portador del gen homólogo al oncogén T-24 había sido aislado con anterioridad por Harvey y se denominó Harvey Murine Sarcoma Virus (Ha-MSV). Es el virus productor de sarcomas en rata y al oncogén transformante se le había denominado como *ras* por *rat* sarcoma. De forma semejante al caso humano, el gen *ras* activado encontrado en el retrovirus Ha-MSV correspondía a una forma alterada del gen normal de rata, pero en este caso existían dos variaciones, una en el codón 12 y otra en el codón 59. Estudios posteriores demostraron la presencia de genes *ras* activados en numerosas muestras de DNA aisladas de tumores humanos y animales de diverso origen. La comparación de varios de estos genes aislados a partir de tumores humanos, junto con los genes normales y varios genes mutantes encontrados en retrovirus de rata y ratón, demostró que invariablemente existían alteraciones en los mismos residuos 12, 13, 59, 61 y 63.

Oncogenes y alteraciones citogenéticas

La investigación que llevó al descubrimiento del primer oncogén humano estaba precedida de una copiosa información sobre las alteraciones citogenéticas de diversas patologías, incluyendo determinados casos de cáncer, y en especial de tumores hereditarios. Estos datos se obtuvieron gracias a la investigación de historias familiares en individuos con predisposición a determinados tumores. Algunos tipos de patología se podían relacionar claramente con alteraciones cromosómicas, bien a nivel de translocaciones entre cromosomas, bien por pérdida de material genético.

En diversos laboratorios se intentó establecer una conexión entre las alteraciones conocidas a nivel cromosómico y las recientes alteraciones descubiertas con el aislamiento de los oncogenes humanos. Una vez aislados los genes únicos responsables de la transformación, se debían correlacionar éstos con las alteraciones cromosómicas observables por técnicas de

citogenética clásica. La posibilidad de localización de los diferentes oncogenes permitiría establecer una relación causa-efecto perfecta entre activación de un determinado oncogén, alteración cromosómica y enfermedad.

Estos estudios dieron pronto resultados muy positivos. Así en el caso de leucemias mielógenas crónicas (CML) aparece casi invariablemente (90%-95% de los casos) el denominado cromosoma Filadelfia como consecuencia de la translocación de una parte del cromosoma 9 al cromosoma 22. La coincidencia de que en gran cantidad de casos de CML apareciese el oncogén humano *abl*, incitó a la sospecha de que el gen *abl* estuviera involucrado en este tipo de enfermedad. Efectivamente, se observó esta relación cuando se mapeó el gen *abl* en el mismo locus del cromosoma 9 que se transloca en los pacientes con CML. El gen receptor correspondía a la región que contiene el gen *bcr* en el cromosoma 22, originándose un producto quimérico entre ambos genes *bcr-abl*, de consecuencias fatales. Por tanto, esta translocación cromosómica genera un nuevo producto que no se corresponde con el gen normal *abl* y, por tanto, su función es distinta al gen normal. Lo sorprendente de estos descubrimientos fue la existencia de esta alteración con alta incidencia en los casos de leucemia mielógena crónica (CML) generalmente con la translocación cromosómica en el mismo punto de fusión entre las mismas regiones del cromosoma 9 y del cromosoma 22. Estos estudios han servido de modelo de investigación para otros tipos de alteraciones a nivel molecular que conllevan la adquisición de la capacidad de transformación de un gen normal.

Regulación de la proliferación y diferenciación celular

Paralelamente al descubrimiento y aislamiento de los primeros oncogenes humanos, se consiguió un gran avance en la comprensión de los mecanismos que regulan la proliferación y la diferenciación de células normales. Se purificaron e identificaron numerosos factores de crecimiento y diferenciación (NGF, PDGF, FGF,

EGF, ILs, etc.), así como sus receptores específicos. Se demostró también que un gran número de estos receptores específicos para factores de crecimiento eran quinasas con la capacidad de fosforilar residuos de tirosina en proteínas intracelulares.

