

REAL ACADEMIA DE DOCTORES

**MECANISMOS REGULADORES
DE LA PROLIFERACION CELULAR**

DISCURSO

LEIDO POR LA

EXCMA. SRA. DRA. D.^a MARIA CASCALES ANGOSTO
EN SU RECEPCION PUBLICA COMO ACADEMICA NUMERARIA

Y CONTESTACION DEL

ILMO. SR. DR. D. MIGUEL DEAN GUELBENZU

EL DIA 28 DE NOVIEMBRE DE 1989



Domicilio de la Real Academia:

San Bernardo, 49 - Madrid

1989

MECANISMOS REGULADORES
DE LA PROLIFERACION CELULAR

Discurso de recepción de la Excelentísima
Sra. Doctora D.^a MARIA CASCALES ANGOSTO
en la Real Academia de Doctores, el 28 de
Noviembre de 1989.

Excelentísimo Sr. Presidente
Excelentísimos e Ilustrísimos Académicos y Académicas
Señoras y Señores

Quiero iniciar este momento solemne de mi toma de posesión como Numeraria de la Real Academia de Doctores en la Sección de Farmacia, expresando ante todos mi gran satisfacción y mi profunda emoción por el honor de haber sido admitida para formar parte de esta prestigiosa Corporación, junto con mi reconocimiento y gratitud a vuestra generosidad a la hora de evaluar mis actividades profesionales.

De una manera especial he de mencionar con afecto a aquellos Académicos Doctores que tan amablemente avalaron mi candidatura:

- Don Angel Santos Ruiz, ejemplo de maestros a cuyo lado ha transcurrido la mayor parte de mi vida profesional,
- Don Juan Manuel López de Azcona, del que he recibido tantas atenciones patrocinando mi entrada en esta Academia.
- Don Miguel Dean Guelbenzu compañero de muchos años y gran amigo que ha aceptado gustoso el contestar a mi discurso y también a nuestro Presidente Don Rafael Díaz-Llanos y Lecuona que en todo momento ha mostrado su confianza en mí.

Con todos vosotros, desde ahora compañeros, tengo obligado el compromiso de mi lealtad y pido a Dios ser digna de vuestra confianza y generosidad.

Quiero compartir esta distinción, que hoy recibo, con todos mis colaboradores, quienes trabajando a mi lado me transmitieron una buena parte de su juventud e inquietudes y que han sido el estímulo de mi vocación investigadora.

Por último, en este capítulo de agradecimientos, quiero a un nivel más personal y profundo, reconocer ante todos la influencia decisiva y el respaldo permanente de mis padres durante mi formación y posterior vida profesional.

*** *** ***

Vengo a suceder en esta Academia al Excmo. Sr. Dr. José de la Vega Portilla. Aunque no tuve la suerte de conocerlo personalmente, las referencias de su destacada personalidad y el estudio de sus actividades me han hecho reflexionar sobre la responsabilidad de ocupar su vacante. El Dr. de la Vega Portilla finalizó sus estudios de Licenciatura en la Facultad de Farmacia de Madrid en 1915, y obtuvo el grado de Doctor, por la Universidad de Madrid, por su Tesis titulada: BOTICA REAL DURANTE LA DINASTIA AUSTRIACA. Muy joven fue Director del Laboratorio de Análisis del Dispensario Antituberculoso de Santander. A continuación, en Madrid, ejerció como Farmacéutico de la Real Oficina de Farmacia del Palacio Real, cargo en que se distinguió y mereció el honor de ser nombrado Gentilhombre de Palacio. S.M. el Rey Alfonso XIII le concedió una parcela en la Casa de Campo, donde se ocupó del estudio de plantas medicinales, al mismo tiempo que dirigía la Revista del Comité Nacional de Plantas Medicinales, en la que publicó numerosos trabajos que revelan su brillante labor, premiada posteriormente con la Placa de Comendador del Merito Agrícola.

Su capacidad de trabajo le llevó a organizar y dirigir laboratorios de Especialidades Farmacéuticas, como los Laboratorios Ulzurrun. Más tarde, reanudó estas actividades instalando otro laboratorio en el que creó un cuadro de especialidades en el campo de la Veterinaria que, ya jubilado, puso en manos de los Laboratorios Leo. A petición de los empleados de estos Laboratorios, se le concedió en 1967 la Encomienda con Placa de la Orden Civil de Sanidad. Un año después le fue impuesta la Medalla del Trabajo como reconocimiento a sus 50 años de dedicación profesional. Como Académico Numerario de la Real Academia de Farmacia, desde el año 1921, ocupó cargos de singular relieve en la Junta Directiva de esta Real Corporación y como Presidente de la Comisión Oficial de la Farmacopea.

Tan intensa vida profesional exigirla una reseña mucho más amplia. Con estas palabras, sólo he intentado sintetizar los rasgos más acusados de la personalidad del Dr. de la Vega Portilla y su valiosa aportación a la Farmacia Española.

*** *** ***

MECANISMOS QUE REGULAN LA PROLIFERACION CELULAR

Introducción

Uno de los temas de más candente actualidad, por haber recibido durante la última década la atención de los grupos más prestigiosos de investigadores en el área biomédica, ha sido el estudio de los mecanismos que gobiernan la proliferación celular, tanto en las células normales, cuya multiplicación se encuentra bajo un estricto control, como en las neoplásicas, cuya división ha conseguido escapar del control. En los procesos fisiológicos normales proliferativos (embriogénesis, cicatrización, regeneración tisular y respuesta inmune), la división celular está regulada por los factores de crecimiento. La producción anormal de estos factores, sus receptores celulares o sus mediadores intracelulares, puede conducir a estados patológicos en los que se incluye el cáncer.

En 1962 Cohen describió el aislamiento de una molécula de naturaleza polipeptídica, presente en las glándulas submaxilares del ratón, que denominó "factor de crecimiento epidérmico" (EGF). Este factor posee una poderosa actividad mitogénica sobre fibroblastos en cultivo y transmite su actividad mediante receptores específicos situados en la superficie de células sensibilizadas (1). Este mismo grupo de investigadores observó las posibles conexiones entre este factor de crecimiento y los oncogenes celulares, a través de la actividad proteína quinasa, específica de residuos de tirosina, que posee el receptor, la cual se estimula de manera muy notable al unirse dicho receptor a su ligando específico, el EGF (2, 3). De estas investigaciones surgió la idea de que las tirosina quinases podían ser las responsables de la transmisión, al interior de la célula y al núcleo, de las señales mitogénicas generadas por el factor de crecimiento. Estas señales al llegar al núcleo, a través de una cascada de reacciones, activarían la producción de oncogenes responsables de la división celular.

Desde el descubrimiento del EGF se han descrito más de una docena de otros factores de crecimiento de naturaleza polipeptídica, con capacidad de activar la mitosis en diferentes tipos de cultivos celulares. Todos estos factores, al igual que el EGF, transmiten señales inductoras de la mitosis a través de receptores específicos de superficie. El papel fisiológico de estos factores es participar directamente en la regulación de la multiplicación y/o diferenciación celular durante la embriogénesis, cicatrización y regeneración tisular.

El posterior descubrimiento, por el grupo de Todaro (4), de los factores transformantes del crecimiento (TGFs), en cultivos de fibroblastos transformados, dio a conocer, que en el proceso de transformación las células adquieren la

propiedad de producir factores promotores de su propio crecimiento, a través de vías que contribuyen a su multiplicación ilimitada. Mediante el virus del sarcoma de Rous, que contiene el oncogen *v-sis*, se estudió el mecanismo inductor de la transformación en fibroblastos de ratón y se observó, en estas células, la existencia de un mecanismo autocrino que las capacita para generar sus propios factores de crecimiento (5).

Otro descubrimiento, que revela la relación entre oncogenes y factores de crecimiento, surgió al observar, en cultivos celulares en proliferación por efecto de ciertos mitógenos o factores de crecimiento, la inducción de la expresión en el núcleo celular de dos proto-oncogenes, *c-myc* y *c-fos*, cuya acción específica no se encuentra aún esclarecida. La inmediata activación de estos proto-oncogenes, por efecto de los factores de crecimiento, hace ver en ellos una participación en los procesos de proliferación celular (6, 7).

Ya 1969 Huebner y Todaro (8) propusieron que el fallo de los genes responsables de la regulación del desarrollo normal en organismos superiores traería consigo el crecimiento irregular típico del cáncer. Más tarde cuando Spector, Bishop y Varnus observaron (9) que el gen *src* transformante del virus del sarcoma de Rous, compartía secuencias con genes celulares normales, se propuso que los genes víricos u oncogenes eran homólogos de los genes celulares normales o proto-oncogenes y que la alteración de los genes normales, por una mutación, conduciría eventualmente a la neoplasia. Eso ha hecho que se considere a estos genes como "enemigos internos". El término oncogenes se introdujo entonces para describir tales genes y el concepto fue denominado "hipótesis de los oncogenes". Esta hipótesis propone que unos genes específicos u oncogenes pueden inducir el cáncer y que los genes celulares normales pueden convertirse en oncogenes por mutación genética. De la misma manera que hace unos 100 años la teoría de los gérmenes revolucionó los conocimientos acerca de las enfermedades infecciosas, la hipótesis de los oncogenes ha supuesto un impacto en el conocimiento actual de los mecanismos que regulan la multiplicación y diferenciación celular y ha conseguido definir muchos de los aspectos que conducen al cáncer. Entre estos aspectos hay que destacar por su aceptación general:

- la base genética para el cáncer,
- las funciones normales de crecimiento y diferenciación, debidas a los proto-oncogenes, que se enlazan con las de la transformación neoplásica, debida a los oncogenes.
- la teoría unificada, mediante la cual se encuentra explicación a la capacidad de los carcinógenos y a otras alteraciones genéticas que contribuyen a la neoplasia.

En resumen, esta hipótesis considera que para la génesis de un proceso canceroso

es necesario que existan perturbaciones de los genes normales.

Hasta hoy, y fruto de las investigaciones sobre este tema, se sabe que los mecanismos moleculares de la oncogénesis por retrovirus, tienen prácticamente las mismas bases que los originados por carcinógenos químicos. De esta manera, cualquier gen que codifique un factor de crecimiento, un receptor de membrana, una molécula señalizadora o una proteína reguladora de la transcripción, puede ser considerado como un proto-oncogén.

El término cáncer incluye en la actualidad multitud de enfermedades que tienen en común una multiplicación celular incontrolada. Las células malignas son capaces de propagarse, tanto por invasión local de los tejidos adyacentes, como por diseminación linfática o hemática hacia lugares distantes. Las células cancerosas han escapado, de alguna manera, a las leyes que confinan a las normales a proliferar dentro de unos estrechos límites. Para poder profundizar en los mecanismos que rigen el crecimiento neoplásico se necesita poseer un conocimiento fundamental del proceso de transformación de las células normales. Se han determinado, hasta la fecha una serie de factores que facilitan dicha transformación, como los carcinógenos químicos, las radiaciones ionizantes, las hormonas, los virus, la predisposición hereditaria y los síndromes que se caracterizan por una inestabilidad cromosómica y una reparación defectuosa del DNA. Todas estas causas de cáncer comparten un denominador común, lesión del DNA, el material genético de la célula.

El esclarecimiento de los mecanismos que conducen a la multiplicación y/o diferenciación celular normal supondrá un progreso en el estudio de la transformación maligna. Los genes normales se dividen en reguladores y estructurales. Los estructurales determinan las secuencias del RNA o proteínas utilizadas para la construcción y funcionamiento de la célula y los genes reguladores gobiernan la expresión en tiempo y espacio de los genes estructurales.

FACTORES DE CRECIMIENTO, RECEPTORES Y ONCOGENES

Factores de crecimiento polipeptídicos

En los últimos diez años se han identificado péptidos que presentan una elevada capacidad de activar o inhibir la proliferación de células epiteliales o mesenquimatosas. Debido a su acción reguladora sobre el crecimiento tisular estos péptidos se denominan "factores de crecimiento", y la mayoría de ellos han recibido su nombre de acuerdo con su actividad biológica o los ensayos que condujeron a su aislamiento original. Como ejemplos pueden citarse, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos y los factores transformadores del crecimiento. Posteriormente se ha comprobado que muchos de estos péptidos tienen un espectro de acción mucho más amplio, que la actividad biológica que les fue asignada originalmente, y la mayoría de ellos pueden considerarse como agentes multifuncionales (10).

Los factores de crecimiento y los receptores celulares específicos de dichos factores, pueden encontrarse involucrados en los mecanismos del crecimiento anormal del cáncer y tanto unos como otros están codificados por proto-oncogenes conocidos. Los factores de crecimiento pueden actuar, estimulando la multiplicación de las mismas células que los producen (autocrinos), o de células cercanas (paracrinos), o de un tejido distante (endocrinos). Los receptores de los factores de crecimiento son, por lo general, moléculas de la superficie celular que al unirse a su factor de crecimiento específico, se activan y desencadenan una cascada de reacciones en el interior de la célula. El desencadenamiento de estas reacciones da lugar a segundos mensajeros, a partir de precursores específicos, los cuales transducen o transmiten las señales desde la superficie celular al núcleo donde se origina la transcripción genética.

El oncogen *sis* parece que funciona al inicio de la cascada mitogénica dirigiendo la síntesis de un factor de crecimiento automitogénico que se relaciona con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Este factor es el único ejemplo conocido de un producto oncogénico segregado. Otros oncogenes se relacionan con los receptores de los factores de crecimiento que contienen función de tirosina proteína quinasa: *erbB* que codifica a un homólogo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF); *erbB-2 (neu)* es un oncogén relacionado con el anterior; el gen *fas* codifica un producto similar al factor-1, que estimula el crecimiento de colonias de macrófagos y el oncogén *ras*, cuyo producto muestra alguna homología con el receptor de la insulina. En estos ejemplos los genes celulares normales se han convertido en transformados por mutaciones puntuales y/o supresiones.

El factor de crecimiento pro-epidérmico, un precursor del EGF, comparte similitudes con el receptor EGF y analogías secuenciales con el producto del oncogen *mos* y con el del receptor de las lipoproteínas de baja densidad. El gen *erbA* codifica una proteína que comparte secuencias con el receptor de la hormona tiroidea, un receptor nuclear de hormonas esteroideas. Otros factores de crecimiento y sus receptores parece que juegan un papel en la oncogénesis. Tales son los factores de crecimiento transformantes (TGF α y β) y el factor de crecimiento de las células T, la interleuquina 2 (IL-2).

Estos factores de crecimiento de naturaleza polipeptídica estimulan la multiplicación celular mediante la unión con receptores específicos de la membrana plasmática, por los que presentan una afinidad muy elevada. Estos receptores una vez activados, ejercen su acción intracelular a través de la generación de segundos mensajeros, a partir de precursores específicos ubicados en la membrana celular. El descubrimiento de la intervención de los factores de crecimiento en la proliferación celular surgió al adicionar suero a cultivos primarios de células y a líneas celulares "in vitro" y observar que el suero promovía la multiplicación celular en tales cultivos. Casi simultáneamente se demostró que los cultivos de células neoplásicas transformadas requerían menor cantidad de suero para proliferar. La pérdida del requerimiento de factores de crecimiento específicos, que se encuentran en suero, por parte de las células neoplásicas, puede estar mediada, bien por la síntesis de factores de crecimiento autocrinos, por la síntesis de factores de crecimiento alterados o por activación directa de elementos de la cascada mitogénica.

La multiplicidad de los factores de crecimiento, sus receptores, el cronometraje de sus interacciones con las células y la heterogeneidad de los tejidos receptores, proporcionan un equilibrio para que se verifique la proliferación coordinada de las células normales durante el desarrollo y la maduración. A menudo se necesitan varios factores de crecimiento para conseguir una respuesta proliferativa máxima, debido en parte, a que los estímulos mitogénicos actúan a diferentes estados del ciclo celular. El autoestímulo (autocrino) y el estímulo de células cercanas (paracrino), por liberación localizada de factores de crecimiento, constituye una buena sintonización en la coordinación de la división celular en un tejido. Estos tipos de factores autocrinos y paracrinos difieren de los factores de crecimiento endocrinos (hormonas). Las sustancias endocrinas están elaboradas en tipos específicos de células y se transportan a células distantes por medio de la corriente circulante. Los agentes paracrinos una vez liberados, viajan hasta su célula objetivo por difusión (células cercanas) y una tercera clase de agentes, los autocrinos, están producidos por la misma célula que van a estimular. La mayoría de los factores de crecimiento polipeptídicos actúan como agentes paracrinos. Ejemplos de endocrinos están la insulina y los factores similares a la insulina I y II y de autocrinos los factores de crecimiento transformantes (12).

Es lógico suponer que la producción incontrolada de un factor de crecimiento autocrino por una célula que necesita ese factor, puede dar lugar a ventajas en el crecimiento del clon derivado de esta célula. Ejemplos de células estimuladas por factores autocrinos incluyen las del músculo liso (IGF-1), fibroblastos de ratón transformados por agentes químicos (TGF β), células de osteosarcoma humano U-205 (PDGF), células leucémicas T (IL-2) y células de carcinoma de pulmón (bombesina). En todos estos casos los anticuerpos que se unen a los factores de crecimiento autocrinos inhiben específicamente la respuesta de las células y en el caso de la interleuquina 2 (IL-2), la unión del anticuerpo monoclonal al receptor IL-2, bloquea también la proliferación de las células T.

Es probable que la producción local de un factor de crecimiento contribuya, no sólo al crecimiento de las células tumorales, sino también a la proliferación de las células del estroma necesario para la sujeción de la masa celular del tumor. Se han caracterizado diversos factores de angiogénesis tumoral, producidos por las células tumorales o por células inflamatorias infiltradas.

Los factores angiogénicos estimulan la proliferación local de células vasculares que van a ser el soporte del tumor en crecimiento. La interacción compleja de los factores de crecimiento paracrinos, la respuesta del estroma del huésped y los factores autocrinos actuando directamente sobre una célula tumoral naciente, puede determinar, en último lugar, cuán rápidamente crece el tumor y destruye al huésped.

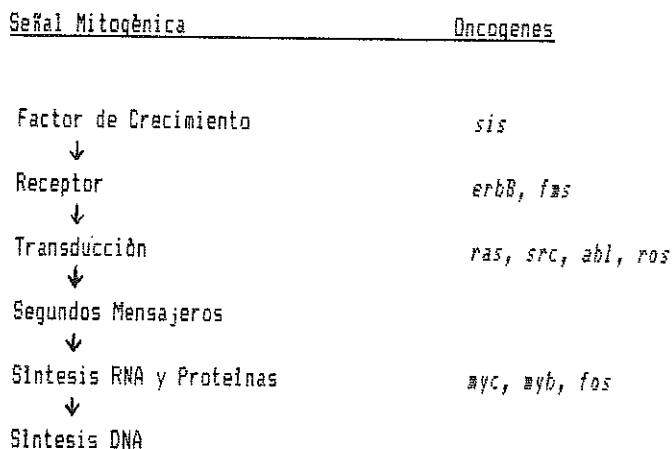
Señalización a través de la membrana

La coordinación del comportamiento de las células individuales en un organismo multicelular se encuentra regulada por mecanismos paracrinos o endocrinos en los cuales juegan un papel decisivo los factores de crecimiento y diferenciación sintetizados en el interior de los tejidos y que actúan a concentraciones muy bajas sobre las células vecinas (13). La unión de uno de estos factores de crecimiento a su receptor específico en la membrana celular, desencadena una cascada de señales a través del citoplasma, que pueden alcanzar al núcleo y alterar la expresión genética. Los proto-oncogenes encargados de codificar proteínas que participan en estas vías de transducción de señales, pueden sufrir alteraciones en su estructura y función y convertirse en oncogenes "activos" que darán lugar a alteraciones en dicha transducción, las cuales repercutirán directamente sobre la multiplicación, diferenciación y coordinación intercelular.

Los mecanismos transductores de las señales proliferativas actúan vía precursores específicos que se convierten en segundos mensajeros en respuesta al estímulo de un factor de crecimiento.

La ocupación del receptor por el PDGF, el EGF, la insulina y ciertas linfoquinas, da lugar a la activación del dominio tirosina quinasa presente en la porción citoplasmática del receptor (14). Otro mecanismo de transducción de señales es el sistema β -adrenérgico en el cual, la ocupación del receptor por el agonista, produce la activación de la adenilato ciclasa que se acopla al receptor a través de las proteínas G reguladoras (15). El incremento resultante en cAMP produce la activación de la proteína quinasa A, una serina y treonina quinasa. En algunos sistemas celulares se ha observado que el incremento en cAMP puede inducir la reversión del fenotipo transformado, por lo que el mecanismo señalizador acoplado a la adenilato ciclasa, puede ejercer una regulación negativa (inhibición) del crecimiento (16). Otro mecanismo de transducción de señales es el que se relaciona con el ciclo de los inositol fosfolípidos. La unión del factor de crecimiento con su receptor genera inositol 1,4,5 trifosfato y diacilglicerol, a partir del fosfatidil inositol, mediante la acción de una fosfodiesterasa (fosfolipasa C), que se pone en contacto con un receptor de superficie mediante una o más moléculas de proteína G.

Uno de los problemas cruciales en el conocimiento del control del crecimiento celular es la naturaleza de la transmisión de las señales y la identidad de los segundos mensajeros que van a desencadenar la síntesis del DNA.



ESQUEMA 1. Relación entre señales mitogénicas y oncogenes.

El hecho de que los diferentes factores de crecimiento no actúen por el mismo mecanismo, sugiere que deben existir diferentes vías de transducción de señales

a través de la membrana. En algunos estadios estos diferentes mecanismos de transducción comparten los de otros, pero estos puntos de convergencia no están aún esclarecidos. La importancia de estas vías y sus mecanismos está reforzada por los recientes hallazgos que hacen suponer que ciertos oncogenes codifican proteínas que participan en la transducción de señales (17, 18).

Entre las vías de señalización y transducción de señales antes descritas, la más estudiada hasta el momento, es aquella en la que se encuentran involucrados los inositol fosfolípidos. Estos son compuestos integrantes de la membrana celular y parece que funcionan como parte del mecanismo de transducción para la generación de segundos mensajeros, tales como el inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol. Estos dos compuestos regulan dos fenómenos iónicos diferentes que son imprescindibles para que tenga lugar la iniciación de la síntesis del DNA. El IP₃ interviene movilizando el Ca²⁺ de sus reservorios intracelulares (retículo endoplásmico), mientras que el diacilglicerol estimula la actividad de la proteína quinasa C, la cual a su vez, activa un sistema cambiador de protones, Na⁺/H⁺, que actúa produciendo una elevación en el pH intracelular. El incremento intracelular (citoplásmico) de los niveles de calcio y la elevación del pH son las causas responsables de que se active la transcripción de ciertos genes (incluyendo los proto-oncogenes *myc* y *fos*). A partir de aquí, se inicia una secuencia de acontecimientos que culminará en la síntesis del DNA y en la división celular. Muchos de los detalles de esta vía son todavía especulativos, pero está claro, que la hidrólisis de una fracción lipídica integrante de la membrana, genera dos segundos mensajeros muy diferentes en el interior de la célula, los cuales actúan como elementos clave en la cascada mitogénica (19).

Uno de los factores de crecimiento que parece actuar en la vía de los inositol lípidos parece ser el PDGF. Se ha demostrado recientemente (20), que el oncogén vírico *v-sis* codifica una proteína que es casi idéntica al PDGF, lo que hace sostener el argumento de que este oncogén puede tomar parte en la transformación celular, vía un mecanismo autocrino. Otro ejemplo en el cual interviene el ciclo de los inositol fosfolípidos, es en el crecimiento neoplásico del carcinoma de células pequeñas de pulmón (small cell) cuya división celular parece depender de la secreción autocrina de bombesina, poderoso activador de la hidrólisis de los inositol fosfolípidos (21).

Para que se inicien las señales derivadas del ciclo de los inositol lípidos es necesario que un factor de crecimiento apropiado se una a su receptor en la superficie celular. La naturaleza de los receptores, aunque todavía sin caracterizar, en su totalidad, son en su mayor parte productos de oncogenes. También se ha establecido una conexión entre oncogenes y receptores en otras vías señalizadoras; así, *erbB* codifica para un receptor truncado EGF (22), mien-

tras que *c-fms* se relaciona con el receptor CSF-1 (23). El oncogén *v-erbB* del virus de la eritroblastosis de las aves (AEV) codifica un receptor EGF truncado. La proteína codificada GP74 *v-erbB*, carece de la mayor parte del dominio extracelular de unión al EGF, como también los 32 residuos de aminoácidos al extremo del C terminal del receptor, que son los que contienen el lugar de mayor fosforilación del receptor EGF (24). Se ha demostrado que la proteína codificada por el *v-erbB* posee una actividad proteína-tirosina quinasa intrínseca hacia sus tratos exógenos y que también sufre la autofosforilación (25).

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y oncogén *v-sis*

El oncogén *sis* es el gen transformante del virus del sarcoma de mono (55V). La proteína que codifica este oncogén se identificó por primera vez en 1982 (26) y se ha clonado y expresado en *E.coli*. A pesar de la disponibilidad de esta proteína clonada, el modo de acción de este producto oncogénico estuvo sin esclarecer hasta hace poco. No se encontró homología en su secuencia con la familia oncogénica tirosina quinasa, ni con los productos oncogénicos nucleares de la familia *c-myc*. En 1984 los análisis de la secuencia del PDGF derivado del gen humano, revelaron homologías con el oncogén *sis*. Este descubrimiento fue el primero de una serie, que relacionó los factores de crecimiento con el cáncer. Actualmente el producto del gen *c-sis* es el único ejemplo conocido de un factor de crecimiento codificado por un oncogén (27).

El PDGF liberado por las plaquetas durante la coagulación de la sangre es uno de los principales factores de crecimiento presentes en suero. Es un poderoso mitógeno y factor quimiotáctico para diversas células mesenquimatosas, incluidas los fibroblastos y las células del músculo liso. El efecto mitogénico del PDGF sólo se expresa en su totalidad en presencia de otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la insulina. Se ha demostrado recientemente que el PDGF fosforila al receptor EGF en la treonina-654 por activación de la proteína quinasa C (PKC) (28). Estos datos sugieren que la PKC puede jugar un papel en la regulación, por el PDGF, del metabolismo celular y la proliferación. El PDGF se libera normalmente en el lugar de una herida, a partir de los gránulos α de las plaquetas durante la hemostasis y se cree que promueve la cicatrización al estimular el crecimiento de los fibroblastos. Los fibroblastos no producen PDGF, pero tienen receptores para este factor. Muchas células mesenquimatosas producen PDGF o moléculas relacionadas similares al PDGF.

El PDGF humano contiene dos cadenas polipeptídicas distintas pero relacionadas: PDGF-A (14 - 18 kD) y PDGF-B (16 kD). Cuando los puentes disulfuro las conectan como heterodímeros, estas subunidades originan proteínas de unos 30 kD. La secuencia de aminoácidos de la PDGF-B humana se vio que era similar a la secuencia de aminoácidos predicha para el producto *v-sis* de la secuencia de

DNA clonada del gen del virus del mono. Las diferencias entre las dos proteínas podía ser debida a las diferentes especies a partir de las cuales fueron aisladas. Por tanto *v-sis* se piensa que codifica una forma de PDGF-B. El gen *v-sis* del virus de sarcoma de mono (SSV), se inserta en el extremo 3' del gen de la cubierta del virus y las células transformadas con este virus producen una proteína quimérica que contiene 38 aminoácidos derivados del gen virico *env* y 220 aminoácidos codificados por las secuencias del *v-sis*. Los productos del gen *v-sis* han sido reconocidos por anticuerpos anti-PDGF. Este descubrimiento fue sorprendente debido a la homología de las secuencias de aminoácidos de estas dos proteínas. Cuando la proteína PDGF-B codificada por el gen *v-sis* de mono, se introduce en un fibroblasto por infección con el SSV, la célula infectada comienza a producir su propio factor de crecimiento (autocrino) que la capacita para proliferar de manera incontrolada. Son diversas las evidencias experimentales que sostienen la hipótesis del crecimiento autocrino para el PDGF/*sis* (29).

De la similitud entre la proteína *v-sis* y el PDGF, codificado por el gen *c-sis* surgen las preguntas; por qué una de estas proteínas se asocia con la transformación y la otra no, y también, si la producción "desordenada" autocrina del *c-sis*/PDGF puede asociarse con el cáncer humano. Entre las células normales, como los citotrofoblastos de la placenta y las de músculo liso embrionario, existen receptores PDGF y se producen factores similares al PDGF. Líneas celulares derivadas de la placenta, que expresan receptores celulares PDGF, responden al PDGF exógeno, con activación del gen *c-myc* y activación de la síntesis del DNA. Considerando que estas células están entre las de crecimiento más rápido y las más invasivas, de las consideradas normales, la expresión de los receptores PDGF en este tejido, puede ayudar para su comportamiento "pseudomaligno". Los receptores PDGF se encuentran también en una variedad de células mesenquimatosas. Los fibroblastos poseen 400.000 receptores por célula con una constante de disociación de 10 a 1.000 pM. La mayor parte de las células epiteliales no tienen receptores PDGF. La unión del PDGF a su receptor induce la autofosforilación de la tirosina de dicho receptor de 185 kD.

El gen *c-sis* ha sido asignado al cromosoma 22 y se encuentra implicado en la translocación recíproca 9:22 observada en leucemia crónica mielógena. En este caso, sin embargo, el gen *c-abl* se activa y el *c-sis* permanece transcripcionalmente silencioso. Se ha observado un transcrito del *c-sis* de 4.2 kD en 5 ó 6 sarcomas y en tres de cinco glioblastomas, pero no se expresa normalmente en fibroblastos o en tejido conjuntivo. Se han detectado moléculas, con propiedades similares al PDGF en una variedad de células transformadas, como en una línea celular de osteosarcoma humano U20S, en glioma U-343, en carcinoma de vejiga T24 y en hepatoma Hep52.

Es aún incierto el papel que juegan estas moléculas similares al PDGF en la transformación de estas células, algunas de las cuales carecen de receptores PDGF. Posiblemente han tenido lugar mutaciones o reordenamientos cromosómicos en las células tumorales, que dan lugar a la desrepresión de los genes endógenos PDGF. Estas lesiones genéticas pueden estar en los mismos genes que codifican este factor o en genes que controlan su expresión.

Muchos tumores segregan factores de crecimiento que pueden conferir un fenotipo reversible y transformado a líneas celulares consideradas como normales. Estos son los factores de crecimiento transformantes (TGFs), que más adelante veremos. Uno de estos factores, el TGF- α , se relaciona con el EGF, mientras que el β no. El PDGF, así como los similares al PDGF, potencian los efectos de los factores transformantes y, cuando activan el crecimiento de células normales. Sin embargo, se desconoce hasta el momento la existencia de productos oncogénicos que no provenga del *v-sis* (30).