El hallazgo de que ciertos oncogenes correspondían, bien a factores de crecimiento ya conocidos (sís correspondía al PDGF) o a versiones modificadas de sus receptores (ErbB era el receptor truncado del EGF), permitió establecer el concepto de que la transformación oncogénica se debía a alteraciones de los mecanismos de señales mitogénicas de las células normales. La identificación de las proteínas Ras como GTPasas y de factores de transcripción con actividad transformante, además de oncogenes con actividad tirosina y serina/treonina quinasas dejó definitivamente establecido el concepto de actividad oncogénica y alteración de las rutas de señalización entre células. El esquema general que las células normales utilizan para la regulación de la proliferación se describe en la figura 1. Se pueden establecer cuatro niveles de regulación en el proceso, cuya función es transmitir la señal desde el exterior de la célula al núcleo. El primer nivel lo constituyen los factores de crecimiento. El segundo nivel corresponde a los receptores específicos para los factores de crecimiento, y que generalmente suelen manifestar tras la interacción con el factor una actividad de tirosina quinasa. El tercer nivel lo constituyen una gran variedad de enzimas reguladas directa o indirectamente por los receptores activados. Pueden ser enzimas generadoras de segundos mensajeros (adenilato ciclasa, fosfolipasas) o quinasas intracelulares con actividad serina/treonina quinasas o de especificidad dual (tirosina y serina/treonina). Por último, los factores de transcripción constituyen el cuarto y último nivel de transmisión de señales.

Tipos de activación de la capacidad oncogénica

La recopilación de numerosos estudios realizados desde el aislamiento del primer oncogén humano implica que la transformación celular

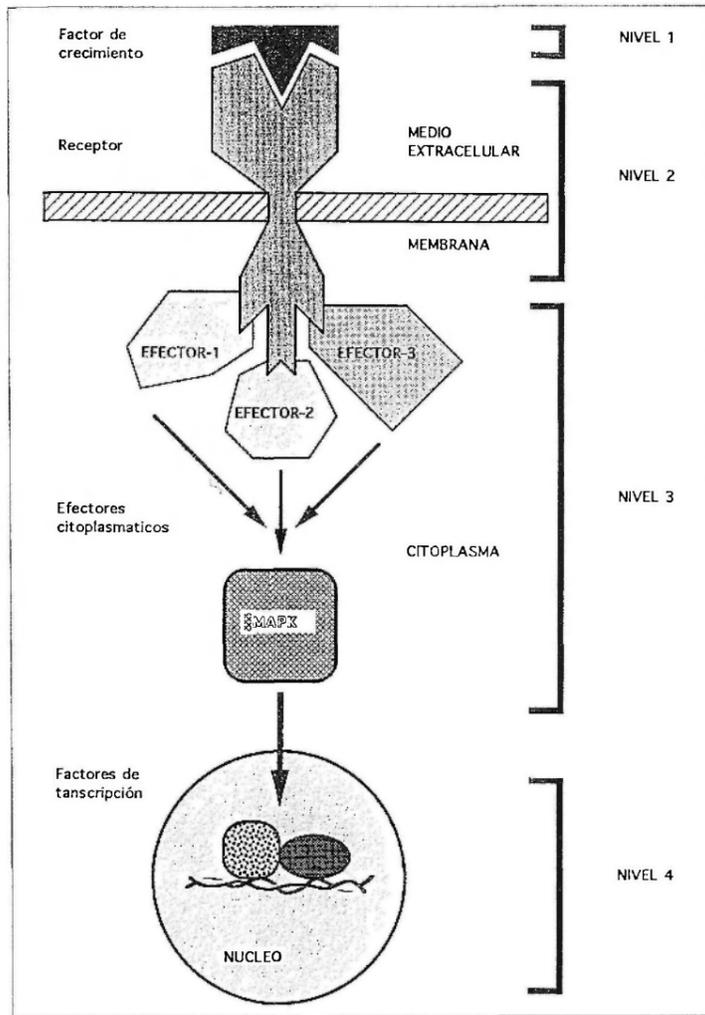
puede producirse siguiendo diferentes modelos. En líneas generales, el primer mecanismo de activación descubierto correspondía a una alteración puntual en el gen que codifica por un producto (proteína Ras) implicado en la regulación de la proliferación o diferenciación celular. Como ejemplos destacados están el gen *ras*, descrito anteriormente, y el gen *neu*, perteneciente a la familia del receptor para el factor epitelial (EGF) y que se activa mediante la sustitución de un solo residuo en la región transmembranal.