Mecanismos de elevación del pH intracelular (pHi) inducido por mitógenos y su significación biológica

Una alcalinización de 0.2 unidades en el pH, inducida por un mitógeno, se sabe que ejerce efectos considerables sobre una multitud de procesos celulares. Cada vez están más de acuerdo los investigadores acerca de que la alcalinización intracelular ejerce un papel desencadenante permisivo (no estricto) sobre la respuesta de la célula a mitógenos. En este sentido el pH intracelular difiere de los clásicos segundos mensajeros Ca^{2+} y cAMP.

Es esencial determinar de qué manera interviene la alcalinización citoplasmática, mediada por intercambio de protones Na^+/H^+ , en la iniciación de la síntesis del DNA y la división celular en respuesta a estímulos de crecimiento. Quizás las pruebas más convincentes hasta el momento, que adjudican un papel señalizador al intercambio Na^+/H^+ y al pH intracelular en la iniciación de la respuesta mitogénica, hayan sido los experimentos realizados en huevos fertilizados de erizo de mar, en los cuales el pH ha de subir al menos 0.2 unidades para permitir que se inicie la síntesis del DNA.

Utilizando un fibroblasto mutante, que carece del intercambiador funcional Na^+/H^+ , se ha demostrado que por debajo de un cierto valor umbral de pH 7.2, el pH es limitante para la proliferación celular (31). Uno de los eslabones críticos, dependientes del pH en fibroblastos activados, parece que es el estímulo de la síntesis proteica. Otras investigaciones parecen confirmar que la elevación del pH intracelular inducida por mitógenos, es un acontecimiento necesario, pero no suficiente, para la progresión hacia la fase S del ciclo celular (32). Sin embargo, la alcalinización citoplasmática puede tener un papel

menos crítico en la respuesta mitogénica de los linfocitos a la interleuquina-2 que en la de los fibroblastos activados.

En eucariontes inferiores, como protozoos y levaduras, se han observado cambios en el pHi durante el ciclo celular. Por ejemplo, durante el ciclo celular del *Dictyostelium*, el pHi oscila de acuerdo con el ciclo de replicación del DNA, y la alcalinización tiene lugar durante la síntesis del DNA, por mecanismos aún desconocidos. Estas oscilaciones del pHi deben tener una función de "encendido/apagado", más bien que un papel permisivo en el cronometraje y regulación de la síntesis del DNA y proteínas (33). Con un gran número de mitógenos y otros estímulos extracelulares, se ha detectado que el pHi se eleva a los 10-20 segundos y que esta elevación se completa en 10 minutos. Estas alcalinizaciones, en el rango de 0.1-0.3 unidades de pH se deben a la salida de H^+ a través del intercambiador de protones Na^+/H^+ .

El mecanismo que relaciona el pH intracelular y el intercambio protónico Na^+/H^+ en células quiescentes o en división, parece que depende de los factores de crecimiento y otros estímulos externos, que actúan incrementando la sensibilidad del intercambiador protónico por el H^+ . Este cambio alcalino, de 0.1 a 0.3 unidades en la sensibilidad del pHi, refleja un incremento en la afinidad aparente del sitio regulador para H^+ . Se puede imaginar, que algún grupo ionizable en el sitio regulador, adquiere un mayor pKa porque su medio inmediato se carga más negativamente (por ejemplo, por fosforilación). El intercambio protónico activado por estímulo externo es sólo transitorio: la actividad de salida de H^+ vuelve a sus valores iniciales una vez que el pHi alcanza su valor más alcalino.

Es interesante profundizar en las vías bioquímicas modificadas por los factores de crecimiento, para alterar la sensibilidad al pH del intercambiador Na^+/H^+ . Se ha observado que la proteína quinasa C (PKC) puede, de alguna manera, activar este intercambiador. También, los ésteres de forbol y los diacilglicérols sintéticos, que se unen y activan directamente la PKC, simulan la actividad de los factores de crecimiento, en cuanto a la elevación del pH, sin producir incrementos notorios en las concentraciones de calcio (34). Por tanto, un aumento rápido en el calcio intracelular no es esencial para la activación del Na^+/H^+ . Estudios más recientes (35) parecen indicar que existen otras vías, dependientes de la proteína quinasa C que pueden activar el Na^+/H^+ .

Calcio

Una de las primeras respuestas originadas después de la adición de un mitógeno (PDGF, bombesina, vasopresina, etc) a células 3T3 quiescentes de ratón, es una movilización del calcio a partir de los reservorios intracelulares. La adición

de estos mitógenos origina una elevación transitoria de la concentración de calcio citoplasmático, incrementa su velocidad de salida y disminuye su contenido celular. Como ya se indicó anteriormente, la movilización del Ca^{2+} intracelular puede estar mediada por el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃), considerado como segundo mensajero en la acción de muchos ligandos, que inducen el intercambio de los inositol fosfolípidos y la movilización del Ca^{2+} . Estos ligandos incluyen el PDGF, bombesina y la vasopresina. Aunque estos mitógenos se unen a receptores diferentes en células 3T3, la producción incrementada del inositol trifosfato y la movilización del calcio pueden estar mediadas por una vía común en la transducción de señales. De manera alternativa, diferentes eslabones moleculares podrían acoplar la ocupación de los receptores por sus respectivos ligandos, a los sistemas movilizadores de Ca^{2+} . El grupo de Rozengurt (36) ha presentado pruebas experimentales que muestran como las señales generadas en respuesta a la bombesina y a la vasopresina, pueden distinguirse de aquellas producidas por adición del PDGF. Las diferencias están basadas en diversos criterios, que incluyen las cinéticas y magnitud del incremento del Ca^{+} , la sensibilidad de esta respuesta frente a los ésteres de forbol y la capacidad de estos ligandos para incrementar la producción de inositol trifosfato. Estos resultados indican, que las vías de transducción de señales activadas por PDGF, que conducen a la movilización del calcio, son diferentes de aquellas utilizadas por la bombesina y la vasopresina.

El calcio se considera un componente importante en la regulación del crecimiento celular. El Ca^{2+} no sólo es un elemento imprescindible para la viabilidad celular, sino que la progresión a través del ciclo de división celular (G₁ y mitosis), es muy sensible a las concentraciones intracelulares de calcio.

La calmodulina, el principal receptor del calcio en células de eucariontes, exceptuando las musculares, interviene en muchas reacciones de este elemento y ha estado siempre considerada como un regulador de la proliferación celular. Los agentes farmacológicos, que antagonizan selectivamente la función de la calmodulina, bloquean la progresión del ciclo celular en el paso G₁/S y durante G₂/M y pueden ocasionar la salida del ciclo celular y la diferenciación. Desgraciadamente la interpretación de estos resultados está dificultada por el hecho de que estos fármacos también interactúan "in vivo" con otros objetivos diferentes a la calmodulina, por ejemplo la proteína quinasa C (37). Sin embargo, la concentración intramolecular de calmodulina se duplica abruptamente en el límite G₁/S, en células de ovario de hamster chino y en células C127 de ratón. Este incremento se corresponde cronológicamente con la iniciación de la síntesis del DNA, lo que atribuye un papel a la calmodulina en el límite G₁/S. Rasmussen y Means (38) han expresado un minigén de la calmodulina de pollo en células C127 de ratón, utilizando como vector de expresión el virus del papiloma bovino (BPV). Una simple elevación en la concentración intracelular de

calmodulina, produce una aceleración del ciclo celular, debido al acortamiento de la fase G₁. Un estudio muy reciente de estos mismos autores (39) ha examinado las consecuencias de incrementos o disminuciones transitorias en las concentraciones de calmodulina intracelular, sobre la progresión del ciclo celular. Para ello han utilizado dos virus de papiloma bovino como vectores de expresión capaces de inducir la expresión del sense o antisense RNA de este receptor en líneas celulares de ratón C127 transformadas. En ambos vectores, sense y antisense, de la calmodulina la transcripción está regulada por un promotor de la metalotioneína inducible por Zn²⁺. Los resultados obtenidos por estos autores muestran que la progresión del ciclo celular se encuentra afectada por cambios transitorios en la concentración de calmodulina.

RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y ONCOGENES

1.- Tirosina Proteína Quinasas

Entre los receptores de factores de crecimiento de la membrana plasmática mejor caracterizados, se encuentran los miembros de la familia de proto-oncogenes tirosina-proteína-quinasas. Este grupo comprende el receptor EGF (*v-erbB*), el receptor del factor estimulador de colonias de macrófagos (CSF-1) (*v-fms*) y el receptor de insulina, los cuales muestran de un 30 a un 40 % de identidad con el producto del oncogén *ros*. El receptor del PDGF parece que es otro miembro de esta familia, debido a la homología de la secuencia nucleotídica que lo codifica, pero hasta el momento no ha podido asociarse con un oncogén conocido (40).

Los oncogenes víricos de este grupo comparten una característica importante con el *v-src*. Comparados con sus homólogos proto-oncogenes todos tienen truncados los carboxilos terminales. La truncación del producto *v-src* relativa a la del *c-src*, elimina la tirosina 527 y produce una proteína transformante, la pp60v-*src*, que posee una actividad quinasa elevada. Es probable que los residuos tirosina, localizados en el extremo carboxílico de los miembros de este grupo de receptores, puedan ser también sitios importantes de fosforilación reguladores de la actividad quinasa. Algunos receptores de este grupo comparten otras características. Por ejemplo, el receptor EGF y el receptor insulina pertenecen a una familia de proteínas transmembrana que poseen una secuencia rica en cisteína, que se repite en su dominio extracelular de unión al ligando. Dos proteínas emparentadas lejanamente con esta familia son, el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), el cual no es una proteína quinasa y el precursor del EGF (pro-EGF), que puede ser también receptor para un ligando aún no identificado.

Ningún oncogén vírico se ha asociado con el receptor LDL, sin embargo, el oncogén *mos* del virus del sarcoma de Moloney murino se encuentra lejanamente emparentado con el pro-EGF.

Tanto *v-erbB* como el *v-ras* carecen de la mayoría de dominios extracelulares de unión al ligando, encontrados en los proto-oncogenes que los codifican, incluyendo las repeticiones ricas en cisteína. Por el contrario, el producto del gen *v-fms* retiene completo el dominio extracelular de unión al ligando, que comparte con el *c-fms* (el receptor GSF-1, que el mismo carece de secuencias ricas en cisteína) y está truncado sólo en su extremo carboxilo.

Receptor EGF y oncogenes *v-erb*

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) fue aislado de glándula submaxilar de ratón macho (1) y bastante después se descubrió su papel como mitógeno potente. La molécula activa del EGF es una cadena polipeptídica bien caracterizada de 53 aminoácidos, derivada de un precursor de mayor tamaño. Con análisis de hibridación "in situ" de secciones de ratón entero recién nacido se pudo observar que el mensaje EGF se expresa en una gran variedad de tejidos (21).

La proteína humana fue purificada a partir de orina, como urogastrona. Los túbulos distales del riñón expresan concentraciones elevadas de una forma no procesada de EGF, de peso molecular más elevado, que se considera como precursora de la urogastrona. El EGF tiene un gran poder mitogénico para muchos tipos de células y sus efectos sobre el crecimiento se potencian de manera notable por la insulina y el PDGF. Parece ser que los tumores no sintetizan el EGF, aunque si segregan un factor estrechamente conectado con el EGF, el factor transformante α (TGF- α).

El receptor EGF supuso el primer ejemplo que permitió establecer una conexión entre receptores de factores de crecimiento y oncogenes. En primer lugar se observó que los péptidos tripticos derivados del receptor EGF humano purificado, eran casi idénticos a la secuencia de aminoácidos predicha para la secuencia nucleotídica del DNA del oncogén *v-erbB* del virus de la eritroblastosis de aves (AEV). Cuando se realizó el clonaje del DNA complementario del EGF humano, pudo comprobarse que el gen *v-erbB* debía derivar del gen del receptor EGF de pollo (41).

El receptor EGF es una glicoproteína de 170 kD con actividad tirosina quinasa (3). Su autofosforilación se activa por unión con el EGF. Parece probable que la fosforilación de los residuos de tirosina en proteínas asociadas con la regulación del crecimiento, se encuentra de alguna manera involucrada en la respuesta mitogénica. La cadena polipeptídica del receptor EGF comprende dos

dominios; uno dentro y otro fuera de la célula. La mitad carboxilica interna de la proteína comparte una notable analogía con el dominio catalítico de la *src* tirosina-proteína quinasa. Dentro de esta región es donde el receptor EGF humano comparte más de un 90 % de homología con el producto del gen *v-erbB* de pollo. La proteína *v-erbB* es un análogo truncado, predominantemente citoplasmático, del receptor EGF (42).

Se sabe que la proteína glicosilada de 70 a 80 kD, codificada por el *v-erbB*, ha de encontrarse localizada en la membrana de la superficie de las células infectadas con dicho gen, con el objeto de mostrar un fenotipo transformado. Esto puede significar que la proteína *v-erbB* simula ser un receptor EGF activo y constitutivamente ocupado. En muchas células transformadas por virus, que codifican tirosina-proteína quinasa, existe una elevación obvia en la fosfotirosina total y se han identificado un número de proteínas fosfotirosina. En células transformadas con virus de la eritroblastosis de aves, sin embargo, existe sólo una débil elevación del contenido de fosfotirosina (42).

A pesar de que ya se han identificado los sustratos mitogénicos del *v-erbB* y otros similares a la *src*-tirosina quinasa, es difícil saber si la menor actividad encontrada en células transformadas con el AEV es suficiente para generar el fenotipo transformado. Otro tema confuso está en el descubrimiento de que los eritroblastos, el objetivo usual para el virus AEV, no poseen normalmente receptores EGF. Quizás otros factores de crecimiento, como la interleuquina-2 o la eritropoyetina, tienen actividad tirosina quinasa que reemplaza la de la proteína *v-erb* (42).

El nivel de expresión de *c-erbB* es bajo en muchos tejidos y el producto de su transcripción no aparece en muchos tumores a pesar del hecho de que los receptores EGF se encuentran en muchos tipos de tejidos. Sin embargo, un tumor ocasional expresa elevados niveles de receptores EGF. Por ejemplo, algunas líneas celulares de carcinoma de células escamosas de tumores de cabeza y cuello tienen entre 1×10^4 - 15×10^4 receptores/célula y la línea celular de carcinoma epidermoide A-431 utilizada para el clonaje del receptor EGF, tiene 3×10^4 - 5×10^4 receptores/célula comparado con los 1.5×10^5 /célula epidérmica normal (43).

Se ha demostrado también que los glioblastomas tienen un gran número de receptores EGF. Este número elevado de receptores EGF puede encontrar explicación, al menos, en dos mecanismos: la translocación cromosómica y la amplificación genética. Estudios citogenéticos con células A-431 muestran la translocación del cromosoma 7. El gen *c-erbB* se localiza en el cromosoma humano 7, región 7 p11-p13, y es posible que se active por esta translocación. Por otro lado, se ha encontrado, tanto en células A-431 como en líneas celulares de

carcinoma escamoso HN10 y HN5, una expresión muy elevada de los receptores EGF con amplificaciones genéticas de 20 a 50 veces (43).

El ejemplo más claro en el cual el receptor EGF está "transmodulado" por otras proteínas es en el que está implícita la proteína quinasa C. La mayoría de estos estudios de transmodulación han sido realizados en células intactas con un activador poderoso de esta quinasa, el promotor tumoral 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA). El tratamiento de las células con esta sustancia dio lugar a una notable disminución en la capacidad del receptor para unirse al EGF y en una atenuación de la actividad tirosina quinasa (44).