Un segundo mecanismo de activación oncogénica consiste en los reagrupamientos cromosómicos o translocaciones. El ejemplo mejor estudiado es el descrito en el caso de la CMLs con la translocación del gen Abelson (ABL) del cromosoma 9 al 22. Otro ejemplo muy estudiado es el linfoma de Burkitt, en el cual se produce una translocación del gen *myc* al cromosoma 14.

Una tercera vía de activación de la capacidad de transformación de un gen consiste en su sobreexpresión. Un gen normal sufre la pérdida de la regulación de su expresión, produciéndose cantidades anormales de su producto. El mismo resultado de sobreexpresión se puede producir mediante mecanismos alternativos como, por ejemplo, amplificación génica como en el caso de neuroblastomas o carcinoma de pulmón, en los cuales se produce una amplificación del gen *myc*, o el caso del carcinoma de mama en que aparece una amplificación del gen *erb-B*. Existen también mecanismos alternativos como la introducción de un «enhancer» cercano al gen, o mediante la inserción de promotores retrovirales que aumentan su transcripción.

La mutación de genes con función supresora puede llevar también a la transformación celular. En este caso, el gen mutado tiene una función reguladora negativa, sobre el crecimiento celular y se denominan genes supresores. Los casos mejor estudiados son el del retinoblastoma (Rb) y el gen que codifica para la proteína p53. En estos casos se produce la inactivación de una función normal que se encarga de reprimir la proliferación. Estudios recientes han

Figura 1.



UNIVERSIDAD
DE
MÉXICO

desvelado que la maquinaria de regulación de la actividad de p53 y Rb es muy compleja, e involucra a un conjunto de quinasas específicas, que sólo se activan cuando están unidas a las denominadas ciclinas (proteínas que se sintetizan y degradan en fases muy concretas del ciclo celular). Los complejos de ciclina-quinasa están regulados a su vez por proteínas inhibidoras que tan sólo se sintetizan en respuesta a la fosforilación de p53 y Rb.

En los últimos años, ha quedado de manifiesto la importancia que tienen los enzimas encargados de reparar el daño producido en el material genético, papel en el que los genes supresores como el p53 juegan también una importante función. En condiciones normales, los efectos de las radiaciones y agentes químicos sobre la estructura del ADN se corrigen mediante un proceso consistente en detener el crecimiento (papel del p53, entre otros genes) que permite la reparación de las mutaciones producidas por un complejo en el que intervienen al menos tres proteínas distintas. Caso de detectarse algún problema que imposibilite la reparación, la célula es conducida a un proceso denominado muerte celular programada o apoptosis.

A alteraciones en la capacidad de los genes reparadores para llevar a cabo su función de forma eficiente, producen la acumulación de mutaciones que desembocan en la aparición de células transformadas con alta probabilidad. La acumulación de mutaciones se produce de forma aleatoria, con la aparición de líneas celulares tumorogénicas sólo en el caso de producirse mutaciones en oncogenes y genes supresores.

Teoría del origen multi-causa del cáncer

La aparición de un tumor en un organismo no es un evento frecuente, a pesar de la gran cantidad de alteraciones que se producen en un organismo a lo largo de su vida. Este fenómeno no es un suceso único que se produce en un momento determinado, disparando un complejo entramado de reacciones, entre las que se incluye el escape al control vigilante del sistema inmune. Por el contrario, la formación de

un tumor es un proceso muy complejo, en el cual existen al menos entre 4 ó 5 alteraciones del material genético (mutaciones puntuales, alteraciones cromosómicas) y que son necesarias para producir la capacidad total de transformación. Los estudios más recientes demuestran la existencia de los genes denominados «mutadores», o más propiamente genes «reparadores», responsables de reparar las mutaciones espontáneas. La alteración de estos genes produce la acumulación al azar de mutaciones en el genoma que conllevan a la adecuada combinación de las alteraciones necesarias para disparar el proceso tumoral. Los estudios tradicionales demuestran que durante este proceso se pueden diferenciar dos etapas.

La primera de estas etapas se denomina fase de iniciación o de competencia, tras la cual, la célula alterada entra en disposición de convertirse en cancerosa, aunque conservando sus propiedades de célula normal. Por paralelismo, existen factores que pueden mimetizar esta función, dentro del proceso de regulación de la proliferación celular normal. Dentro de este apartado se encuentra el PDGF, y algunas interleuquinas, considerados como factores de iniciación o competencia. El segundo paso para producir el fenómeno de la transformación o en condiciones normales de regulación de un proceso de proliferación o de diferenciación se llama progresión. Análogamente a lo que ocurre con la iniciación, se conocen factores de crecimiento capaces de llevar a cabo esta función en condiciones normales, tales como el IGF-1 (factor de crecimiento análogo a la insulina). Dentro de la célula, la transmisión de la información se produce mediante las rutas de fosforilaciones en residuos de tirosina o serina/treonina en proteínas específicas, o mediante el concurso de las denominadas GTPasas. En los últimos años se ha conseguido un gran avance en relación al mecanismo de fosforilación mediado por receptores, la identificación de sustratos específicos, el modo de acción de las GTPasas y la activación de quinasas intracelulares y factores de transcripción. Actualmente se acepta que existen rutas alternativas para la regulación de la expresión de

genes específicos, responsables de la respuesta celular. El estudio de estas rutas alternativas de transmisión de señales ha llevado al desarrollo del concepto de genes de complementación. Como se indicó anteriormente, la clasificación de los oncogenes conocidos en diferentes familias se realiza en base a la actividad conocida o supuesta de sus productos génicos. Así, en función de su actividad, unos son quinasas, otros son proteínas G, otros son factores de transcripción, otros son receptores para factores de crecimiento y otros constituyen factores de crecimiento en sí.

Se diseñaron experimentos para estudiar qué genes dentro de todas estas familias de grupos funcionales eran capaces de producir la transformación por sí solos. Se vio que no eran capaces de inducir la transformación completa de forma individual. Sin embargo, en presencia de oncogenes activados pertenecientes a familias distintas, actuaban de forma complementaria y eran capaces de inducir la transformación de cultivos primarios. El primer grupo de genes complementarios serían aquellos que son capaces de transferir la capacidad de inmortalidad a las células. Una célula normal en cultivo muere en un corto tiempo, al cabo de unas 30 ó 50 generaciones. Sin embargo, cuando se introducen oncogenes de este grupo, las células recipientes son capaces de crecer indefinidamente. Se engloban en este apartado genes como *myc*, *large T antigen (LT)*, *E1A*, etc. A pesar de su capacidad de crecimiento indefinido, estas líneas celulares no son capaces de producir tumores en animales experimentales. Para este segundo paso de adquisición del potencial de transformación, se necesita el concurso de otro oncogén, capaz de conferirle independencia de crecimiento sobre un sustrato definido y de inducir tumores en animales. Representantes de este grupo son los genes *ras*, *src*, *middle T antigen (mT)*, etc. Por tanto, es importante señalar que a pesar del descubrimiento de los oncogenes, no hemos podido eludir la complejidad del estudio de la transformación celular.