El receptor EGF contiene además de fosfotirosina cantidades significativas de fosfotreonina y fosfoserina. Las fosforilaciones en aminoácidos distintos que la tirosina, han de ser realizadas por otras proteínas quinasas del mismo receptor. La proteína quinasa C activada por el ester de forbol es capaz de fosforilar los residuos serina y treonina del receptor. Estas fosforilaciones pueden ser las responsables de la atenuación de las funciones del receptor EGF. Recientemente, se ha descrito el efecto del fenobarbital, otro promotor del crecimiento, sobre las funciones del receptor EGF en hepatocitos (45). En este caso, la disminución de las funciones del receptor EGF, es una respuesta común de los hepatocitos a los promotores tumorales. Sin embargo, esta respuesta puede estar mediada por una activación de la proteína quinasa C, dependiente del ester de forbol o por una vía sensible al fenobarbital e independiente de la proteína quinasa C.

Como la disminución de la expresión del receptor EGF está normalmente asociada a la hepatocarcinogénesis, es probable que la respuesta al fenobarbital refleje una interacción en una vía intracelular relacionada con la modulación de la expresión del receptor EGF (46).

Oncogenes relacionados con el *erbB*, *neu* y *erbB-2*

Los neuroglioblastomas inducidos en útero de rata por exposición a etilnitrosourea contienen a menudo un oncogén que puede detectarse por transfección en células NIH 3T3. Este oncogén, denominado *neu*, se ha encontrado más relacionado con el *c-erbB*, que con otros miembros de la familia de oncogenes relativos a las tirosina quinasas. El oncogén *neu* codifica un antígeno tumoral, p185, que se relaciona serológicamente con el receptor EGF y se encuentra en la superficie de los neuroblastomas inducidos de rata. Más del 50 % de los aminoácidos codificados por el oncogén *neu* están compartidos con el receptor EGF y el 80% de la homología se encuentra en el dominio de la tirosina quinasa. El oncogén *neu*, pero no su proto-oncogén normal, produce focos transformados cuando se transfecta en células NIH 3T3 (47).

La comparación estructural entre los genes *neu* normal y transformado no reveló grandes reordenamientos y pudo observarse que se expresan cantidades parecidas de p185, tanto en líneas celulares transformadas como en no transformadas. Por ello se piensa que la alteración responsable de la activación del gen *neu* es el resultado de la sustitución de un solo aminoácido (48).

La construcción de recombinantes "in vitro" entre los genes normales y los transformantes dio como resultado el descubrimiento de una sola mutación responsable de la activación del proto-oncogen *neu*. El DNA procedente de cuatro líneas celulares que contenían oncogenes *neu* activados independientemente, presentaban una única mutación puntual en el dominio transmembrana de la molécula. Esta mutación cambiaría la valina por el glutámico en ese lugar.

El oncogén *neu* puede ser activado por exposición de animales a un agente alquilante como la metilnitrosoamina. Unas ratas *B6/N*, que se trataron con metilnitrosourea, mostraron que una gran parte de los tumores que desarrollaron contenían oncogenes *H-ras* activados por transiciones G a A. El gen *neu* se activa por transversiones T a A. Aunque los carcinógenos causan amplias lesiones en el DNA celular, es muy notable la especificidad de los cambios que conducen a la activación de estos oncogenes. El gen *neu* humano, denominado *c-erbB-2*, se localiza en el cromosoma 17 p11-q21 (la posición en el mapa del *c-erbB-1* humano se localiza también). Esta banda cromosómica se encuentra a menudo asociada con una translocación recíproca, no fortuita, t(15;17)(q22;q21) en la leucemia promielocítica. El gen humano *c-erbB-2* codifica una proteína de 138 kD con una topología transmembrana similar a la del receptor EGF (31). Es posible que este gen codifique un receptor de factor de crecimiento aún por descubrir (49).

El gen *c-erbB-2* se ha encontrado amplificado en varios casos de adenocarcinomas humanos, uno de origen salivar, otro mamario y también en una línea celular MKN-7 de cáncer gástrico. La amplificación del *erbB-2* en carcinomas mamarios humanos se relaciona con la agresividad tumoral y con una peor prognosis. Schechter y colaboradores sugieren que los anticuerpos que reconocen al *neu-erbB-2* pueden revertir "in vitro" el fenotipo de las células portadoras de este oncogén (50).

Receptor Macrófago CSF-1 y proto-oncogén *c-fos*

El factor estimulador de colonias de macrófagos (CSF-1) señala a las células hematopoyéticas precursoras de colonias que contienen predominantemente fagocitos mononucleares. CSF-1 es un factor específico de una línea celular, en contraste con el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) y la interleuquina 3 (CSF de múltiples líneas celulares), que inducen también la proliferación de fagocitos mononucleares. El CSF-1 es una molécula ácida

glicosilada compuesta de dos cadenas polipeptídicas de unos 14 kD con puentes disulfuro. Se une específicamente a fagocitos mononucleares y a sus precursores, sin tener en cuenta su tejido de origen ni su grado de maduración (51). El gen *v-fms* es el gen transformante de la cepa MacDonough del virus del sarcoma felino (SM-FeSV), y pertenece a la familia de oncogenes relacionados con el *src*, cuyas proteínas tienen actividad tirosina quinasa específica. La proteína transformante de este virus es una proteína de fusión *gag-*onc**, gp 180 *gag-fms*. El mismo *v-fms* codifica una glicoproteína transmembrana de 140 kD. La expresión de esta proteína en la superficie celular es necesaria para la transformación celular (52).

El producto del proto-oncogén *c-fms* felino es una glicoproteína con actividad tirosina quinasa asociada (47), que se expresa en macrófagos maduros de gato procedentes de exudados inflamatorios peritoneales y tejido esplénico. El receptor del factor estimulador de colonias murino se expresa también sobre fagocitos mononucleares y es una glicoproteína de 165 kD con actividad tirosina quinasa asociada. El antisuero de conejo, frente a un polipéptido recombinante codificado por *v-fms* precipita el producto *c-fms* felino y reacciona específicamente con la glicoproteína de 165 kD de macrófagos de ratón. Estos resultados hacen suponer que el gen *c-fms* codifica para el receptor normal CSF-1.

Ha sido ya determinada la secuencia nucleotídica completa del gen *c-fms* humano. La proteína *c-fms* consta de 972 aminoácidos y posee un dominio extracelular, una región que atraviesa la membrana y un dominio citoplasmático tirosina quinasa. La proteína *c-fms* de macrófagos se encuentra fosforilada en los residuos de tirosina después de la adición de CSF-1. El residuo tirosina en posición 969 de la proteína *c-fms*, similar al de la tirosina en posición 1.173 del receptor EGF, es el sitio principal de autofosforilación inducida por el ligando. El gen *c-fms* se activa por truncación del extremo amino de su proteína de forma similar al gen *c-erbB*; sin embargo, la proteína truncada retiene su capacidad de unirse al CSF-1. El gen receptor CSF-1 ha sido localizado en el cromosoma humano 5q. A pesar de que no parecen existir asociaciones directas con la malignidad, a esta región 5q se le atribuyen neoplasmas hematológicos. Así, el síndrome 5q⁻, en el cual se ha suprimido el brazo largo del cromosoma 5, se caracteriza por una displasia mielóide y una tendencia a desarrollar leucemia mielóide (52).

Receptor de insulina humano y oncogén *v-ras*

Los efectos metabólicos de la insulina están mediados por su elevada afinidad de enlace a los receptores específicos de la superficie celular. El receptor de la insulina es una glicoproteína integrante de la membrana, compuesta por dos

subunidades α (Mr 120.000 - 130.000) y dos subunidades β (Mr 90.000), unidas por puentes disulfuro. Debido a la fotoafinidad marcadora del receptor, se cree que la insulina se enlaza a la subunidad α , la cual contiene una región rica en residuos de cisteína, similar a la presente en los dominios de unión del ligando del receptor EGF y del receptor LDL. La unión de la insulina con el receptor estimula la autofosforilación de la subunidad β en los residuos serina o treonina. La subunidad β comparte una homología estructural con el receptor EGF y la familia *src* de tirosina quinasas (55).

Existe un gen que codifica el receptor de la insulina en el genoma haploide humano, que se conserva en células de vertebrados e invertebrados, mientras que en diversas células se generan múltiples transcritos de RNA correspondientes a este gen, cuya significación se desconoce. Está claro que las subunidades α y β del receptor derivan de un polipéptido precursor único de unos 190.000 daltons, que sufre una proteólisis antes de insertarse en la membrana (56).

Es probable que el producto del oncogén *v-ros* transformado por el retrovirus UR2 sea un receptor truncado de insulina de las aves. Este oncogén comparte un 73 % de identidad con el receptor de insulina humano en el dominio de tirosina proteína quinasa. El receptor de insulina comparte homología estructural con el receptor IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina), pero se encuentra lejanamente relacionado con otros receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa. Queda por ver, como los receptores de insulina señalizan a las células para producir efectos pleiotrópicos que tiene lugar con la unión del ligando (57).

Factor de crecimiento pro-epidérmico (pro-EGF) y oncogén *mos*

El oncogén *mos* es el gen transformante del virus del sarcoma murino Moloney (mo-MSV), un virus defectivo que surge a partir de un sarcoma fortuito en un ratón infectado con el virus de la leucemia murina de Moloney. El análisis del gen *v-mos* del MSV reveló que difiere de su homólogo normal *c-mos* en muchas posiciones (25 diferencias en las bases de 1.157 nucleótidos). Este hallazgo hizo pensar que la activación del *c-mos* en un oncogén, requiere cambios específicos estructurales en el producto genético, tales como mutaciones puntuales que activan al *c-ras*. Sin embargo, en células de ratón se ha puesto de manifiesto la activación insercional de la expresión *c-mos*, lo que indica que los cambios en la expresión genética son suficientes para dar cuenta de su potencial transformante. El análisis de la localización del gen *mos* en una serie de plasmacitomas de ratón ha revelado un método nuevo de activación de oncogenes. En estas células se ha conseguido integrar, en la secuencia codificadora del *c-mos*, un elemento endógeno a modo de virus, referido como una partícula intracisternal A (IAP). Esto ha dado lugar a una pequeña truncación de

la secuencia codificadora del *c-mos* en el extremo amino y posiblemente a una regulación alterada de las restantes secuencias genéticas (58). La búsqueda de fenómenos parecidos en células humanas similares ha sido infructuosa y no ha revelado alteraciones en la localización del *c-mos*. El *c-mos* humano, al contrario que su homólogo murino, no puede ser activado para convertirse en un gen transformante mediante, la manipulación "in vitro" de secuencias que gobiernan la expresión. Aunque no se conoce aún, si este oncogén ejerce algún papel en el cáncer humano, se sabe que las células humanas son susceptibles de ser transformadas por el *v-mos* murino en vectores de expresión apropiados (58).

El gen *v-mos* procedente del virus del sarcoma murino (MSV), induce la formación "in vivo" de fibrosarcomas y transforma "in vitro" la línea celular NIH 3T3. El oncogén *mos* codifica una proteína de 37 kD que se encuentra en células transformadas en un número pequeño de copias. Pruebas evidentes sugieren que el oncogén *mos* comparte secuencias con pro-EGF. El EGF se sintetiza como parte de un precursor de mayor tamaño que abarca la membrana celular. La molécula pro-EGF comparte muchas similitudes con el receptor EGF. Ambas moléculas son glicoproteínas ligadas a membrana de unos 1.200 aminoácidos con duplicaciones extensas en sus dominios extracelulares (58).

El receptor LDL comparte el 38% de sus secuencias con la molécula pro-EGF, pero no con el producto del *c-mos*. Por el contrario, la proteína quinasa dependiente del cAMP y el gen que controla la división celular, en levadura, comparten el 21 y el 22% de su identidad, respectivamente; con el gen *c-mos*, pero no con la molécula pro-EGF. Así que un gran número de receptores de la superficie celular y moléculas reguladoras presentan un parentesco lejano debido a que, pueden quizás compartir antepasados comunes.

Parece ser que la proteína codificada por el oncogén *mos* no es una proteína quinasa. La mayor parte de las secuencias de *mos*, compartidas con pro-EGF y de las de pro-EGF con el receptor EGF (una tirosina quinasa conocida), se encuentran en los dominios externos, mientras que las células infectadas con el Mo-MSV no contienen niveles elevados de fosfotirosina. La proteína *mos* fosforila probablemente serina y treonina, como la quinasa dependiente del cAMP, con la cual comparte secuencias. En apoyo a esta idea se demostró que p37 *mos* poseía actividad serina quinasa. El objetivo de p37 *mos* puede ser una proteína nuclear, la p55. Una mínima fosforilación de p55 puede dar lugar a la transformación celular y una mayor fosforilación conduciría, aparentemente, a la muerte celular. El gen *c-mos* se expresa en cantidades relativamente elevadas en gónadas de murinos y parece que se regula durante la diferenciación de las células germinales. A las tres semanas del nacimiento pueden detectarse en ratón concentraciones bajas del RNA transcrito de 1,7 kb del gen *c-mos*, pero más

tarde las concentraciones del transcrito de este gen se elevan de 10 a 100 veces hasta alcanzar a las cinco semanas valores propios de adulto. Es interesante observar que los transcritos de 4,7 kb del gen *abl* en testículos, muestran unas cinéticas similares. Los transcritos del gen *mos* se encuentran predominantemente en las células germinales pre y post meióticas. Transcritos de diferente tamaño se encuentran en ovario (1,4 kb) y embrión (1,3 kb) de ratón. Transcritos del *c-mos* humano de unos 1,0 kb se han detectado en tejido testicular (58).

El proto-oncogén *c-mos* humano se localiza en el cromosoma 8 en la banda q22. La reorganización cromosómica t(8:21)(q22;q22) se asocia con la leucemia mieloblástica aguda subgrupo M2. Es interesante observar que el gen *c-mos* permanece en el cromosoma 8q y que el gen *c-myc*, que se encuentra en el brazo 8q24, se transloca al cromosoma 21q2. Utilizando el análisis Southern blot, no se ha detectado ninguna reorganización del gen *c-mos* (59).

Receptores de hormonas tiroideas y proto-oncogen *c-erbA*

El virus de la eritroblastosis de las aves contiene dos oncogenes víricos cada uno de los cuales tiene un homólogo celular normal. El gen *c-erbB* se relaciona con el proto-oncogén celular que codifica el receptor EGF. El gen humano *c-erbA* codifica una proteína de 456 aminoácidos que se une específicamente y con gran afinidad a hormonas tiroideas. Al igual que los receptores de estrógenos y glucocorticoides, este gen comprende una serie de dominios funcionales. Los extremos carboxilos de estas moléculas comparten el 17% de identidad y son responsables de la unión con las hormonas. La porción media de las moléculas se encuentra más conservada (un 50% de identidad) y comprende una región rica en cisteína con similitud estructural a diversas proteínas transcripcionalmente reguladoras. Esta región, con el extremo amino, media la unión específica al DNA y la activación transcripcional de genes responsables de las hormonas. La proteína *v-erbA* se localiza en el núcleo y se une al DNA. El oncogén vírico comprende una secuencia *v-erbA* truncada fusionada al gen *gag*. La proteína de fusión, 75gag *v-erbA*, no presenta capacidad detectable de unión a hormonas y probablemente actúa como una hormona tiroidea constitutivamente activa. Al igual que las mismas hormonas tiroideas, que juegan un papel modulador en la oncogénesis humana y animal, el gen *v-erbA* promueve aparentemente la transformación. Este oncogén tiene una capacidad pobre para transformar las células por sí mismo, pero funciona sinérgicamente con el *v-erbB* y otros oncogenes.