Clasificación de genes del cáncer

El cáncer es una enfermedad genética, moti-

vada por la acumulación de varias alteraciones en genes complementarios. Hoy se pueden clasificar a los genes del cáncer en cuatro grupos:

1. **Oncogenes:** Genes cuya mutación genera una proteína con una función permanentemente activada. Fundamentalmente constituyen los diferentes componentes estructurales de la cascada de transmisión de señales mitogénicas.
2. **Genes supresores:** Genes que regulan negativamente el crecimiento y que tras la alteración se pierde completamente su actividad.
3. **Genes «interruptores»:** Son los encargados de desconectar la estimulación, una vez se ha activado la cascada de señales mitogénicas.
4. **Genes «reparadores» o «mutadores»:** Son los responsables de la reparación del daño genético en condiciones normales y su alteración favorece la acumulación de mutaciones al azar en todo el genoma.

Oncogenes

1. Factores de crecimiento

Desde el aislamiento del primer oncogén humano se ha invertido un considerable esfuerzo en intentar dilucidar la función normal de los productos codificados por estos genes con capacidad de transformación. La información obtenida ha puesto de manifiesto que los protooncogenes juegan un papel importante en la regulación de diversas etapas de la proliferación y la diferenciación celular. Se ha podido comprobar que prácticamente todos los sistemas conocidos de regulación de actividades celulares son sensibles a la acción de los productos oncogénicos. Sin embargo, a pesar de la variabilidad de sus funciones, se ha reunido suficiente información como para agrupar la mayor parte de los oncogenes conocidos en familias que representan diferentes niveles de la secuencia de transmisión de señales en una célula y que abarcan los cuatro niveles de regulación contenidos en la figura 1.

La cadena de sucesos conectada a la transmisión de señales al interior celular está mediada en primer lugar por un factor de crecimiento (figura 2). Existen oncogenes que son copias

exactas o bien ligeramente alteradas de factores de crecimiento. Su mecanismo de activación consiste en la expresión no regulada, induciendo la proliferación celular de forma incontrolada. El oncogén más representativo es *sis*, equivalente al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), aunque también se han encontrado miembros de la familia de FGF con actividad transformante.

2. *Receptores para factores de crecimiento*

El segundo paso en la transmisión de señales es generalmente la interacción del factor con un receptor celular. Para cada factor de crecimiento existe un receptor específico, de manera que mediante la interacción del factor con receptores específicos en la célula electora, se pueden producir respuestas encaminadas a inducir la proliferación o la diferenciación celular. Existen oncogenes que codifican para quinasas capaces de fosforilar residuos de tirosina, asociados a la membrana citoplasmática y cuyos productos corresponden a versiones alteradas de receptores para factores de crecimiento y hormonas. El ejemplo más representativo es el del oncogén *crb-B*, forma truncada del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Es también el caso del oncogén *fms*, receptor para el factor estimulador de la formación de colonias en granulocitos, conocido como G-CSF. Por último, es relevante el descubrimiento del potencial oncogénico del gen *mas*, receptor de péptidos adrenérgicos, ejemplo de una segunda familia de receptores conectados a GTPasas intracelulares para la transmisión de la señal.

3. *Cascada intracelular*

La señal recibida por el receptor del factor de crecimiento, hormona o citoquina es transmitida generalmente a otras proteínas celulares fundamentalmente mediante tres mecanismos alternativos. El primero de estos mecanismos depende de la interacción entre el receptor activado y proteínas citosólicas a través de regiones denominadas SH2 (reconocen residuos de

tirosina-fosfato) y regiones SH3 (regulan la interacción proteína-proteína). Este mecanismo induce la activación de una cascada de proteínas quinasas específicas para residuos de serina/treonina o de doble especificidad (fosforilan al mismo tiempo residuos de tirosina y de serina/treonina) y cuya estructura no se corresponden con la de receptores de factores de crecimiento. Este grupo de proteínas involucradas en la transmisión de señales mitogénicas incluye la protooncogén *raf*, y depende de la función de la proteína p21-*ras* para su activación. Durante los últimos años, se ha conseguido establecer que el mecanismo por el cual se produce la activación de las proteínas Ras por los receptores activados depende de moléculas adaptadoras (Crb2, Shc) y de factores de intercambio (Sos, GRF) que se activan por interacción a través de regiones SH2 y regiones SH3. También se ha dilucidado el mecanismo de activación de la cascada de quinasas intracelulares Raf/MEK/MAPK a partir de las proteínas Ras. Una vez activada la quinasa MAPK, ésta fosforila y activa a determinados factores de transcripción. Constituye este sistema un ejemplo lineal de señalización desde el exterior celular al núcleo. Este sistema lo utilizan la mayoría de factores mitogénicos peptídicos (insulina, PDGF, FGF, EGF, etc.).

El segundo mecanismo alternativo de transmisión de la señal al interior celular a través de receptores, consiste en la regulación de la actividad de las GTPasas heterotrimericas, grupo al cual pertenecen las proteínas G_s y G_i y la G_{p13} , todas ellas con capacidad transformante. La regulación de las GTPasas heterotrimericas se realiza por interacción directa Receptor-GTPasa. Este sistema lo utilizan los receptores que regulan las adenilato ciclasas y las fosfolipasas, fundamentalmente. Recientemente se ha puesto de manifiesto que también pueden activar la ruta dependiente de las proteínas Ras, aunque su mecanismo preciso todavía es incierto.

Por último, y dentro del grupo de enzimas citoplasmáticas, los receptores de interleuquinas están asociados a quinasas intracelulares tinea-

rautes, cuyo mejor representante es la familia *src*, que tras su activación conectan rutas intracelulares semejantes a las de receptores transmembranales a través de la proteína Ras.

4. Factores de transcripción

El último grupo de proteínas que actúan como transmisores de la señal iniciada por la interacción del factor de crecimiento con su receptor, son las proteínas codificadas por protooncogenes nucleares. Estos productos representan el grupo de los factores activadores de la transcripción. Su función fundamental consiste en inducir la expresión de genes específicos, relacionados con la respuesta de proliferación o diferenciación celular.

La mayor parte de los oncogenes que se conocen hoy en día se pueden agrupar en estas familias. Aunque todavía no se conoce el mecanismo exacto de su función, se dispone de abundante información respecto a las rutas metabólicas en las que posiblemente la ejerzan. La clasificación descrita en la figura 1 refleja inequívocamente que las líneas maestras de su actividad, generalmente están enfocadas en los sistemas de transducción de señales intracelulares.

Genes supresores

Durante los últimos años se ha descubierto la existencia no sólo de genes «dominantes» capaces de inducir la transformación celular al alterarse su expresión de las formas descritas en este trabajo, sino también genes cuyos productos regulan de forma negativa el crecimiento celular y cuya alteración conlleva a la transformación celular por falta del mismo o a su supresión.

Representantes de este grupo de genes del cáncer denominados genes supresores, son los del retinoblastoma y el gen que codifica por la p53, ambos nucleares. El gen del retinoblastoma (*Rb*) se encuentra frecuentemente inactivado de forma homocigótica en retinoblastomas, osteosarcomas, carcinomas de pulmón (small cell lung carcinoma) y carcinomas de vejiga. El gen completo lo constituyen unas 190 kilobases, que