Como la proteína *v-erbB* carece de la porción reguladora transcripcional del gen *c-erbA*, no parece probable que actúe estimulando una transcripción

desbocada. Más bien, debe actuar de manera análoga a cada uno de los dos mutantes conocidos de los receptores de los glucocorticoides. Si el gen *c-erbA* actúa promoviendo la diferenciación de las células eritroides, una proteína *v-erbA* defectiva puede competir por los lugares de enlace en el DNA y perturbar las señales de diferenciación transducidas por *c-erbA* (60).

OTROS FACTORES RELACIONADOS CON LA PROLIFERACION CELULAR

Factor transformante del crecimiento α (TGF- α)-

Este factor transformante del crecimiento es un polipéptido segregado que fue descubierto en el medio de ciertos fibroblastos transformados por virus (4). Su denominación tiene su origen en la observación de que las preparaciones del polipéptido, que ahora se sabe que eran impuras, eran capaces de transformar de manera reversible a fibroblastos inmortalizados de riñón de rata normal.

El TGF- α está formado por una sola cadena polipeptídica de 50 aminoácidos y 5,6 kd. Fue identificada al principio como factor de crecimiento del sarcoma, pero más tarde se vio que compartía la identidad con el EGF (35% de aminoácidos y conserva todos los residuos de cisteína) y que se unía al receptor sobre bases equimoleculares con el EGF purificado. El TGF- α se ha encontrado en una variedad de células transformadas y en tejidos fetales. Este factor puede jugar un papel en la patogénesis neoplásica por activación autocrina de células con receptores EGF (61).

Las investigaciones realizadas sobre este factor le atribuyen un papel como activador poderoso de la angiogénesis, lo cual es importante en procesos de cicatrización, luteinización neovascularización y crecimiento de tumores sólidos. Algunos agentes como la heparina, el cobre y las prostaglandinas del tipo E, promueven la migración de las células inflamatorias y endoteliales. Otros factores tales como los péptidos que se unen a la heparina, los factores de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento endoteliales, los factores de angiogénesis y el TGF- α tienen posiblemente un efecto mitogénico directo sobre las células del soporte capilar (61).

Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β)

Al contrario que el TGF- α , que comparte muchas propiedades con el EGF, el TGF- β difiere en sus características de los factores de crecimiento hasta ahora conocidos. Dependiendo del tipo celular, el TGF- β puede presentar efectos activadores o inhibidores del crecimiento. Su acción depende, a menudo, de otros factores mitogénicos presentes en el medio tisular, lo que hace pensar que

se trata de un factor permisivo que determina como han de responder las células a otros factores de crecimiento (62).

El TGF- β es un péptido multifuncional regulador de la actividad celular, compuesto por dos cadenas polipeptídicas idénticas de 112 aminoácidos conectadas por puentes disulfuro. Estos polipéptidos derivan de un precursor de mayor tamaño (391 aminoácidos) que procede de un mRNA de 2,5 kb. Este transcrito se ha encontrado en una gran variedad de células normales y transformadas y la proteína derivada, se ha detectado en hígado normal, pulmón, corazón, cerebro y riñón, así como también en embriones y placenta. La activación mitogénica de los linfocitos de la sangre humana periférica, origina una elevación en la liberación del TGF- β . Diversas células en cultivo producen y responden al TGF- β , aunque no proliferan fuera de control, porque este factor de crecimiento se libera, en parte, en forma inactiva (63).

El TGF- β presenta actividad mitogénica frente a una variedad de tipos celulares fibroblásticos en cultivos tisulares. En alguna de estas células la acción del TGF β está mediada a través del PDGF, ya que la unión con el TGF β puede conducir a la expresión del gen *c-sis*. En algunos casos el TGF β puede mostrar un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. Por ejemplo, el crecimiento neoplásico de una variedad de células epiteliales transformadas se inhibe por el TGF β . Así, en medio exento de suero, el TGF β frena el crecimiento de proqueratinocitos humanos normales, mientras que no inhibe el crecimiento de ciertas líneas de carcinoma escamoso en idénticas condiciones. La pérdida de efectos inhibitorios del crecimiento del TGF- β pudiera contribuir a la transformación de algunos tipos de células. Esta situación puede estar originada por mutación o por disfunción de los genes que codifican el TGF- β o su receptor (64).

Un efecto notable del TGF- β es que estimula el crecimiento de fibroblastos independientemente de su anclaje. Este efecto, que sirve como base para la purificación de este péptido, puede observarse cuando el TGF- β se encuentra actuando en solitario o en asociación con el EGF o el TGF- α , según el tipo celular estudiado. Otro papel importante de este factor es su efecto sobre la diferenciación de una serie de tipos celulares. Así, por un lado previene la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y de los linfocitos B y T, mientras que, por otro lado, activa la diferenciación fenotípica de los condroblastos (65).

Hasta el momento, el receptor TGF- β no ha sido tan estudiado como el EGF o el PDGF. En una serie de tipos celulares epiteliales y mesenquimatosos se han encontrado un número muy bajo de receptores (10.000-40.000/célula) de elevada afinidad (25 - 40 pM). El receptor humano TGF- β es una glicoproteína dímera con un Mr de 615 kd. A pesar de las atractivas sugerencias emitidas acerca de la

conexión del TGF- β con la regulación del crecimiento, no se han establecido, hasta el momento correlaciones específicas entre este factor o su receptor y los oncogenes conocidos.

Interleuquina-2. Factor de crecimiento de células T

El tratamiento de células T de sangre periférica humana con una serie de mitógenos incluyendo las lectinas de plantas, tales como la concanavalina A y la fitohemaglutinina A, promueve la proliferación de estas células y la liberación de una serie de "interleuquinas", moléculas que suministran señales para la amplificación o inhibición de la respuesta inmunoinflamatoria. Uno de estos factores, la interleuquina-2 (IL-2), fue denominada en un principio "factor de crecimiento de células T", debido a que mantenía durante largo tiempo el crecimiento "in vitro" de los linfocitos T normales citotóxicos.

La IL-2 segregada, es una glicoproteína de 133 residuos de aminoácidos con un puente disulfuro interno. Aunque la IL-2 se creyó en un principio que se trataba de un factor de crecimiento específico de las células T, se sabe ahora que sus receptores pueden encontrarse también en células B, macrófagos y células endoteliales. Este factor puede ser un medio que tienen las células T para relacionarse con otras células también involucradas en la regulación del entramado inmunorregulatorio: La activación de las células T y B se lleva a cabo mediante una jerarquía de señales. Los receptores de la IL-2 no aparecen en células quiescentes, ya que la expresión de los receptores funcionales requiere la previa unión de un antígeno o mitógeno a las células. La señal más específica, la unión al antígeno, desencadena la liberación del IL-2 sólo en los miembros de una población clonal (66)

El proceso de activación celular conduce a la expresión de receptores en los factores de crecimiento, tanto generales como específicos. Un ejemplo de los primeros son los receptores de la transferrina y de los segundos los factores que promueven la diferenciación final de las células B en células plasmáticas, incluyendo factores de crecimiento y diferenciación específicos para estas células. La IL-2 puede funcionar como un factor de crecimiento autocrino o paracrino para las células T. El hecho de que las células T normales puedan ser llevadas a proliferar durante períodos largos de tiempo en presencia de IL-2 y antígenos, hace pensar que las mutaciones en el gen IL-2 o su receptor, pueden estar asociadas con procesos de malignidad en las células T. La transición G1/S en los linfocitos T humanos requiere la presencia de una proteína nuclear codificada por el oncogén *c-myc* (67). El gen *tat* del virus I de la leucemia de células T humanas promueve el incremento de la expresión de IL-2 y su receptor. Probablemente, esta mayor expresión proporciona a las células infectadas una ventaja en el crecimiento. Se ha formulado la hipótesis de que tales células con

crecimiento autónomo pueden sufrir cambios somático-genómicos posteriores que podrían conducir, eventualmente, a un fenotipo verdaderamente transformado de células T de linfoma/leucemia en adulto. Aunque los receptores de la superficie celular de los linfocitos normales y los transformados son algo diferentes en tamaño (55 y 60 kD, respectivamente), no está claro el significado de esta diferencia. Se han identificado hasta el momento diversos transcritos del receptor IL-2, pero no se ha encontrado ninguna asociación que relacione, con los linfomas, los mensajes procesados de manera anormal. Así, a pesar del reconocimiento del papel potencial de la IL-2 y su receptor en los procesos malignos de los linfocitos, no se sabe, hasta el momento, nada referente a reorganizaciones genéticas o cambios en estos genes (61).

Factor de necrosis tumoral (TNF)/caquectina

El factor TNF/caquectina es una molécula con una doble historia. Por un lado se descubrió como caquectina, proteína derivada de los macrófagos como resultado de la búsqueda, en procesos patogénicos, de algún factor que interviniera en el desgaste de las enfermedades crónicas. Por otro lado, fue descubierta como "Factor necrótico tumoral" (TNF), en un intento de estudiar las necrosis hemorrágicas de los tumores, que pueden aparecer, como resultado de infecciones bacterianas agudas. Este factor aparece en el suero de animales afectados por un proceso inflamatorio en la fase aguda, es citotóxico frente a algunas líneas celulares tumorales "in vitro" y causa la necrosis de ciertos tumores "in vivo" (68, 69). El TNF fue aislado originalmente, como una sustancia tumoricida. Es una proteína, derivada de macrófagos monocitos, citotóxica y citostática para algunas células transformadas, mientras que las líneas celulares no transformadas son resistentes a esta acción. El TNF se supone que se une a su receptor específico sobre la superficie de células tumorales y sufre la internalización. Diversas líneas celulares tumorales mostraron diferentes sensibilidades al TNF. La presencia de receptores TNF parece que es un requisito necesario para explicar la sensibilidad a los efectos citotóxicos del TNF. Sin embargo, la presencia de tales receptores, parece que no es suficiente para explicar la diferente sensibilidad a este factor, ya que algunas líneas de células tumorales con sitios de unión de elevada afinidad por el TNF, son todavía resistentes a su acción citotóxica. Se ha propuesto que el TNF induce tanto la forma apoptótica como la necrótica de lisis celular (70, 71).

El mecanismo de citotoxicidad para el TNF no está aún claro, pero parece que está mediado, en parte, por la inducción de radicales superóxidos tóxicos. Así, se ha sugerido, que la sensibilidad celular al TNF está relacionada con enzimas antioxidantes tales como la catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa. Estudios recientes de Masuda y cols. (72), muestran la

inducción de la superóxido dismutasa mitocondrial, dependiente del manganeso, por efecto de la interleuquina-1, en células de melanoma humano. El TNF- α induce la síntesis del mRNA correspondiente a la superóxido dismutasa mitocondrial en diversas líneas celulares. En un trabajo aún más reciente, Asoh y cols (73) han aislado una línea celular, de carcinoma mamario humano MCF-7, sensible al TNF, y han comprobado la inducción de la SOD entre la MCF-7 y su variante resistente al TNF. La resistencia al TNF se debe, no a un menor número de receptores, sino a una menor afinidad. El TNF α indujo a una síntesis más elevada, de la SOD mitocondrial, en las células sensibles que en las resistentes, por lo cual estos autores concluyen, que la expresión de esta enzima es una característica de las células sensibles al TNF y que la adquisición de resistencia afecta a esta característica.

PAPEL DE LAS PROTEINAS G EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES Y HOMOLOGIA FUNCIONAL CON LAS PROTEINAS ras

Proteínas G

Las proteínas G comprenden una familia de proteínas asociadas a membrana que transducen señales extracelulares. Todas estas proteínas se unen e hidrolizan al GTP, y es este GTP el que regula alternativamente sus interacciones con detectores de señales (receptores de la superficie celular) y efectores (enzimas asociados a membrana y canales iónicos). Cada proteína G utiliza un mecanismo común dependiente del GTP, para transducir señales entre series únicas de elementos detectores y efectores (74). Los miembros mejor caracterizados de la familia de proteínas G incluyen las transducinas (T_1 y T_2), G_s y G_i . La proteína T_1 , de transducción visual, acopla la fotorodopsina a una cGMP fosfodiesterasa (75). La G_s y la G_i estimulan e inhiben, respectivamente, la adenilato ciclasa en respuesta a la activación de diferentes series de receptores de hormonas. Las proteínas G_i o similares a las G_i , regulan la actividad de la fosfolipasa C en neutrófilos

Todas las proteínas G son heterodímeros. Las subunidades α se unen e hidrolizan al GTP e interaccionan con los elementos efectores. Se distinguen por sus pesos moleculares y sus diferentes susceptibilidades a la ADP-ribosilación por exotoxinas bacterianas, toxina del cólera y toxina pertusis. Las secuencias primarias de la subunidad α de T_1 , T_2 , G_s y G_i se han deducido de sus correspondientes secuencias del cDNA. La comparación de secuencias revela una gran homología en las regiones que participan en la unión e hidrólisis al GTP.

Las subunidades β y γ de las proteínas G, inseparables en estado nativo, funcionan como una subunidad β - γ que sujeta a la membrana plasmática a la subunidad α , más hidrofílica.

La investigación de la activación lumínica de la fosfodiesterasa o de la regulación hormonal de la adenilato ciclasa, proporciona un esquema general para conocer la función de las proteínas G en la transducción de señales. La activación del elemento detector (por luz u hormonas), promueve la unión del detector a α - β - γ y acelera notablemente la velocidad de cambio GTP - GDP. La unión con GTP da lugar a la disociación de α - β - γ y el detector. El complejo α -GTP se une entonces y activa a un enzima efector. La activación del efector finaliza cuando se hidroliza el GTP. El ciclo continúa hasta que el detector activado se inactiva.

La ADP-ribosilación, catalizada por toxina, de la subunidad α de las proteínas G altera específicamente su función. La toxina del cólera ADP-ribosila preferentemente α -s y α -T₁ cuando se encuentran en el estado de unión al GTP. Una vez modificadas las subunidades α se estabilizan en la conformación GTP. El tratamiento con la toxina del cólera de α -s y α -T₁ induce a una activación persistente del efector. Por el contrario, la toxina pertusis ADP-ribosila preferentemente la forma α - β ligada al GDP de la proteína G_i y T₁. El tratamiento con toxina pertusis interrumpe la transducción de señales previniendo al heterodímero de unirse al detector activado (76).

Proteínas ras

Permanece incierto, hasta el momento, el papel que juegan a nivel bioquímico los genes *ras* en células normales y tumorales. A pesar de ello, se conocen algunas propiedades bioquímicas de las proteínas que estos genes codifican.

En primer lugar, la proteína p21 extraída de células de mamíferos se une covalentemente al ácido palmítico y esta unión parece que sirve para sujetarla a la superficie interna de la membrana plasmática. En segundo lugar, se ha descubierto que la proteína p21 es capaz de unirse al GTP o al GDP con elevada afinidad, siendo incapaz de unirse a otros nucleótidos como el GMP o el ATP (77).