codifican por una proteína de 105 kDa. La proteína p105 está localizada en el núcleo, tiene capacidad de unir DNA y es sustrato de fosforilación, fundamentalmente en residuos de serina/treonina. Su función está relacionada con la inhibición de la progresión del ciclo celular en las fases G_0 y/o G_1 , regulada por medio de fosforilación. Se encuentra asociada con los productos del gen viral E1A de adenovirus, y el large T antígeno del virus SV40, capaces de inactivar su función, favoreciendo la transformación celular. Regula la función del factor de transcripción E2F, que entre otros genes, controla la síntesis de la DNA-polimerasa y del gen *myc*. La proteína conocida como p53 también ejerce su función como regulador negativo de la división celular mediante la regulación de la síntesis de la proteína p21-Waf1, inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDK). Estas quinasas responden a la regulación de numerosos factores exógenos como son entrada en quiescencia por falta de factores de crecimiento, participación de factores de crecimiento como el TGF β , que inhiben la proliferación, inhibición del crecimiento por contacto entre células, y la propia actividad del producto del gen p53. Mutaciones en el gen que codifica por la proteína p53, son capaces de modificar su función de manera que bloquean la actividad supresora de la p53 normal. De hecho, la proteína p53 normal es capaz de revertir la transformación inducida por diversos oncogenes. Mientras que la pérdida de ambas copias del gen del retinoblastoma es el responsable de la aparición de la transformación celular, en el caso del gen p53 la alteración de su producto es suficiente para generar la actividad transformante.

Genes interruptores

Una vez conectada la señal mitogénica mediante la cascada mencionada en el apartado anterior, ésta debe inactivarse para devolver a la célula a su estado de reposo. Este proceso de inactivación se basa fundamentalmente en la desconexión de las rutas activadas en la fase positiva de activación. El mecanismo más uti-

lizado probablemente se basa en la actividad de las denominadas fosfatasa que eliminan los residuos de fosfato de las proteínas activadas por las quinasas. Un segundo mecanismo es la activación de proteasas específicas como la proteasa dependiente de ubiquitinación, encargada de la eliminación de las ciclinas tras su utilización en la fase adecuada del ciclo celular. Por tanto, los genes «interruptores» juegan un papel importante en la restauración del sistema de activación/inactivación en las células, haciendo posible que sean susceptibles de un nuevo ciclo de activación. La alteración de su función produciría células incapaces de volver a su estado de reposo tras su activación inicial.

Genes reparadores

En un organismo multicelular y complejo, como el de un mamífero, se producen múltiples alteraciones en su genoma, debido a agentes exógenos (luz ultravioleta, mutágenos químicos, etc.) o a errores en la replicación del material genético durante la proliferación normal. El gen p53 actúa como un eficiente «policia» que detiene el ciclo celular al detectar las anomalías, poniendo en marcha un complejo mecanismo de reparación de estas alteraciones. En los últimos años se ha conseguido identificar y aislar algunos de los genes responsables de la reparación de las alteraciones inducidas por agentes mutágenos en levaduras (Mut S, Mut L, Mut H, Ssb) y se han identificado algunos de sus homólogos en humanos (por ejemplo, el gen HNPCC o hMSH2). Los cambios en los genes reparadores, por tanto, inciden indirectamente en la aparición de tumores al permitir la acumulación de mutaciones al azar en todo el genoma. Cuando se produce la acumulación de mutaciones apropiada, afectando a genes de los grupos contenidos en esta revisión, se genera una línea celular cancerosa.

Cáncer y apoptosis

La aparición de un tumor en un organismo depende de numerosos factores, entre los que ocupan un lugar importante las alteraciones del

equilibrio entre proliferación y la muerte celular. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico que juega un papel esencial en diversas situaciones, tales como desarrollo de órganos y tejidos en la fase embrionaria, mantenimiento de las células del sistema inmune y situaciones patológicas como infecciones por microorganismos. Varios de los genes que se han visto involucrados en tumores en humanos (p53, *myc* y proteínas virales como E1A, E6, E7) también se han identificado como genes relevantes en la regulación de la apoptosis. Alteraciones en estos genes que impidan el proceso natural de la muerte celular en respuesta a alteraciones en el genoma inciden de manera importante en la formación de tumores. De nuevo, el producto del gen p53 ocupa un lugar prominente al servir de «policia» que detecta la situación anómala y conecta el proceso de apoptosis. Otros genes como ICE (una proteasa específica de apoptosis) o bcl-2, también son esenciales en la regulación de la apoptosis y por extensión, candidatos a su alteración en procesos tumorales.

Resumen y perspectivas

El avance desarrollado en los últimos años en las técnicas de manipulación de ácidos nucleicos y proteínas, ha permitido desentrañar parte de los misterios intracelulares que gobiernan la regulación de los procesos de proliferación, diferenciación celular y desarrollo. Este descubrimiento ha impulsado considerablemente el conocimiento sobre los mecanismos que regulan la expresión génica y la transmisión de señales a través de factores extracelulares. Los resultados obtenidos refuerzan la teoría autocrina de la transformación celular al desvelar las bases de la regulación de la proliferación y diferenciación celular y establecer el mecanismo de alteraciones genéticas que hacen que la célula escape a los mecanismos normales de regulación. Para que este proceso ocurra es necesaria la participación de varias alteraciones distintas e independientes que afectan a genes con funciones complementarias. Sin embargo, se cuenta con el contratiempo importante de

que los mismos genes transformantes se encuentran activados en tumores de diversa naturaleza y, por el contrario, tumores de patología semejante presentan oncogenes activados muy distintos. Estos hallazgos hacen muy difícil el establecimiento de una relación clara causa-efecto en la generación de gran variedad de tumores.

El conocimiento profundo de los sistemas de regulación de los procesos de proliferación, diferenciación y desarrollo normales llevan a la posibilidad de poder manipularlos a voluntad. El desarrollo de las tecnologías de DNA nos ha permitido aislar los genes que codifican para los productos responsables de ciertas funciones celulares para su posterior utilización terapéutica. Por ejemplo, se han aislado genes que codifican para factores de crecimiento que pueden ser utilizados en la regeneración de tejidos dañados o deficientes. También se empezaron a

comprender los mecanismos que producen la diferenciación celular, que llevarán al diseño de drogas que ayuden a la regeneración controlada de tejidos especializados. El descubrimiento de los genes supresores han abierto las puertas de un campo apasionante, el diseño de estrategias específicas contra la proliferación celular incontrolada. Empezamos a comprender la complejidad de los sistemas involucrados en la regulación de la conducta celular, abriéndose las puertas de la esperanza en nuestra lucha contra enfermedades hoy en día incurables. Para poder controlarlas definitivamente, se requiere todavía un gran esfuerzo de investigación en las líneas trazadas en esta revisión. ◀

Juan Carlos Lacal, *Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC.*

Bibliografía

- CANTLEY, L.; AUGER, K. R.; CARPENTER, C.; DUCKWORTH, B.; GRAZIANI, A.; KAPILLER, R., and SOLTOFF, S. (1991): «Oncogenes and signal transduction». *Cell*, 64, 281-302.
- CULVER, K. W., and BLAESE, M. R. (1994): «Gene therapy for cancer». *Trends in Genetics*, 10:174-178.
- HARTWELL, L. (1992): «Defects in cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells». *Cell*, 71:543-546.
- HINDS, P. W., and WEINBERG, R. A. (1994): «Tumor suppressor genes». *Cur. Op. Gen. Developm.*, 4:135-141.
- HUNTER, T., and PINES, J. (1994): «Cyclins and Cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age». *Cell*, 79:573-582.
- JIRICNY, J. (1994): «Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match?». *Trends in Genetics*, 10:164-168.
- KOCH, C. A.; ANDERSON, D.; MORAN, M. F.; ELLIS, C., and PAWSON, T. (1991): «SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins». *Science*, 252:668-674.
- MURRAY, A. W. (1992): «Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls». *Nature*, 359:599-604.
- RABBITS, T. H. (1994): «Chromosomal translocations in human cancer». *Nature*, 372:143-149.
- SUGIMURA, T. (1992): «Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective». *Science*, 258:603-607.
- WYLLIE, A. H. (1995): «The genetic regulation of apoptosis». *Cur. Op. Gen. Developm.*, 5:97-104.