La expresión en bacterias de la proteína p21 humana normal ha permitido obtener cantidades suficientes de esta proteína para el análisis y caracterización de sus propiedades bioquímicas. De esta manera se ha llegado a saber que esta proteína presenta actividad GTPasa que cataliza, por hidrólisis lenta, la conversión del GTP en GDP que permanece unido a la proteína p21. La confirmación de estos resultados ha hecho pensar que la proteína p21 se encuentra relacionada

con la familia de las proteínas G. Se ha encontrado también un déficit de actividad GTPasa en el mutante oncogénico de la proteína p21 (valina 12 del *H-ras*). Esta diferencia bioquímica entre la p21 normal y la p21 mutante es interesante para explicar de que manera las mutaciones pueden activar las proteínas (78).

Se ha desarrollado un modelo basado en estos descubrimientos y en la analogía de las proteínas p21 con las proteínas G, que actúan como segundos mensajeros en la transmisión de señales, desde los receptores activados, hasta los enzimas reguladores. Por ejemplo, la activación del receptor β -adrenérgico conduce a la unión del GTP a la subunidad α . Esta subunidad (el análogo *ras*) se disocia entonces de los otros componentes del receptor y activa la adenilato ciclasa, el enzima que cataliza la síntesis del cAMP. Como la proteína G, posee también actividad GTPasa endógena, que convierte al GTP en GDP y al igual que ella es inactiva en forma GDP y retorna al receptor para esperar a una nueva ronda de estímulos.

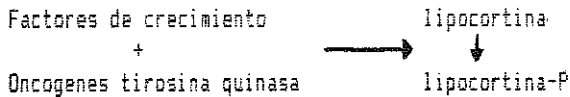
Los resultados obtenidos hasta el momento hacen pensar que la proteína p21 *N-ras* debe ser la proteína G que transduce las señales desde el receptor del factor de crecimiento a la cascada del fosfatidil inositol \longrightarrow segundos mensajeros.

En el caso de la proteína p21, mutante el GTP se convierte en GDP más lentamente, lo cual indica que puede permanecer en estado activo durante más tiempo y señalizar a la célula de manera que sufra una multiplicación inapropiada. Este modelo puede aplicarse también a la capacidad de la proteína p21 normal para transformar las células cuando se expresa a niveles elevados, los cuales proporcionan, simplemente un flujo mayor de la forma activa de la proteína p21, que es la forma unida al GTP. Con esto se conseguiría un nivel crítico de la forma GTP que daría lugar a un crecimiento celular por encima de lo normal. Estudios comparativos de la secuencia primaria de la proteína p21 con una proteína GDP/GTP, cuya estructura tridimensional se conoce parcialmente (79), ha conducido a un modelo para estudiar la estructura de p21. Este modelo presupone que p21 adopta diferentes conformaciones de acuerdo con la forma GTP o GDP. Este cambio conformacional se debe a la unión diferencial con un componente celular no diferenciado. La proteína p21 puede considerarse como un interruptor bioquímico en el cual la posición "encendido" sería la forma ligada al GTP y la posición "apagado" la ligada al GDP. La proteína se sitúa en posición de encendido cuando se recibe una señal externa en la superficie celular. El interruptor se desconecta a través de una GTPasa intrínseca que convierte al GTP en GDP. La forma oncogénica puede imaginarse como un interruptor estropeado en el que la función apagado está lesionada (que no se desconecta). La sustitución de algunos aminoácidos que activan la forma oncogénica de la p21 puede funcionar

ocasionando cambios conformacionales directos en la proteína, tal como si estuviera en forma activada. Con estos mutantes la actividad GTPasa no se encuentra sustancialmente disminuida si se compara con la inicial normal, pero la actividad de los mutantes no es efectiva en desconectar la función de la proteína.

Mediante la introducción de alteraciones en los genes *ras* humanos se ha observado que las sustituciones de los residuos 16, 115 ó 119 en las proteínas *ras*, redujeron sustancialmente la capacidad de las formas normal y activada de unirse e hidrolizar el GTP, aunque las mutaciones no disminuyen la capacidad de las proteínas activadas para transformar células rat-1. De todo ello se deduce que está todavía incompleta la hipótesis que adjudica a la proteína p21 un papel de interacción con los componentes celulares como parte de su sistema transductor señales.

El ácido fosfatídico es un poderoso factor mitogénico que puede actuar como factor de crecimiento (80). La actividad de la proteína p21 está controlada por el metabolismo de los fosfolípidos. Receptores tirosina quinasa fosforilan al inhibidor de la fosfolipasa, la lipocortina.

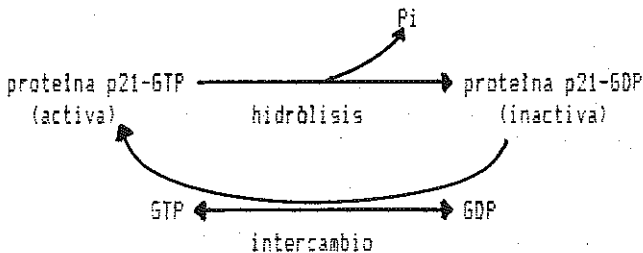


La capacidad de las proteínas *ras* para unirse al GTP/GDP fue descubierta por Scolnik y cols. en 1979 (74), quienes consideraron que estos nucleótidos controlaban la actividad de la proteína p21. Posteriores análisis en mutantes *ras* oncogénicos llegaron a sugerir que la hidrólisis del GTP o el intercambio GDP/GTP debían ser los responsables directos de la actividad transformante. Recientemente se ha demostrado que las proteínas *ras* están controladas por el GTP y el GDP. Las formas ligadas al GTP son activas mientras que las formas GDP son inactivas (78, 81, 82).

Con anticuerpos monoclonales anti-*ras* inyectados a células animales se ha llegado a la observación que las proteínas *ras* son necesarias para la activación de la síntesis del DNA y la proliferación celular y para la transformación celular mediante oncogenes tirosina quinasa. Se sabe que las proteínas *ras* se unen e hidrolizan al GTP de la misma manera que lo hacen las proteínas G, aunque las *ras* no se unen aparentemente a otras subunidades como lo hacen las subunidades de las proteínas G. Se ha propuesto que los receptores de los factores de crecimiento y los oncogenes relacionados emiten una señal

proliferativa que se transfiere al interior de la célula mediante las proteínas *ras*, de la misma manera que las proteínas G intervienen en la transmisión de señales desde una serie diferente de proteínas de enlace. También se ha observado en oocitos de *Xenopus* que las proteínas *ras* son necesarias para la maduración dependiente de la insulina. Todos estos resultados pueden interpretarse considerando que las proteínas *ras* representan una función que, aunque no alterada por los estímulos, es necesaria para su manifestación, y que las proteínas *ras* pueden activarse en respuesta a los estímulos, lo cual es esencial para la transmisión de señales. Es posible, que los factores séricos, los oncogenes tirosina quinasa y la insulina, antecedan a las proteínas *ras* en el mecanismo de transducción de señales y requieran la activación de estas proteínas para sus efectos. Los mecanismos mediante los cuales las señales generadas anteriormente activan las proteínas *ras* no se conocen, ya que no se ha demostrado aún la activación "in vitro". Posiblemente este proceso está asociado con un incremento en la proporción de proteína p21 unida a GTP en lugar de GDP. El mutante β -*ras* valina 12 lo consigue reduciendo la actividad GTPasa. Existen dos mecanismos mediante los cuales se eleva la actividad de las proteínas p21, uno que disminuye la actividad de la GTPasa y el otro que incrementa el intercambio GDP/GTP.

Se sabe que las proteínas G transductoras de señales, que comparten propiedades estructurales y bioquímicas con las proteínas *ras*, dependen estrictamente del intercambio GDP/GTP para su activación. En su estado de reposo las proteínas G existen en forma de complejos-GDP estables e inactivos que se convierten en forma de complejos-GTP activos en respuesta a una señal generada con anterioridad. La conversión hacia el estado inactivo se consigue mediante una hidrólisis:



En estas circunstancias la conversión del complejo - GDP, que depende del intercambio GDP/GTP, debe ser el paso limitante que controla este ciclo. Las proteínas p21 poseen actividad GTPasa intrínseca, pero esta actividad es muy débil e insuficiente para mantener la proteína p21 en el estado de complejo-GDP

en condiciones fisiológicas. Existe una proteína que activa la GTPasa a velocidades 100 veces superiores a la intrínseca. Esta proteína, activadora de la GTPasa (GAP), descrita por McCornick, (81), no tiene efecto sobre las proteínas p21 oncogénicas con mutaciones en las posiciones 12, 59 ò 61, por lo cual estas proteínas permanecen en su forma activa p21-GTP. Las proteínas ras mutantes, por tanto, escapan a la acción de la GAP. Como muchos de estos mutantes, poseen actividad GTPasa intrínseca varios órdenes de magnitud menor que la actividad del tipo normal inicial (salvaje). La GAP es una proteína de 120.000 daltons que ha sido purificada y clonada a partir de cerebro bovino y placenta.

CONSIDERACIONES FINALES

La proliferación celular en sus aspectos fisiológicos y moleculares ha sido cuidadosamente estudiada en los últimos años y está claro, que la inducción de la mitogénesis implica un número de cambios bioquímicos en la célula. Estos cambios pueden resumirse en alteraciones en el metabolismo de los fosfolípidos, en la estructura de la membrana, en el transporte iónico y pH intracelular y en el metabolismo energético. Todos estos y otros muchos factores se encuentran involucrados en la regulación de la división celular, aunque no está aún claro cuál de ellos es el desencadenante externo.

Para desencadenar la proliferación celular, la señal mitogénica iniciada en la superficie celular, tiene que alcanzar el núcleo y activar la expresión de genes específicos, cuyos productos son imprescindibles para la síntesis del DNA y la división celular. Los procesos de crecimiento y/o diferenciación se verifican mediante la coordinación de la expresión de una serie de genes y gran parte de esta coordinación tiene lugar en la fase de transcripción. El mecanismo mediante el cual se regula la transcripción puede realizarse, bien desde las secuencias del DNA que codifican la información reguladora (elementos cis-acting), o desde las moléculas que participan activando o inhibiendo la transcripción (elementos trans-acting).

El estricto control de la proliferación celular es un requerimiento esencial para la supervivencia de los organismos multicelulares. Hemos visto, que una variedad de factores, ejercen una influencia positiva o negativa sobre la división celular, pero la decisión última tiene una base molecular en el interior de una célula específica, después de la recepción de señales extracelulares que se transfieren al interior de la célula.

Las secuencias reguladoras de la transcripción, que se denominan promotoras,

se encuentran en lugares anteriores y cercanos a los genes que transcriben la polimerasa II. Un tipo de regulación transcripcional lo ejercen unos elementos denominados "enhancers", los cuales, en presencia de un promotor responsable, son capaces de acelerar la transcripción hasta 1000 veces.

Por otro lado, la amplificación genética se refiere a un incremento selectivo en el número de copias de un determinado gen, que da lugar, generalmente a una producción mayor de los productos codificados por el gen amplificado. La amplificación de proto-oncogenes aparece frecuentemente relacionada con la progresión maligna. Un concepto muy atractivo, aunque aún especulativo es el de los anti-oncogenes, la versión normal de alelos recesivos que predisponen al cáncer, y el de los genes supresores, que extinguen el fenotipo transformado en células somáticas híbridas entre normales y transformadas. Es posible que el fenotipo de las células tumorales esté determinado, al menos parcialmente, por la expresión relativa de oncogenes y anti-oncogenes/genes supresores.

En muchos casos la transformación es un resultado de aberraciones en la expresión genética. Por ejemplo, la excesiva expresión de un proto-oncogén puede conducir a la transformación. La falta de expresión de determinados genes celulares o la inactivación de sus productos, puede jugar un papel igual en el desarrollo del cáncer.

RECONOCIMIENTOS

Quiero agradecer y testimoniar la competente e inapreciable colaboración de *DOLORES VELASCO PEREZ* en la preparación de este manuscrito, así como la crítica del mismo por la Doctora *CARMEN CASCALES ANOSTO*

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cohen, S. (1962) Isolation of submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* 237, 1555-1562.
- 2.- Carpenter, G. y Cohen, S. (1979) Epidermal Growth Factor. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 193-216.
- 3.- Cohen, S., Urisho, H., Stoscheck, C. y Clinkers, M. (1982) A native 170.000 epidermal growth factor receptor-kinase in a A 431 cell membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 257, 1523-1531.
- 4.- De Larco, J.E. y Todaro, G.J. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75,4001-4005.
- 5.- Sporn, M.B. y Todaro, G.J. (1980) Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *New England J. Med.* 303, 878-880.
- 6.- Bravo, R. y Muller, R. (1986) Involvement of proto-oncogenes in growth control: The induction of *c-fos* and *c-myc* by growth factors. en: *Oncogenes and Growth Control* (ed. P. Khan y T. Graf) Springer Verlag Berlin Heidelberg. pp 251-258.
- 7.- Muller, R., Bravo, R., Barckhardt, J. y Aerran, T. (1989) Induction of *c-fos* gene on protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature* 312, 716-720.
- 8.- Huebner, R.J. y Todaro, G.J. (1969) Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 1087-1094
- 9.- Spector, D.H., Varmus, H.E. y Bishop. J.M. (1978) Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus present in the DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4102-4106.
- 10.- James, R. (1984) Polypeptide growth factors. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 259-292.

- 11.- Sporn, M.B. y Roberts, A.B. (1988) Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 332, 217-219.
- 12.- Sporn, M.B. y Roberts, A.B. (1986) Peptide growth factors and inflammation, tissue repair and cancer. *J. Clin. Invest.* 78, 329- 332.
- 13.- Heldin, C.H. y Westermark, B. (1984) Growth Factors: mechanism of action and relation to oncogenes. *Cell* 42, 849-857.
- 14.- Hunter, M.B. y Cooper, J.A. (1985) Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem* 54, 897-930.
- 15.- Gilman, A.G. (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36, 577-579.
- 16.- Ashall, F. y Puck, T.T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5145- 5149.
- 17.- Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.
- 18.- Berridge, M.J. (1988) Inositol Lipids and Cell Proliferation. en *Oncogenes and Growth Control*. (ed. P. Kahn y T. Graf), Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 147-153.
- 19.- Hokin, L.E. (1985) Receptors and phosphoinositide-generation second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 205-235.
- 20.- Heldin, C.H. y Westermark, B. (1988) Role of PDGF-Like Growth Factors in Autocrine Stimulation of Growth of Normal and Transformed Cells. en: *Oncogenes and Growth Control* (ed P. Kahn y T. Graf) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 43-50.
- 21.- Cuttitta, F., Carney, D.N., Mulshine, J., Moody, T.W., Fedorko, J., Fischler, A. y Minna, J.D. (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung *Nature* 316, 823-826.
- 22.- Schlessinger, J. (1988) Regulation of Cell Growth by EGF Receptor. en *Oncogenes and Growth Control*. (ed P. Kahn y T. Graf) Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 77-84.
- 23.- Sherr, C.J. y Stanley, E.R. (1988) The *c-fes* proto-oncogene and the CSF-1 receptor. en *Oncogenes and Growth Control* (ed. P. Khan y T. Graf) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 93-99.

- 24.- Downward, J., Parker, P.F. y Waterfield, M.D. (1984) Autophosphorilation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature*, 311, 483-485.
- 25.- Kris, R., Lax, I., Gullick, M., Waterfield, M., Ullrich, A., Fridkin, M., Schlessinger, J. Antibodies against a synthetic peptide as a probe for the kinase activity of the avian EGF receptor and *v-erbB* proteins. *Cell* 40, 619-625.
- 26.- Robbins, K.D., Devare, S.G. y Reddy, E.P. (1982) In vivo identification of the transforming gene product of simian sarcoma virus. *Science* 219, 1131-1133.
- 27.- Chiu, I.M., Reddy, E.P., Givol, D., Robbins, K.C., Tronick, S.R. y Aaronson, S.A. (1984) Nucleotide sequence analysis identified the human *c-sis* proto-oncogene as structural gene for platelet-derived growth factor. *Cell* 37, 123-129.
- 28.- Davis, R.J. y Czech, M.P. (1985) Platelet-derived growth factor mimics phorbol diester action on epidermal growth factor receptor phosphorylation at threonine-654. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4080-4084.
- 29.- Heldin, C.H., Johnson, A., Wennergren, S., Wernstadt, C., Betsholtz, C., y Westermark, B. (1986) A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature* 319, 511-513.
- 30.- Burk, K.B., Liu, E.T. y Larrick, J.W. (1988) *Oncogenes. An introduction to the concept of cancer genes. Growth Factors and Receptors.* Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 156-181.
- 31.- Bravo, R. y MacDonald-Bravo, H. (1986) The effect of pH on the induction of competence and progression to the S-phase in mouse fibroblasts. *FEBS Lett.* 195, 309-312.
- 32.- Aerts, R.J., Durston, A.J. y Moolenaar, W.H. (1985) Cytoplasmic pH and the regulation of *Dictyostelium* cell cycle. *Cell* 43, 653-657.
- 33.- Moolenaar, W.H. (1986) Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 48, 363-376.
- 34.- Moolenaar, W.H., Tertoolen, L.G.J. y de Laat, S.W. (1984) Phorbol esters and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmic pH. *Nature* 312, 371-374.

- 35.- Vara, F. y Rozengurt, E. (1985) Stimulation of Na⁺ /H⁺ antiport activity by EGF and insulin occurs without activation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 646-653.
- 36.- Lopez-Rivas, A., Mendoza, S.A., Nanberg, E., Sinnett-Smith, J. y Rozengurt, E. (1987). Ca²⁺ mobilizing actions of platelet-derived growth factor differ from those of bombesin and vasopresin in Swiss 3T3 mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5768-5772.
- 37.- Schatzman, R.C., Raynor, R.L. y Kuo, J.F. (1983) *Biochem. Biophys. Acta.* 755, 144-147.
- 38.- Rasmussen, C.D., Siamen, R.C.M., MacDougal, E.A. y Means, A.R. (1987) Methods for analyzing bovine papilloma virus-based calmodulin expression vectors. *Methods in Enzymol.* 139, 642-654.
- 39.- Rasmussen C.D. y Means, A.R. (1989) Calmodulin is required for cell cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J* 8, 73-82.
- 40.- Hunter, T. y Cooper, J.A. (1985) Protein Tyrosine Kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 897-930.
- 41.- Lin, C.R., Chen, W.S. y Kruijer, W. (1984) Expression cloning of human EGF-receptor complementary DNA: gene amplification and three related messenger RNA production A 431 cells. *Science* 224, 843-848.
- 42.- Lax, I., Kris, R., Sasson, I., Ullrich, A., Hayman, M.J., Beug, H., Schlessinger, J. (1985) Activation of *c-erbB* in avian leukos virus-induced erythroblastosis leads to the expression of a truncated EGF receptor kinase. *EMBO J.* 4, 3179-3182.
- 43.- Libermann, T.A., Nussbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, M., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. y Schlessinger, J. (1985) Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature* 313, 144-146.
- 44.- Brown K.D., Dicker, P. y Rozengurt, E. (1979) Inhibition of epidermal growth factor binding to surface receptors by tumors promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 1037-1043.

- 45.- Meyer, S.A. y Jirtle, R.L. (1989) Phenobarbital decreases hepatocyte EGF receptor expression independent of protein kinase C activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 652-659.
- 46.- Shoyab, M., DeLarco, J.E. y Todaro, G.J. (1979) Biologically active phorbol esters specifically alters affinity of epidermal growth factors receptors. *Nature*, 279, 387-391.
- 47.- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Liberman, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A. y Ullrich, A. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with *neu* oncogene. *Science* 230, 1132-1139.
- 48.- Bargman, C., Hung, M.C. y Weinberg, R. (1986) The *neu* oncogene encodes an epidermal growth factor-related protein. *Nature* 319, 226-230.
- 49.- Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K. y Yamamoto, T. (1986). The product of the human *c erbB-2* gene a 185 kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 232, 1644-1646.
- 50.- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I., Weinberg, R.A. (1984) The *neu* oncogene: an *erbB*-related gene encoding a 185.000 Mr tumor antigen. *Nature* 312, 513-516.
- 51.- Das, S.K., Stanley, E.R. (1982) Structure-function studies of a colony-stimulating factor (CSF-1). *J. Biol. Chem.* 257, 13679-13684.
- 52.- Wheeler, E.F., Rouseel, M.F., Hampe, A., Walker, M.H., Fried, V.A., Look, A.T., Rettenmier, C.W. y Sherr, C.J. (1986) The amino-terminal domain of the *v-fms* oncogene product includes a functional signal peptide that directs synthesis of a transforming glycoprotein in the absence of feline leukemia virus *gag* sequences. *J. Virol* 59, 224-233.
- 53.- Rettenmier, C.W., Sacca, R., Furman, W.L., Rouseel, M.F., Holt, J.T., Nienhuis, A.W., Stanley, E.R., Sherr, C.J. (1986) Expression of the human *c-fms* proto-oncogene product (CSF-1 receptor) on peripheral blood mononuclear cells and choriocarcinoma cell lines. *J. Clin. Invest.* 77, 1740-1746.

- 54.- LeBeau, M.M., Westbrook, C.A., Diaz, M.O., Larson, R.A., Rowley, J.D., Gasson, J.C., Golde, D.W. y Sherr, C.J. (1986) Evidence for the involvement of GM-CSF and *c-fms* in the deletion (5q) in myeloid disorders. *Science* 231, 984-987.
- 55.- Massagué, J. y Czech, M.P. (1982) The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 257, 5028-5033.
- 56.- Petruzzelli, L., Herrera, R. y Rosen, O.M. (1984) Insulin receptor is an insulin-dependent tyrosine protein kinase: copurification of insulin-binding activity and protein kinase activity to homogeneity from human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3327-3331.
- 57.- White, M.F., Maron, R. y Kahn, C.R. (1985) Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of an M_r-185,000 protein in intact cells. *Nature* 318, 183-188.
- 58.- Baldwin, G.S. (1985) Epidermal growth factor precursor is related to the translation product of the Moloney sarcoma virus oncogene *mos*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1921-1924
- 59.- Blair, D.G. (1986) *mos*. en: *Oncogenes and Growth Control*. (ed P. Khan and T. Graf) Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. pp 121-127.
- 60.- Graf, T. y Beug, H. (1983) Role of the *v-erbA* and *v-erbB* oncogenes of avian erythroblastosis virus in erythroid cell transformation. *Cell* 45, 349-353.
- 61.- Derynk, R. (1988) Transforming Growth Factor α . *Cell* 54, 593-595.
- 62.- Derynck, R., Jarret, J.A., Chen, E.Y., Eaton, D.H, Bell, J.R., Assoian, R.K., Roberts, A.B., Sporn, M.B. y Goeddel, D.V. (1985) Human transforming growth factor- β cDNA sequence and expression in tumor cell lines. *Nature* 316, 701-705.
- 63.- Massague, J. (1985) Subunit structure of a high-affinity receptor for type β -transforming growth factor: evidence for a disulfide-linked glycosylated receptor complex. *J. Biol. Chem.* 260, 7059-7066.
- 64.- Shipley, G.D., Pittelkow, M.R., Wille, J.J.Jr, Scott, R.E. y Moses, H.L. (1985) Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type β -transforming growth factor/growth inhibitor in serum free medium. *Cancer Res.* 45, 2068-2071.

- 65.- Andrews, H.J., Edwards, T.A., Cawston, T.E. y Hazleman, B.L. (1989) Transforming Growth factor β causes partial inhibition of interleukin-1-stimulated cartilage degradation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 144-150.
- 66.- Robb, R.J., Munck, A. y Smith, K.A. (1981) T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity and biological relevance. *J. Exp. Med.* 154, 1455-1474.
- 67.- Gewirtz, A.M., Anfossi, G., Venturelli, D., Valpreda, S., Sims, R. y Calabretta, B. (1989) G1/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by *c-myc*. *Science* 245, 180-183.
- 68.- Smith, K.A. y Cantrell, D.A. (1985) Interleukin-2 regulates its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 864-868.
- 69.- Old, L.J. (1987) Tumour Necrosis Factor. Polypeptide mediator network. *Nature* 326, 330-331.-rld,
- 70.- Beutler, B. y Cerami, A. (1988). Tumor Necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 505-518.
- 71.- Laster, S.M., Wood, J.G. y Goding, L.R. (1989) Induction of toxic superoxide radicals by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 141, 141. 2629-2634.
- 72.- Masuda, A., Longo, D.L, Kobayashi, Y., Appella, E., Oppenheim, J.J. y Matsushima, K. (1988) Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in human melanoma cells by interleukin-1. *FASEB J.* 2, 3087-3091.
- 73.- Asch, K., Watanabe, Y., Mizoguchi, H., Mawatari, M., Ono, M., Kohno, K. y Kuwano, M. (1989) Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor in human breast cancer MCF-7 cell line and its TNF-resistant variant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 794-801.
- 74.- Scolnik, E.M., Papageorge, A.G. y Shin, T.Y. (1979) Guanine nucleotide binding activity as an assay for *src* protein of rat-derived murine sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5355-5359.
- 75.- Stryer, L., (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Ann. Rev. Neurosci.* 9, 87-119.

- 76.- Masters, S.B. y Bourne, H.R. (1986) Role of G-proteins in transmembrane signaling. en *Oncogenes and Growth Control* (ed. P. Khan y P. Graf) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 184-191.
- 77.- Barbacid, M. (1987) *ras* Genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 779-827.
- 78.- Sigal, I.S., D'Alonso, J.S. y Scolnick, E.M. (1986) Mutant *ras* encoded proteins with altered nucleotide binding exert domination. *Biological Effects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 952-956.
- 79.- McCornick, F., Clark, B.F., la Cour, T.F.M., Kjeldgaard, M., Nørskov-Lauritsen, L. y Nyberg, J. (1985) A model for the tertiary structure of p21, y the product of the *ras* oncogene. *Science* 230, 78,-82.
- 80.- Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J. y de Laat, S.W. (1986) Growth factor like action of phosphatidic acid. *Nature* 323, 171-173.
- 81.- McCornick, F. (1989) *ras* GTPase activating protein signal transmitter and signal terminator. *Science* 56, 5-8.
- 82.- Shih, T.Y., Stokews, P.E., Smythers, G.W., Dhar, R. y Oroszlan, S. (1982) Characterization of the surrounding aminoacids sequences of the p21 transforming proteins coded by the Harvey and Kirsten strain of murine sarcoma viruses. *J. Biol. Chem.* 257, 11767-11786.

ABREVIATURAS

AMP	adenosina monofosfato.
cAMP	AMP ciclico.
ATP	adenosina trifosfato.
AEV	virus de la eritroblastosis de las aves.
BPV	virus del papiloma bovino.
cDNA	DNA complementario.
EGF	factor de crecimiento epidérmico.
pro-EGF	precursor del EGF.
FeSV	virus de sarcoma felino
GAP	proteína activadora de la GTPasa.
GMP	guanosina monofosfato.
cGMP	GMP ciclico.
GTP	guanosina trifosfato.
IL-2	interleuquina-2
IP ₃	inositol trifosfato.
LDL	lipoproteínas de baja densidad.
MSV	virus de sarcoma murino.
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
pHi	pH intracelular.
PKC	proteína quinasa C
PMA	acetato de forbol miristato = TPA
SOD	superóxido dismutasa
TGF α	factor transformante de crecimiento α .
TGF β	factor transformante de crecimiento β .
TGFs	factor transformante de crecimiento s.
TNF	factor de necrosis tumoral.
TPA	12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato = PMA

DISCURSO DE CONTESTACION

Por el Ilustrísimo Señor Doctor
Don MIGUEL DEAN GUEL BENZU
Académico Numerario de la
Real Academia de Doctores.

Exmo. Sr. Presidente. Ilustre Cuerpo Doctoral. Señoras y Señores:

Hace muchos años que conozco y trato a María Cascales Angosto. Años de convivencia, como miembros del Departamento de Bioquímica que regía el Profesor Santos Ruiz, de la que surgió una clara amistad, que pudo prolongarse, tras mi jubilación, en el año 1983, y antes de ella, al coincidir, semanalmente, en las sesiones y trabajos de colaboración de la Real Academia de Farmacia, a la que ambos pertenecíamos como miembros correspondientes.

Es lógico que, para mí, sea motivo de alegría y satisfacción el haber sido elegido para contestar a su Discurso de ingreso en esta Real Corporación. Y considero que me honra, esta elección, no solamente por representar oficialmente a la Academia sino también, en virtud de la alta categoría científica de la doctora recipiendaria: Entre sus muchos méritos, (que luego veremos, aunque sólo sea someramente), hemos de destacar, "a priori", un hecho insólito, singular: Su ingreso, en 1987, como Académica de Número de la Real Academia de Farmacia, hace, de ella, la primera dama de carrera científica (no de letras) que formó parte del Instituto de España.

Aquel Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, que era un Centro Coordinado con el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, ha pasado a ser después (como ya fue antes), Instituto de Bioquímica, pero ahora Centro Mixto del Consejo y la Universidad, hasta hace poco tiempo bajo la dirección de la Doctora Cascales Angosto.

Podemos destacar, ya en este lugar, otro dato relevante de su personalidad científica: Ha sido incluida en el Who's who in Spain (¿quién es quién en España?), los años 1988 y 1989.

*** *** ***

No voy a ocuparme de todos los valores humanos que concurren en su persona. Basta decir que ellos han hecho, ciertamente, fácil nuestra mutua amistad, aun siendo bastante diferentes. Diferentes, por lo menos, en edad; no hay más que verlo. Pero esto no ha sido nunca obstáculo para nuestro personal afecto y mutuo entendimiento.

Ha tenido, más de una vez, la gentileza de invitarme a su casa con motivo de alguna fiesta. Y allí, junto a otros amigos y parientes, hemos podido, entre otras cosas, comprobar y contrastar nuestras respectivas aptitudes musicales, al tañer su precioso órgano electrónico. He aquí una faceta, quizás menos conocida, de sus valores humanos. Permitidme la licencia de una breve digresión:

Leyendo a Fray Luis de León, me encontré con unos versos, dedicados a Francisco de Salinas, que comienzan así:

El aire se serena
Y viste de hermosura y luz no usada,
Salinas, cuando suena
La música extremada
Por vuestra sabia mano gobernada.

(Bello y delicado elogio del arte de Salinas!. No cabe duda que la buena música "serena" e "ilumina" el aire, sosiega y eleva el espíritu. Crea un clima de "silencio interior" (valga la paradoja) que sensibiliza al alma y a los sentidos para captar delicados matices. Silencio y paz interior que facilitan la actividad de la mente que tan necesaria es al científico y al investigador para el desarrollo de su saber y de su propia ciencia.

Bueno será, pues, fomentar el cultivo de esta faceta del arte y del espíritu que, además de sosiego y descanso, es fuente de gozos inenarrables. En apoyo de esto, puedo aducir un valioso testimonio: El de Gustavo Villapalos, Rector Magnífico de la Universidad Complutense de Madrid, que, en el acto de investidura de Doctor "Honoris Causa" de Plácido Domingo, al manifestar este su sueño de ver una Facultad de Música en la Universidad, recogió dicho deseo como algo digno de ser estudiado con interés y afirmó que la música ayuda a vivir y a sobrellevar sufrimientos.

En la Universidad Autónoma de Madrid funciona un Departamento de Música y en él se hacen Tesis Doctorales. Es un ejemplo entre otros que podríamos citar. Por eso, Antonio Fernández Cid, en un artículo en que trata, más recientemente, del tema que nos ocupa, acaba diciendo que "la música ya no es forastera en la Universidad". Y se pregunta: ¿Podremos considerarlo como anuncio de tiempos mejores?.

Al hablar de buena música y la hay, muy buena, también, entre la folclórica y popular, no me quiero referir, aunque respeto la opinión contraria, a cierto tipo de estruendosos ritmos, en boga, que no "serenan", precisamente, ni "iluminan" nada, por lo que suelen acompañarse de fogonazos y cambios artificiales de luces con los que tratan de suplir esa carencia.

La alusión a las personales experiencias filarmónicas de la doctora beneficiaria y de quien os habla, me ha brindado la ocasión, que no he querido desaprovechar, de hablaros en el seno de esta Docta y Real Corporación, para abogar por una mayor preocupación de los universitarios por los temas musicales. No me importa, aunque pido perdón por ello, el haberme desviado del hilo de mi discurso.

Es evidente que, el desarrollo de las aptitudes artísticas exige dedicación, además de idoneidad. En esto coinciden la Ciencia y el Arte.

*** *** ***

Veamos ya, brevemente, el itinerario científico de la Doctora Cascales Angosto: Su incorporación al Departamento de Bioquímica se produce en el año 1958 y sus primeros pasos los da en estrecha colaboración con Federico Mayor Zaragoza, a la sazón Profesor Adjunto del Departamento Facultativo, (coordinado, repito, con el C.S.I.C.). Con los años, al pasar el Dr. Mayor Zaragoza como Catedrático, tras brillantes oposiciones, a la Universidad de Granada, María le sucedió como Jefe de la Sección de Enzimología y yo ocupé su cargo de Profesor Adjunto. Pero antes de esto recorrió todos los escalones: Becaria, Ayudante de Sección, Colaboradora Científica, Investigadora Científica y Jefe de Sección. Y más tarde, ya lo dijimos, accedió a la Dirección del Instituto de Bioquímica (Centro Mixto).

El "currículum" de María Cascales es sobradamente extenso; no podemos hacer otra cosa que, tras una severa selección en el abundante material disponible, limitarnos a una somera indicación de los aspectos más importantes.

Aparte de las becas que, oportunamente, se le concedieron, ha recibido, a lo largo de los años, numerosas ayudas económicas que superan la docena. No creo que sea necesario detallarlas aquí.

Si las ayudas económicas recibidas pueden ser garantía de la solidez de su labor experimental, sus estancias en países extranjeros nos muestran su constante afán de superación y su inquietud por conocer nuevas directrices y nuevas técnicas aplicables a su propio trabajo.

Vamos a omitir la larga lista de fechas y estancias en diversos laboratorios de países extranjeros. Pero quiero subrayar, que aparte de su primer maestro, el Profesor Santos Ruiz, quienes más han influido en su formación científica son: el Doctor Federico Mayor Zaragoza en España, el Doctor Santiago Grisolia en los Estados Unidos y la Doctora Patricia MacLean en el Reino Unido.

Ha publicado más de ochenta trabajos de investigación, redactados en español, francés e inglés, en las más importantes y prestigiosas revistas nacionales y extranjeras. Además ha contribuido, con cerca de noventa comunicaciones y ponencias, a diversos congresos..

Ha formado parte de comisiones organizadoras de Congresos y Reuniones Científicas y en diversas ocasiones ha actuado como presidente de mesa y como ponente en mesas redondas.

Su obra científica ha sido repetidamente citada en revistas prestigiosas (por ejemplo, "Annual Review of Biochemistry" y el "Comprehensive Biochemistry") e incluso en libros de varios autores, como los de West y Tood, Boyer, Becker, etc. Ha sido galardonada con diversos premios en concursos científicos que no vamos a detallar. Posee la Medalla Condecoración del Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia al que pertenece como miembro Correspondiente. Así mismo es miembro de la Sociedad Española de Bioquímica, Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Biochemical Society, etc. , y pertenece, desde el año 1987 a la Cofradía Internacional de Investigadores, de Toledo (medalla número 212) que preside S.M. la Reina Sofía.

Más de una vez ha sido designada como Vocal de Tribunal de oposiciones a plazas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y miembro de Jurados calificadores de premios.

Estos "botones de muestra" creo que bastan para dar una idea de la categoría científica de la doctora beneficiaria.

*** *** ***

El discurso que acabamos de oír, sin otros datos ya indicados, confirmaría plenamente nuestro aserto. La materia objeto de su atención, que es de palpitante actualidad, ("candente", es el calificativo empleado por su autora en la introducción), ha sido tratada, en profundidad y detalle, de forma magistral.

No vamos a entrar en un análisis pormenorizado del discurso, que no añadiría nada a lo que hemos oído. Pero todos podemos darnos cuenta de la importancia evidente que, en sí, ya tienen los actuales conocimientos sobre los mecanismos de la proliferación celular y que la profundización y el avance, en cuanto a los mismos se refiere, ofrece perspectivas halagueñas, no sólo por el interés puramente científico que implica el conocimiento, cada vez más cierto y real, de los normales procesos celulares, sino especialmente, por la relación existente entre este conocimiento y el de las posibles perturbaciones de los genes normales, ó proto-oncogenes, que conduciría a la oncogénesis. Y cuanto más profundo y real sea este conocimiento más cerca se hallará la posibilidad de un tratamiento eficaz. Y quizás podría llegarse, andando el tiempo, a la misma soñada erradicación de algunos procesos cancerosos como ya, en otros campos, se ha logrado con diversas enfermedades infecciosas que no hace tantos años eran azote de la humanidad.

La mayor parte de los factores de crecimiento conocidos son de naturaleza polipeptídica; los "autocrinos" actúan en la misma célula que los produce y los "paracrinos" en células cercanas, pero las hormonas, factores "endocrinos", se suelen transportar a las células por vía vascular, para actuar en lugares distantes de la glándula que los produjo. En cualquier caso, han de fijarse a los receptores específicos de la membrana, que presentan una elevada afinidad; los cambios conformacionales producidos por esta unión, son reconocidos por un agente "transductor" y se inicia, así, una cascada de reacciones. Posteriormente, el flujo metabólico de las vías multienzimáticas se altera de acuerdo con las características fenotípicas de la célula estimulada. Hay modulación de la actividad enzimática, determinante de la velocidad en una secuencia metabólica escalonada. Esta modulación puede ser debida a una fosforilación de la proteína por una proteína-quinasa específica.

Las hormonas clásicas, como la somatotropina, promueven un incremento de la división celular en organismo intacto pero no estimulan la proliferación celular en cultivo de células "in vitro". La insulina, sin embargo, ofrece una aparente excepción; en estos efectos hay interacciones de la insulina con los receptores de la somatomedina C. De igual manera, agentes que producen el crecimiento folicular del ovario cuando se administran "in vivo", no presentan "in vitro" efectos mitogénicos mientras que los factores locales de crecimiento promueven "in vitro" la división de las células granulosas.

Los bioquímicos endocrinólogos clásicos poseían un medio relativamente fácil para determinar las funciones de las hormonas mediante la extirpación de la fuente primaria de la correspondiente hormona (el páncreas, o las células beta, en el caso de la insulina) y determinar de esa manera la naturaleza y dosis de los componentes que se requieren para la corrección del desequilibrio metabólico

o proliferativo observado en el animal ectomizado. Para el biólogo molecular y celular la ruta no es tan fácil en lo referente a las funciones de control de factores de crecimiento.

La comparación de las hormonas clásicas con los factores, más recientemente descubiertos, que controlan el crecimiento, pone de manifiesto una serie de diferencias y analogías. Los nuevos factores de crecimiento pueden ser generados por diferentes tipos de células. Si se desea eliminar del organismo estos factores locales de crecimiento, es necesario recurrir a técnicas más precisas que las de cirugía o farmacología. Las tecnologías del DNA recombinante hacen teóricamente posible prevenir la expresión de un factor de crecimiento específico mediante el uso de "anti-sense mRNA".

He leído, recientemente, un artículo del "Journal of the International Federation of Clinical Chemistry", en el que autores alemanes dicen que, "el impresionante y rápido avance experimentado en el desarrollo de métodos aplicables en biología molecular abre nuevos e interesantes caminos para el diagnóstico de las enfermedades en el hombre. Hay bastantes, ya, ahora, bien establecidas, aunque todavía se precisan nuevos esfuerzos en cuanto a automatización se refiere.

También Teresa Pampols Ros, de la Comisión de Enfermedades Metabólicas Congénitas, de la Sociedad Española de Química Clínica, escribe, recientemente: "El rápido desarrollo, durante los últimos años, de la bioquímica y biología celular y sus aplicaciones al estudio de las enfermedades genéticas, ha tenido un impacto significativo, en el establecimiento de los defectos primarios causantes de la patología, en sus aplicaciones diagnósticas y en la prevención y terapia de los errores congénitos del metabolismo".

"Candente" actualidad, del tema del discurso de María Cascales, por su interés científico y por sus halagueñas perspectivas, repito, en el terreno práctico.

*** *** ***

Si el bien es difusivo por naturaleza, el bien de la cultura, de la ciencia, del saber, debe serlo de un modo especial.

María Cascales Angosto siempre se ha distinguido por ese difundir generosamente, compartir, poner a disposición de los demás, sus saberes y sus hallazgos. Prueba de ello son las numerosas Tesis Doctorales y Tesinas de Licenciatura por ella dirigidas o apadrinadas. Muchos de sus antiguos colaboradores ocupan hoy cargos en los campos de la investigación, en la docencia, de la administración, etc.

Aparte de esta labor de formación científica de sus propios colaboradores, su saber se difunde de una manera más generalizada a través de coloquios y conferencias, en España y en el extranjero. A esto hay que añadir sus ocasionales actividades docentes en cursos de doctorado en la Universidad y en la Escuela de Perfeccionamiento Profesional de Análisis Clínicos de Madrid y en la Real Academia de Farmacia, así como en sus frecuentes intervenciones espontáneas y ocasionales en las sesiones científicas de esta última, en su calidad de académica correspondiente y después como numeraria.

Como dice el Profesor Santos Ruiz, en su discurso de recepción del doctorado "Honoris Causa" por la Universidad de Navarra, en Enero de este año de 1989, "no se aprende -y enseña- sin laboriosidad; los atajos no son fiables andaduras. Sabido es que el esfuerzo se obvia con sofismas, pero al precio de la degradación de la personalidad". Esta misma idea es la que queríamos apuntar, anteriormente, al decir que, tanto en la ciencia como en el arte, se requiere, para el que a ellos se dedica, idoneidad, por supuesto, pero también dedicación, laboriosidad. Ese constante goteo del trabajo diario, quizás pase desapercibido al observador superficial pero, puede acabar siendo caudaloso río que desemboque en mar sin orillas.

María Cascales tiene demostradas, con obras, su idoneidad y su laboriosidad constante puestas al servicio de la bioquímica. Lo mismo ocurriría, estoy seguro, si se dedicase a la música.

Idoneidad; laboriosidad. Y también sentido común; pragmatismo. Estas son cualidades que afloran en su labor investigadora.

Por contraste podemos observar que, algunas personas sueñan en grandes cosas y mientras se ocupan en ello dejan escapar el deber concreto cuyo cumplimiento reclama el momento; ese deber que es más real que todas las maravillosas, pero imaginarias, construcciones en que suelen andar entretenidas. De Chesterton es el siguiente ejemplo significativo:

Habla en Londres un hombre que, al terminar su trabajo, recorría una larga distancia para poder contemplar por breve tiempo, en un museo, antes de que lo cerraran, un cuadro de brillante colorido que representaba una puesta de sol. Pero a este hombre jamás se le había ocurrido que bastaba asomarse a la ventana de su casa para contemplar unas espléndidas puestas de sol que Dios pintaba para él todos los días.

*** *** ***

Todo lo que antecede explica, plénamente, mi personal gozo al acoger, oficialmente, en el seno de esta Docta y Real Corporación, a la beneficiaria, Excelentísima Señora Doña María Cascales Angosto, Doctora en Farmacia y darle mi más afectuosa y entusiasta bienvenida. No me queda más que desearle una larga y eficaz permanencia entre nosotros; y entre los que vengan detrás.

Mirar hacia atrás, observar el camino recorrido, puede ser aleccionador para aprovechar la experiencia adquirida y para evitar, en su caso, la repetición de posibles errores que caben en toda obra humana. Pero es más positivo mirar hacia adelante y contemplar, no solo los frutos ya cuajados sino también, y especialmente, las esperanzadas promesas de los que se hallan en plena y fecunda sazón, como es el caso de la Doctora Cascales Angosto. Y este talante optimista es gozo y alegría, así mismo, para los que, por haber consumido ya buena parte de la personal dosis del néctar de la vida, estamos algo más cerca de ese fin, de ese tránsito al Padre, que es Principio sin fin para el creyente. Y el no creyente.

Como colofón a estas mis palabras me parece adecuado el siguiente fragmento de unos versos de Garcilaso de la Vega:

... ¡Adiós, montañas; adiós, verdes prados;
adiós, corrientes ríos espumosos!
Vivid sin mí con siglos prolongados;
... Y mientras en el curso presurosos
ireis al mar a darle su tributo,
corriendo por los valles pedregosos...

Voy a terminar con la formulación de un buen deseo para María Cascales:

Que esa marcha tuya hacia el mar sin orillas, transcurra, más que por caminos pedregosos, por floridos y hermosos valles.

HE DICHO

INDICE

INTRODUCCION.....	7
FACTORES DE CRECIMIENTO	
Factores de crecimiento polipeptidicos	10
Señalización a través de la membrana.....	12
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas y oncogén <i>v-sis</i>	15
Mecanismos de elevación del pH intracelular (pHi) inducido por mitógenos y su significación biológica.....	17
Calcio.....	18
RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y ONCOGENES	
Tirosina proteina quinasas	20
- Receptor EGF y oncogenes <i>v-erb</i>	21
- Oncogenes relacionados con el <i>erbB</i> , <i>neu</i> y <i>erbB2</i>	23
- Receptor macrófago CSF-1 y proto-oncogén <i>c-fms</i>	24
- Receptor de insulina humano y oncogén <i>v-ras</i>	25
- Factor de crecimiento pro-epidérmico (pro-EGF) y oncogén <i>mos</i>	26
- Receptores de hormonas tiroideas y proto-oncogén <i>c-erbA</i>	28
OTROS FACTORES RELACIONADOS CON LA PROLIFERACION CELULAR	
- Factor transformante del crecimiento α (TGF α).....	29
- Factor de crecimiento transformante β (TGF- β).....	29
- Interleuquina-2. Factor de crecimiento de células T	31
- Factor de necrosis tumoral (TNF)/caquectina	32
PAPEL DE LAS PROTEINAS G EN LA TRANSDUCCION DE SEÑALES Y HOMOLOGIA FUNCIONAL CON LAS PROTEINAS <i>ras</i>	
- Proteinas G.....	33
- Proteinas <i>ras</i>	34
CONSIDERACIONES FINALES	38
BIBLIOGRAFIA.....	41
ABREVIATURAS	49
DISCURSO DE CONTESTACION.....	53

